

UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA
DEPARTAMENTO DE OBRAS CIVILES
VALPARAISO - CHILE



ESTUDIO SOBRE EL RENDIMIENTO DE BACTERIAS COMO AGENTE DE AUTO-REPARACIÓN EN EL
HORMIGÓN BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE TEMPERATURA Y TIPO DE CEMENTO.

ARACELI CAMILA PARRAGUEZ MACAYA

Memoria para optar al Título de
Ingeniera Civil

Profesor Guía

Álvaro González Vaccarezza

Profesor Co-referente

Rodrigo Delgadillo Sturla

Septiembre de 2018

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias a una suma de eventos y posteriormente de esfuerzos que le dieron forma y fin a esta etapa, por lo que quiero agradecer a todas las personas directa o indirectamente involucradas en su realización.

Agradezco al grupo de trabajo motivado por esta investigación y a sus ansias de aportar al conocimiento científico: en primer lugar a mi profesor guía Álvaro González, quien me entregó su confianza y apoyo constantemente. A los profesores Liliana Corvalán, Néstor Correa, y Javier Castro, a la investigadora Claudia Stuckart y a mi gran amiga Eva María Schielbs.

Agradezco a la Universidad del Desarrollo por la oportunidad que me entregó de investigar, y en especial a quienes colaboraron con mi trabajo en el laboratorio: Elber Gajardo, Eduardo Vega, Horacio Moya y Don Omar.

A los consejos de mis amigos de la vida Diana Adela Pinilla Mancilla y Marcelo Christian Gajardo Vargas, y a mi amigo y químico de cabecera Esteban Alonso General Alarcón.

Agradezco por su cariño y sus risas a mi hermana Valeria Alicia Parraguez Macaya y agradezco por su apoyo y amor a través de la distancia a Martin Potěšil.

Finalmente, dedico esta memoria, para agradecer de manera especial, a mis amados y maravillosos padres María Alicia Macaya Santibáñez y Manuel Enrique Parraguez Rojas.

RESUMEN

Dada la actual situación medioambiental, se ha vuelto cada vez más precisa la incorporación de materiales sustentables dentro del mundo de la construcción; industria responsable en gran parte de la generación de gases de invernadero. Es por esto que dentro de las tecnologías que se han ido desarrollando, un hormigón auto-reparable por bacterias, aumentaría la vida útil de las estructuras, disminuyendo así los costos, gastos energéticos e impactos ambientales asociados a la reparación.

La presente investigación analiza algunas de las condiciones ambientales a las que se podrían enfrentar los microorganismos responsables de la auto-reparación y verificar su eficacia y por ende su posible aplicación.

La utilización de la bacteria *Bacillus Pseudofirmus* muestra una mejora en grietas de hasta 0.38 mm a temperaturas de 23°C, lo que posibilita su utilización en climas cálidos. Respecto a los resultados obtenidos en cada tipo de cemento, se muestra levemente un mejor desempeño para el cemento Portland, en comparación al Puzolánico.

ABSTRACT

Given the current environmental situation, the incorporation of sustainable materials within the field of construction has become a necessity. The industry is responsible for a large amount of the emanation of greenhouse gases. Thanks to the progress in Microbiology we have access to the technology that enables us to produce self-healing concrete by bacteria. This material will prolong life of structures, reducing the cost, energy and environmental impact of maintenance on the structures.

The present investigation analyzes some environmental conditions where the microorganism is effective and will repair the subject. Furthermore, these analyzes allow us assess behavior of the bacteria and therefore we can classify it for future application.

The use of *Bacillus Pseudofirmus* bacteria shows an improvement in cracks of up to 0.38 mm at temperatures of 23 ° C, which allows its use in warm climates. Regarding the results obtained in each type of cement, it shows a slightly better performance for Portland cement, compared to Pozzolanic cement.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	II
ÍNDICE GENERAL	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	3
1.2.1 HIPÓTESIS.....	3
1.2.2 OBJETIVOS GENERALES.....	3
1.2.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	3
1.3 ALCANCES DE ESTE ESTUDIO	4
1.4 ESTRUCTURA DE LA TESIS	5
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA Y TEORÍA.....	6
2.1 COMPONENTES DEL HORMIGÓN AUTO-REPARABLE	6
2.1.1 HORMIGÓN.....	6
2.1.2 CEMENTO Y TIPOS.....	6
2.1.3 ÁRIDOS.....	7
2.1.5 AGENTE DE AUTOREPARACIÓN	7
2.1.4 BACTERIA	8
2.2 ASPECTOS GENERALES DE LA AUTO-REPARACIÓN DE MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN.....	9
2.2.1 AUTOREPARACIÓN AUTÓGENA DEL HORMIGÓN.....	10
2.2.2 AUTO-REPARACIÓN BASADA EN ADITIVOS MINERALES	11
2.2.3 AUTO-REPARACIÓN BASADA EN AGENTES ADHESIVOS	11
2.3 AUTO-REPARACIÓN DEL HORMIGÓN CON BACTERIAS.....	11
2.3.1 FORMACIÓN DE CRISTALES.....	12
2.3.2 BIOMINERALIZACIÓN.....	16
2.3.3 BIOMIMETISMO.....	17
2.3.4 PRECIPITACIÓN DE CALCITA MEDIANTE LA ACCION BACTERIANA.....	18
2.3.5 BACTERIA BACILLUS PSEUDOFIRMUS	21
2.4 FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO DEL HORMIGÓN AUTO-REPARABLE	22
2.4.1 CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS.....	23
2.4.2 FUENTE DE CALCIO	24
2.4.3 TÉCNICAS DE ENCAPSULACIÓN DE LAS BACTERIAS	26
2.4.3 CONDICIONES DE HUMEDAD PARA LA AUTO-REPARACIÓN.....	29

3. FACTORES DE ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	31
3.1.1 TEMPERATURA	31
3.1.2 TIPOS DE CEMENTO	33
4. METODOLOGÍA PARA LA PREPARACIÓN DEL AGENTE DE AUTO-REPARACIÓN.....	38
4.1 INTRODUCCIÓN	38
4.2 MÉTODOS PARA RESPALDAR LA VIABILIDAD DE LA BACTERIA <i>BACILLUS PSEUDOFIRMUS</i>	39
4.2.1 DENSIDAD ÓPTICA (D.O.).....	39
4.2.2 MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE.....	40
4.2.3 CURVA DE CRECIMIENTO.....	41
4.2.4 TINCIÓN GRAM Y TINCIÓN DE SHAEFFER-FULTON.....	43
4.3 CRECIMIENTO Y ESPORULACIÓN DE LA BACTERIA <i>BACILLUS PSEUDOFIRMUS</i>	44
4.3.1 CULTIVO DE LA BACTERIA	44
4.4 PREPARACIÓN DEL AGENTE DE AUTO-REPARACIÓN	49
4.4.1 LACTATO DE CALCIO Y EXTRACTO DE LEVADURA.....	49
4.4.2 ARCILLA EXPANDIDA	50
4.4.3 IMPREGNACIÓN EN ARCILLA EXPANDIDA.....	52
5. METODOLOGÍA PARA LA PREPARACIÓN DEL HORMIGÓN PARA VERIFICAR AUTO-REPARACIÓN Y RESISTENCIA A COMPRESIÓN	54
5.1 INTRODUCCIÓN	54
5.2 FABRICACIÓN DE PROBETAS DE HORMIGÓN.....	55
5.2.1 MATERIALES.....	55
5.2.2 PROCEDIMIENTO	57
5.3 INDUCCIÓN DE GRIETAS EN LAS PROBETAS PRISMÁTICAS DE HORMIGÓN	60
5.4 ENSAYO A COMPRESIÓN DE PROBETAS CÚBICAS.....	61
6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	64
6.1 INTRODUCCIÓN	64
6.2 MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE	65
6.2.1 Suspensión de Medio Mineral con Bacterias	66
6.2.2 Agente de Auto-reparación.....	67
6.2.3 Hormigón Auto-reparable.....	68
6.3 COMPARACIÓN RESISTENCIA A LA COMPRESIÓN	70
6.4 ANÁLISIS DE IMÁGENES.....	72
6.4.1 Auto-reparación según porcentaje de área sellada.....	73

6.4.2 Auto-reparación según porcentaje del espesor de la grieta auto-reparado.....	87
6.5 ANÁLISIS DEL AGUA	93
6.5.1 Cromatografía de intercambio iónico (IEC).....	93
6.5.2 Resultados.....	95
6.6 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX) Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	96
6.6.1 Difracción de rayos X	97
6.6.2 Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).....	99
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	104
7.1 CONCLUSIONES	104
7.2 RECOMENDACIONES	107
8. REFERENCIAS	108
ANEXOS	113
A. TABLA DE ESTIMACIÓN POBLACIONAL DE BACTERIAS PARA MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (WOOMER, 1994)	113
B. CALIDAD DEL AGUA AGUAS CORDILLERA S.A.	114
C. INFORMACIÓN TÉCNICA CEMENTOS BSA.....	116
1. BSA ESPECIAL	116
2. BSA PREMIUM.....	116
D. DATOS OBTENIDOS MEDIANTE EL SOFTWARE IMAGEJ	118
1. RESULTADOS DE LA AUTO-REPARACIÓN SEGÚN EL PORCENTAJE DE ÁREA SELLADA PARA DISTINTAS TEMPERATURAS.....	118
2. RESULTADOS DE LA AUTO-REPARACIÓN SEGÚN EL PORCENTAJE DE ÁREA SELLADA PARA DIFERENTES TIPOS DE CEMENTO	120
3. RESULTADOS DE LA AUTO-REPARACIÓN SEGÚN ESPESORES FINALES PARA DIFERENTES TEMPERATURAS Y TIPOS DE CEMENTO	121
E. PATRONES DE CRISTALOGRAFÍA OBTENIDOS MEDIANTE ANÁLISIS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X	123
1. PATRÓN DE DIFRACCIÓN CEMENTO PORTLAND	123
2. PATRÓN DE DIFRACCIÓN CEMENTO PUZOLÁNICO.....	124
3. PATRÓN DE DIFRACCIÓN MATERIAL DE SELLADO EN LAS GRIETAS.....	125

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2 - 1: Varios tipos de bacterias y sus resultados de resistencia a la compresión (Kunamineni, et al., 2017).	24
Tabla 3 - 1: Cociente entre densidad y viscosidad del agua según su temperatura.	33
Tabla 3 - 2: Temperaturas a las que someterá a las probetas en el proceso de auto-reparación....	35
Tabla 3 - 3: Matriz experimental.	36
Tabla 4 - 1: Medio de Cultivo 253, Belgian Co-ordinated Collections of Micro-Organisms BCCM... ..	45
Tabla 4 - 2: Solución Na-sesquicarbonato de sodio.	45
Tabla 4 - 3: Medio mineral. Reactivos para un litro de solución.....	47
Tabla 4 - 4: Reactivos para 100 ml de solución SL12B.	48
Tabla 4 - 5: Granulometría arcilla expandida AREXPAN. Peso total de la muestra: 391.7 gr.	50
Tabla 4 - 6: Porcentaje de absorción de la arcilla expandida tamizada entre las mallas n°4 y n°20. 52	
Tabla 4 - 7: Dosificación para Agente de Auto-Reparación.....	52
Tabla 4 - 8: Concentración de bacterias en el agente de auto-reparación mediante el método del NMP.....	53
Tabla 5 - 1: Granulometría Arena Fina. NCh 165 Of 77.....	55
Tabla 5 - 2: Densidad sss, densidad seca y absorción de arena fina tamizada.	56
Tabla 5 - 3: Peso Específico determinado con según norma NCh 154 Of 69.	57
Tabla 5 - 4: Porcentaje de resistencia a compresión según la edad del hormigón en relación a los 28 días.	59
Tabla 5 - 5: Dosificación.	59
Tabla 5 - 6: Promedio de las cargas aplicadas para agrietar las probetas prismáticas según tipo de mezcla.	61
Tabla 6 - 1: Resultados de NMP para la suspensión con medio mineral con bacterias mediante el método del NMP.	66
Tabla 6 - 2: Concentración de bacterias en el agente de auto-reparación mediante el método del NMP.....	67
Tabla 6 - 3: Concentración de bacterias en hormigón auto-reparación mediante el método del NMP.....	68
Tabla 6 - 4: Resultados Resistencia a Compresión en MPa.....	70
Tabla 6 - 5: Porcentaje de variación de la resistencia a la compresión con las probetas de control como referencia.	71

Tabla 6 - 6: Fotografías a las probetas.	72
Tabla 6 - 7: Áreas iniciales de las grietas y su porcentaje de sellado luego de 63 días para 23 y 30°C.	77
Tabla 6 - 8: Áreas iniciales de las grietas y su porcentaje de sellado luego de 63 días para cemento portland y puzolánico.....	83
Tabla 6 - 9: Resultados de la cromatografía IEC.....	95
Tabla 6 - 10: Cemento Portland.	98
Tabla 6 - 11: Cemento Puzolánico.....	98
Tabla 6 - 12: Arcilla expandida.	98
Tabla 6 - 13: Material de sellado.....	99
Tabla 6 - 14: DRX.	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - 1: Porcentaje de reparación por segmento del mercado (Adhesives Technology Corporation, 2016).....	1
Figura 2 - 1: Esquema de la pared celular de las bacterias grampositivas y gramnegativas (Madigan, et al., 2014).	8
Figura 2 - 2: a) Auto-reparación autógena debido a la precipitación del carbonato de calcio en presencia de agua y CO ₂ disuelto. b) Precipitación de CaCO ₃ encontrada en la superficie de la grieta (Mihashi & Nishiwaki, 2012).	11
Figura 2 - 3: Sección a través de un vértice de un cristal de NaCl mostrando iones perfectamente enlazados y empaquetados en la parte interna del cristal y enlaces no compensados en la superficie externa (~ representa enlaces químicos no compensados y = enlaces químicos compensados) (Klein & Hurlbut, 1996).	13
Figura 2 - 4: Modelo idealizado de superficie de cristal plana (Elwell & Scheel, 1975).	15
Figura 2 - 5: Etapas en el crecimiento del cristal de la solución (Elwell & Scheel, 1975).	15
Figura 2 - 6: Células estructurales que corresponden a los polimorfos a) Calcita, b) Vaterita y c) Aragonita (Blanco-Gutierrez, et al., 2014).	16
Figura 2 - 7: Esquema sobre las vías para la producción de carbonato de calcio (Hammes & Verstraete, 2002).	19
Figura 2 - 8: a) Esquema de una célula bacteriana b) Colonias de la bacteria en placa c) Bacterias luego de tinción gram.	22
Figura 2 - 9: Número de publicaciones referidas a la auto-reparación del hormigón (Ubeda, 2014).	22
Figura 2 - 10: Resistencia a la compresión de cubos de mortero de cemento en relación con diferentes concentraciones de células de la cepa bacteriana ACRN 4.	23
Figura 2 - 11: Resistencia a la compresión para muestras de hormigón con diferentes cantidades de agente de auto-reparación. a) Agente con Nitrato de Calcio, b) Agente de auto-reparación con Formiato de Calcio, c) Agente de auto-reparación con Lactato de Calcio (Luo & Qian, 2016)	25
Figura 2 - 12: Porcentaje de auto-reparación de las grietas de especímenes agrietados a diferentes edades desde su fabricación (Luo, et al., 2015).	26
Figura 2 - 13: Auto-reparación de las muestras según su espesor en mm en el tiempo (días). La mezcla 1 no tiene agente de auto-reparación, la mezcla 2 tiene las bacterias sin protección, la mezcla 3 contiene el agente en LWA, y la mezcla 4 contiene el agente en GNP.....	28

Figura 2 - 14: Porcentaje de auto-reparación en probetas sometidas a diferentes maneras de proporcionar humedad (Luo, et al., 2015).	29
Figura 3 - 1: Representación de la permeabilidad K según ancho de las grietas a distintas temperaturas (Reinhardt & Jooss, 2003).	32
Figura 3 - 2: Variación en el contenido De Hidróxido de Calcio (Ca(OH)_2) durante la hidratación del cemento portland normal y cemento portland puzolánico (Becker, 2001).	34
Figura 3 - 3: Esquema general del trabajo experimental.	37
Figura 4 - 1: Estimación de la cantidad de bacterias por la turbidez. La cantidad de luz que llega es inversamente proporcional al número de bacterias en condiciones estandarizadas, Cuanto menor es la cantidad de luz transmitida mayor es la cantidad de bacterias en la muestra (Tortora, et al., 2007).	39
Figura 4 - 2: Espectrofotómetro utilizado lectura mediante el software Autosoft.....	40
Figura 4 - 3: a) Placa Petri marcada b) Dilución del cultivo c) Resultados observables.	41
Figura 4 - 4: Curva de crecimiento bacteriano que muestra las cuatro fases típicas del crecimiento (Tortora, et al., 2007).	42
Figura 4 - 5: Curva de crecimiento de la bacteria Bacillus Pseudofirmus (Stuckrath, et al., 2012)...	43
Figura 4 - 6: a) Medio de Cultivo 253 líquido y sólido. b) Bacteria liofilizada contenida en ampolla de vidrio.	46
Figura 4 - 7: Bacteria Bacillus Pseudofirmus (color morado) en Medio de Cultivo 253 (color naranja) en estado activo o vegetativo. b) Bacteria en su estado de espora en Medio Mineral.....	46
Figura 4 - 8: Bacterias en medio mineral. (a) Célula vegetativa. (b) Esporas teñidas con verde malaquita.	48
Figura 4 - 9: Lactato de Calcio.	49
Figura 4 - 10: Porcentaje de absorción de la arcilla en el tiempo.	51
Figura 4 - 11: Bolsa de plástico con el Agente de Auto-reparación.	53
Figura 5 - 1: a) Mezcladora Hobart modelo HL120. b) Molde para probetas cúbicas 5x5x5 cm. c) Molde para probetas prismáticas 16x4x4 cm.	58
Figura 5 - 2: Gráfico de resistencia a compresión según edad del hormigón.	59
Figura 5 - 3: Esquema de ensayo de tracción por flexión con carga P aplicada en el centro de la luz L.	60
Figura 5 - 4: a) Probeta ubicada en la prensa hidráulica antes de ser cargada. b) Probeta agrietada.	61

Figura 5 - 5: Esquema ensayo a compresión.....	62
Figura 5 - 6: A la izquierda prensa para ensayo a compresión. A la derecha prensa para ensayo de tracción por flexión.	63
Figura 6 - 1: Esquema de los análisis realizados.....	65
Figura 6 - 2: Etapas para el método NMP.	65
Figura 6 - 3: Placa Petri con los resultados del NMP para una muestra de hormigón luego de 28 días de curado.	68
Figura 6 - 4: Resistencia a la compresión para los 3, 7 y 28 días.....	71
Figura 6 - 5: Cambio en el tiempo de una probeta fabricada con cemento portland y bacterias, conservada a 23°C. Para el caso de esta grieta el sellado más significativo ocurre entre el día 7 y 21, luego del día 21 el sellado se estanca.	74
Figura 6 - 6: Gráfico del % de auto-reparación del área de las grietas a diferentes temperaturas..	75
Figura 6 - 7: Perfiles de oxígeno en una muestra de hormigón a base de bacterias sumergida en una solución con pH 10.5 (Tziviloglou, et al., 2016).....	76
Figura 6 - 8: Gráfico del porcentaje de auto-reparación de las grietas según su área inicial.	77
Figura 6 - 9: Grieta de probeta BPT04. a) Día 0. b) Día 63.	79
Figura 6 - 10: Grieta de probeta CPT04. a) Día 0. b) Día 63.	79
Figura 6 - 11: Grieta de probeta CPT30. a) Día 0. b) Día 63.	80
Figura 6 - 12: Grieta de probeta BPT30. a) Día 0. b) Día 63.	80
Figura 6 - 13: Grieta de probeta CPT23. a) Día 0. b) Día 63.	81
Figura 6 - 14: Grieta de probeta BPT23. a) Día 0. b) Día 63.	81
Figura 6 - 15: Gráfico del % de auto-reparación del área de las grietas para dos tipos de cemento de cementos.....	82
Figura 6 - 16: Gráfico del porcentaje de auto-reparación de las grietas según su área inicial.	83
Figura 6 - 17: Grieta de probeta LPT23. a) Día 0. b) Día 63.....	85
Figura 6 - 18: Grieta de probeta LPZ23. a) Día 0. b) Día 63.....	85
Figura 6 - 19: Grieta de probeta BPZ23. a) Día 0. b) Día 63.	86
Figura 6 - 20: Grieta de probeta CPZ23. a) Día 0. b) Día 63.	86
Figura 6 - 21: Esquema de una probeta agrietada y los puntos de medición para el espesor.	87
Figura 6 - 22: Comparación espesores sellados a los 30°C.	88
Figura 6 - 23: Comparación espesores sellados para el hormigón con bacterias a 23°C y 30°C.....	88

Figura 6 - 24: Comparación espesores sellados para hormigón preparado con cemento Portland y conservado a 23°C.....	91
Figura 6 - 25: Comparación espesores sellados para hormigón preparado con cemento Puzolánico y conservado a 23°C.....	91
Figura 6 - 26: Comparación espesores sellados con lactato de calcio para hormigón Portland y Puzolánico 23°C.....	91
Figura 6 - 27: Comparación espesores sellados con bacterias para hormigón Portland y Puzolánico 23°C.....	92
Figura 6 - 28: Esquema del principio de retención selectiva utilizado en la cromatografía.....	94
Figura 6 - 29: Cromatógrafo.....	94
Figura 6 - 30: Gráfico de cationes Agua 1.....	95
Figura 6 - 31: Gráfico de cationes Agua 2.....	96
Figura 6 - 32: Difracción de rayos X producida por un cristal.....	97
Figura 6 - 33: Imagen SEM material de sellado 850X.....	101
Figura 6 - 34: Imagen SEM material de sellado 1500X.....	101

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El hormigón es el material de construcción más utilizado a nivel mundial por tratarse de un material resistente, durable y de un costo relativamente bajo, llegando a tener una producción de 10 km³ por año (Gartner & Macphee, 2011).

Pese a tener una alta resistencia a la compresión, el hormigón tiene una baja resistencia a la tracción, por lo que comúnmente se suele reforzar con acero, esto se conoce como hormigón armado. El hormigón armado se diseña permitiendo cierto grado de agrietamiento frente a estados de carga y retracción. Las grietas favorecen el acceso de agentes agresivos tales como cloruros, sulfatos y carbonatos que pueden producir corrosión, no sólo en el acero, sino también del propio hormigón, disminuyendo con esto sus propiedades mecánicas y su durabilidad.

La reparación tradicional del hormigón implica costos elevados. Por ejemplo, en Europa, los recursos destinados a las tareas de reparación se eleva hasta la mitad del presupuesto anual de construcción (Cailleux & Pollet, 2009). Para el caso de Estados Unidos, se estima un costo anual destinado a la reparación, protección y restauración de hormigón entre 18 a 21 mil millones de dólares. En la Figura 1-1 se presenta la proporción de recursos destinados a la reparación de las distintas áreas de infraestructura en EE.UU. De éstas, una parte importante está constituida por obras de hormigón.

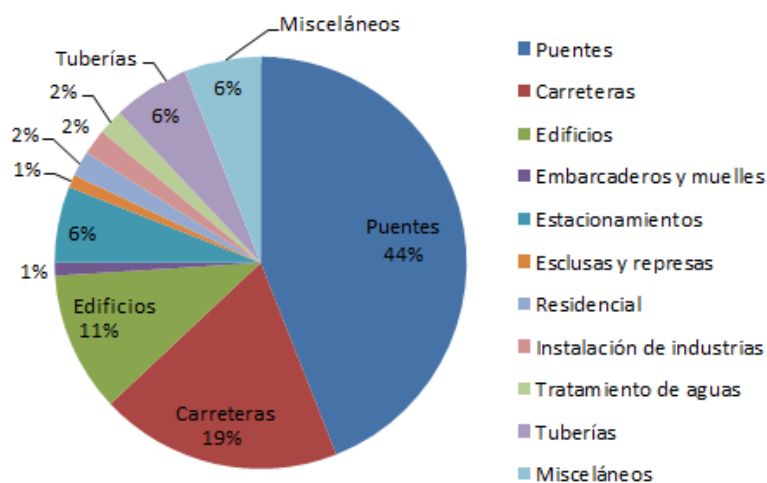


Figura 1 - 1: Porcentaje de reparación por segmento del mercado (Adhesives Technology Corporation, 2016).

Desde un punto medioambiental, la producción de cemento contribuye al 7% de las emisiones mundiales de CO₂, esto debido a la síntesis de caliza y arcilla a temperaturas de aproximadamente 1500°C necesarias para su fabricación (Jonkers, Thijssen, Muyzer, Copuroglu, & Schlangen, 2010). Por otro lado, la producción de los otros componentes del hormigón significa el consumo de grandes cantidades de recursos naturales, agua y energía, lo que sugiere una disminución en su producción.

Una forma de consumir menos hormigón, es extendiendo la vida útil de las estructuras. Es por esto que se ha buscado reparar las grietas formadas en la fase inicial después de la construcción, y así evitar el acceso de agentes agresivos que dañan el acero en el hormigón armado. El mecanismo que entregaría estos resultados es la auto-reparación del hormigón, la cual consiste en diferentes técnicas o procesos que le permiten regenerarse mediante reacciones con el medio ambiente, o de manera medianamente asistida por el ser humano.

El mecanismo de auto-reparación del hormigón por medio de bacterias, ha sido desarrollado en los últimos años, y consiste en la precipitación de carbonato de calcio inducida por algunos tipos de bacterias resistentes a medios alcalinos (Jonkers, Thijssen, Muyzer, Copuroglu, & Schlangen, 2010). Esta habilidad surge como consecuencia del pequeño tamaño de las bacterias y de sus diversas capacidades metabólicas. Las bacterias, más que cualquier otro tipo de organismo vivo, pueden interactuar íntimamente con los iones metálicos presentes en su entorno. (Douglas & Beveridge, 1998)

Si bien se ha comprobado la efectividad de ciertas bacterias en el sellado de fisuras en el hormigón, aún no es un método aplicable en la práctica debido a los costos que conlleva, a la falta de datos de investigación, y a las variables ambientales a las que podría estar expuesta la bacteria, como la temperatura y materiales utilizados como el tipo de cemento, que podrían alterar su eficacia.

1.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.2.1 HIPÓTESIS

El proceso de auto-reparación del hormigón con agentes microbianos tendrá un mejor rendimiento en:

- 1) Temperaturas por sobre de los 20° C, debido a una mejor actividad bacteriana en estas condiciones.
- 2) Hormigones producidos con cemento portland, debido a la mayor cantidad de hidróxido de calcio o portlandita en el cemento portland para la precipitación del carbonato de calcio.

1.2.2 OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de esta investigación es estudiar el efecto de la temperatura y del tipo de cemento utilizado en la matriz de hormigón en la capacidad de la bacteria *bacillus pseudofirmus* de precipitar carbonato de calcio para la auto-reparación de fisuras.

1.2.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Cultivar una bacteria capaz de precipitar carbonato de calcio y verificar su eficacia en la auto-reparación de fisuras en el hormigón.
- Estudiar el efecto de la temperatura en la actividad bacteriana durante la precipitación del carbonato de calcio.
- Comparar los rendimientos en la auto-reparación por bacterias según dos tipos de cemento: Portland y Puzolánico.
- Analizar la influencia de la bacteria y de su fuente de carbono (lactato de calcio) en la resistencia a la compresión del hormigón.

1.3 ALCANCES DE ESTE ESTUDIO

El trabajo presentado en esta memoria se enfoca en el efecto de la temperatura y de dos tipos de cemento en la precipitación de carbonato de calcio para llenar fisuras en el hormigón por medio de la bacteria *Bacillus Pseudofirmus*, cuya eficacia se ha estudiado previamente (Stuckrath, Quantification of chemical and biological calcium carbonate precipitation: Performance of self-healing in reinforced mortar containing chemical admixtures, 2014).

El trabajo experimental de laboratorio, se limita al uso del cemento Portland y Puzolánico. El primero ha sido ampliamente utilizado en otras investigaciones sobre este tema, entregando resultados positivos. El segundo tipo no ha sido estudiado previamente, pero mantiene el foco de interés dada su utilización en la industria cementera en Chile.

Para la encapsulación de la bacteria se utiliza el agregado liviano: arcilla expandida. Si bien no es el material más eficiente para la protección del microorganismo, ha entregado buenos resultados en otros estudios, tiene un bajo costo, y una manipulación sencilla.

El seguimiento posterior al agrietamiento fue de 2 meses, manteniendo un registro periódico visual cada 7 días de la reparación.

1.4 ESTRUCTURA DE LA TESIS

Esta memoria se encuentra organizada en 6 capítulos.

Capítulo 1: Corresponde a la introducción. Aquí se presenta el planteamiento del problema en discusión, la hipótesis que será el foco de la investigación, los objetivos generales y específicos que se desean lograr, y la estructura de cómo se presentará el documento.

Capítulo 2: Este capítulo presenta una revisión bibliográfica de los componentes que afectan al desarrollo del tema tratado en esta memoria. Se comienza por definir y describir los elementos para la conformación del hormigón bio-reparable. Se habla sobre diferentes formas de auto-reparación y se describe detalladamente la que se realiza con bacterias, para lo cual se muestra el estado del arte de las principales investigaciones halladas en la literatura y se describen las teorías necesarias para comprender el fenómeno que se expone.

Capítulo 3: Muestra las bases del trabajo experimental, describiendo las variables y el orden que se seguirá para estudiarlas.

Capítulo 4: Se describe la metodología para el trabajo experimental en lo que respecta a la manipulación de la bacteria. En este capítulo se expone acerca del cultivo y posterior protección de la bacteria, además del método para corroborar su viabilidad.

Capítulo 5: Este capítulo expone la metodología para la segunda fase del trabajo experimental, la cual contempla la fabricación del hormigón y posterior agrietamiento de las probetas confeccionadas. Se detallan los materiales y equipos utilizados, los ensayos y los análisis que se realizan para obtener los resultados.

Capítulo 6: Se presentan los resultados obtenidos luego de concluir la fase experimental. Se comparan los resultados de la resistencia a compresión del hormigón con y sin el agente de auto-reparación en cemento Portland. Además se muestran los resultados de la auto-reparación mediante el análisis visual y el análisis de difracción de rayos X.

Capítulo 7: En el último capítulo se exponen las conclusiones de la memoria y se plantean las recomendaciones para los estudios futuros que sigan con esta línea de investigación.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA Y TEORÍA

2.1 COMPONENTES DEL HORMIGÓN AUTO-REPARABLE

A continuación se describe los componentes del hormigón en general, y el factor microbiológico que se adiciona para que sea un hormigón auto-reparable.

2.1.1 HORMIGÓN

Es el material que resulta de la mezcla de agua, áridos (arena y grava), cemento, eventualmente aditivos y adiciones, en proporciones adecuadas que, al fraguar y endurecer, adquieren resistencia (NCh170)

La unión en particular del cemento y el agua se denominan pasta de cemento y constituye el aglomerante activo del hormigón. Al momento de conformarse, comienza un proceso físico-químico que comienza a rigidizarse progresivamente hasta constituirse un sólido de creciente dureza y resistencia.

2.1.2 CEMENTO Y TIPOS

El cemento es un material pulverizado, que por adición de una cantidad conveniente de agua forma una pasta conglomerante capaz de endurecer tanto bajo el agua como en el aire. Las partículas de cemento pueden variar su tamaño entre 10 a 0.5 μm (Chatterji, 2003).

Los tipos de cementos investigados en este trabajo corresponden a los Portland y Puzolánico.

El cemento Portland es el producto que de la molienda conjunta de clínquer y yeso y que puede aceptar hasta un 3% de materias extrañas, excluido el sulfato de calcio hidratado.

El cemento puzolánico es el producto de la molienda de clínquer, puzolana y yeso, y está subdividido en Portland puzolánico, si la puzolana incorporada es menor a un 30%, y Puzolánico, si se incorpora entre el 30 y el 50% del peso del producto terminado. La puzolana es un material silíceo-aluminoso que aunque no tiene propiedades aglomerantes por sí solo, las desarrolla cuando está finamente dividido y en presencia de agua, por reacción química con el hidróxido de calcio a la temperatura ambiente (Nch 148 Of 168, 1998).

2.1.3 ÁRIDOS

Los áridos son un material pétreo compuesto de partículas duras de forma y tamaño estables.

Los áridos ocupan entre un 65 y 75% del volumen total del hormigón, y sus funciones en él son: Entregar docilidad al hormigón fresco, aumentar la durabilidad de las estructuras, darle resistencia al hormigón endurecido, reducir el costo de las mezclas (ya que permite reducir la proporción de mortero y por lo tanto el cemento), y formar de un esqueleto rígido que reducirá variaciones de volumen.

En esta investigación, al utilizarse el hormigón para fabricar probetas de laboratorio, se usó solamente árido fino (arena) y árido liviano de protección para las bacterias.

2.1.3.1 ARENA

Corresponde al árido fino que pasa por el tamiz de abertura nominal de 5 mm y es retenido en el de 0,080 mm (NCh 163.Of79).

2.1.3.2 ARCILLA EXPANDIDA

Consiste en un tipo de árido liviano fabricado a partir de trozos de arcilla calentados en un horno rotativo a aproximadamente 1200°C, los gases resultantes expanden el volumen de la pieza disminuyendo su densidad y formando este árido cerámico.

Este árido se emplea en la mezcla del hormigón para obtener un material ligero, con buena aislación térmica (BORSI, 2001). Y se ha utilizado particularmente para producir el curado interno del hormigón, el cual mejora la hidratación, disminuye la contracción autógena y mitiga el agrietamiento a edades tempranas. Estas características se deben a su estructura interna porosa, que lo lleva a tener un alto índice de absorción (Paul & Lopez, 2011).

2.1.4 AGENTE DE AUTOREPARACIÓN

El agente de auto-reparación es el factor adicionado al material, para causar el efecto de auto-reparación. En el caso del hormigón existen distintos tipos de agentes que han podido demostrar su factibilidad: aditivos minerales, agentes adhesivos, y agentes biológicos, y cada uno deberá tener un mecanismo adecuado para su incorporación, con el fin de no perjudicar las propiedades del hormigón y de mantenerse resguardado del ambiente hasta el momento de la generación de la fisura.

Para el desarrollo de esta investigación se utilizó un agente de auto-reparación biológico el cual consiste en arcilla expandida impregnada con una solución conformada por una bacteria capaz de metabolizar carbonato de calcio (*Bacillus Pseudofirmus*), una fuente de calcio para la bacteria (lactato de Calcio) y un agente nutritivo para la bacteria (extracto de levadura).

2.1.5 BACTERIA

Las bacterias son microorganismos procariotas, es decir no tienen un núcleo celular diferenciado mediante una membrana, por lo que su material genético se distribuye libremente por todo el citoplasma. Tienen un tamaño que puede ir entre 0.5 y 5 μm de longitud y puede presentar diversas formas: filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos) (Tortora, Funke, & Case, 2007).

Según la estructura de su envoltura celular pueden clasificarse en grampositivas y gramnegativas. La envoltura celular de las bacterias grampositivas comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano que rodea a la anterior. La pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido lipoteicoico. La capa de peptidoglicano confiere una gran resistencia a estas bacterias y es la responsable de retener el tinte durante la tinción de Gram (Sección 4.2.4). Las gramnegativas en cambio, presentan una segunda membrana lipídica externa a la pared celular y su capa de peptidoglicano es mucho más delgada (Figura 2-1).

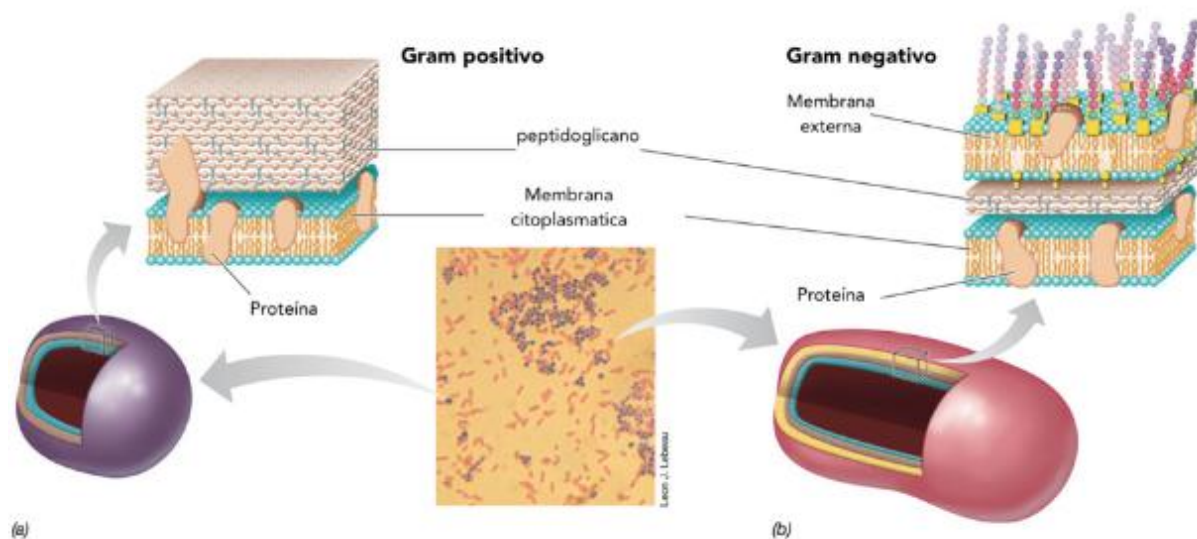


Figura 2 - 1: Esquema de la pared celular de las bacterias grampositivas y gramnegativas (Madigan, et al., 2014).

Ambas envolturas o paredes celulares tienen una carga electronegativa total. Las paredes celulares grampositivas al tener gran cantidad de peptidoglicano se unen a los denominados polímeros secundarios, aumentando la densidad de carga electronegativa de la pared, lo que junto con la adición de más grupos COO^- o fosfato, resulta finalmente en una envoltura celular altamente interactiva con los iones metálicos disueltos. Como resultado, es extremadamente robusta y resistente a diversas y duras condiciones ambientales. La pared celular gramnegativa tienen menos cantidad de peptidoglicano y carece de polímeros secundarios, pero su capa más externa está salpicada con un lípido lipopolisacárido (LPS), que es altamente aniónico, debido a esto, las superficies gramnegativas también son fuertemente electronegativas y pueden interactuar con los iones metálicos disueltos (Schultze-Lam, Fortin, Davis, & Beveridge, 1996).

La incorporación de una bacteria en el hormigón es el componente fundamental para lograr el hormigón auto-reparable que se presenta en esta investigación. La forma en que intervine la bacteria se expone en la siguiente sección, la metodología para incluirla en la mezcla se trata en el capítulo 3.

2.2 ASPECTOS GENERALES DE LA AUTO-REPARACIÓN DE MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN

Existe una amplia gama de materiales biológicos que tienen la capacidad de regenerarse y volver a su funcionalidad. Tal es el caso que vemos en la salamandra que puede regenerar su cola cuando la pierde, o la fusión de nuestros propios huesos cuando se rompen. La mayoría de los materiales contruidos por el ser humano no tienen dicha habilidad, sino que sigue el paradigma de reparar el daño en vez de gestionarlo previamente. Sin embargo, y siguiendo el ejemplo de la naturaleza, se han ido desarrollando tecnologías para generar la capacidad de auto-repararse en distintos materiales, inclusive aquellos que se usan el área de la construcción. Esto representa una gran ventaja dado que las grietas u otros deterioros en los materiales son difíciles de detectar en una etapa temprana, y se requiere intervención manual para las inspecciones y reparaciones.

En otras palabras, un material autorreparable es aquel que es capaz de recuperar alguna de sus propiedades, ya sea de manera autónoma, mediante la reacción con el medio ambiente, o de manera asistida mediante una intervención menor del ser humano.

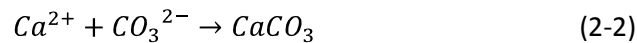
Para el caso particular del hormigón autorreparable, éste será capaz de contrarrestar la degradación mediante el inicio de un mecanismo de reparación que responde al micro daño (fisuras).

Al ser éste un material de gran interés, se han estudiado variadas formas de hacerlo.

2.2.1 AUTOREPARACIÓN AUTÓGENA DEL HORMIGÓN

La auto-reparación autógena se refiere a la capacidad de sellar o rellenar las grietas y poros del hormigón de manera espontánea, sin intervención humana previa ni posterior, es decir es una cualidad inherente del hormigón. Se produce mediante la hidratación de las partículas de cemento no hidratadas en la fase de curado, por el bloqueo de la trayectoria de flujo por las impurezas del agua y debido a la formación de cristales de calcita (Huang, Ye, Qian, & Schlangen, 2016).

Este mecanismo se produce cuando el CO_2 del aire se disuelve en el agua (Ecuación 2-1) y los iones de CO_3^{2-} se difunden por las grietas. Luego, si existen concentraciones saturadas de estos iones y del Ca^{2+} contenido en el cemento, se genera la reacción y precipita el carbonato de calcio o calcita (CaCO_3), lo que finalmente sella la grieta (Ecuación 2-2).



Se puede observar este fenómeno en la Figura 2-1.

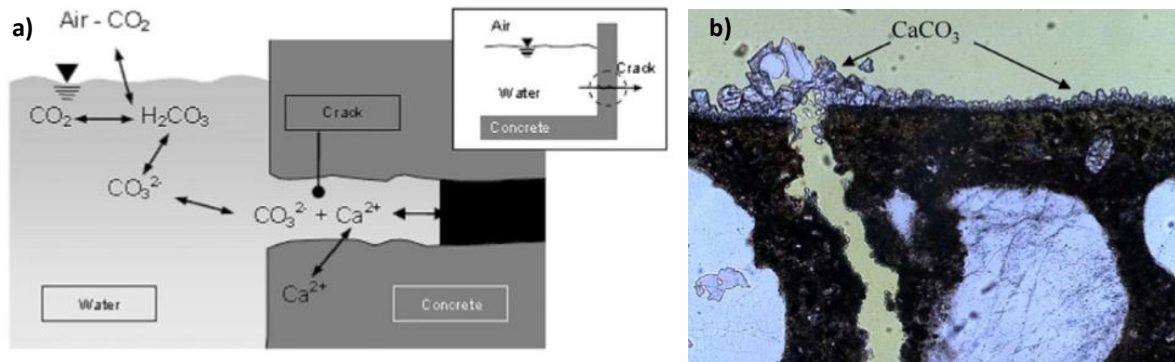


Figura 2 - 2: a) Auto-reparación autógena debido a la precipitación del carbonato de calcio en presencia de agua y CO_2 disuelto. b) Precipitación de CaCO_3 encontrada en la superficie de la grieta (Mihashi & Nishiwaki, 2012).

Se ha observado con este mecanismo, que el CaCO_3 precipita en la parte más superficial de la grieta, por lo que esta no se rellena totalmente.

2.2.2 AUTO-REPARACIÓN BASADA EN ADITIVOS MINERALES

Consiste en incluir, en la etapa de mezclado del hormigón, aditivos minerales, que al quedar expuestos cuando se producen grietas, reaccionan con el agua y logran rellenarlas.

Estos aditivos pueden ser de tipo expansivos o de cristalización. Los primeros reaccionan con el agua aumentando su volumen, mientras que el segundo grupo, contiene sílice y algunos cristales catalizadores que reaccionan con la portlandita (Ca(OH)_2) formando cristales.

La auto-reparación mediante aditivos minerales ha resultado bastante beneficiosa, además de disminuir la permeabilidad y ser bastante rápida (días). Sin embargo, si no se protegen los aditivos al momento de realizar la mezcla, estos comienzan a reaccionar inmediatamente y se consumen antes del agrietamiento, por lo que deben ser encapsulados previamente. Además, el mecanismo requiere que la grieta tenga agua disponible continuamente.

2.2.3 AUTO-REPARACIÓN BASADA EN AGENTES ADHESIVOS

Se utiliza un agente adhesivo que se endurece en las grietas y conecta ambas superficies de éstas. Puede realizarse con un componente o varios componentes simultáneamente que se encuentran encapsulados y reaccionan cuando son interceptados por la grieta. Entre los agentes usados se encuentra el Epoxi, metacrilato de metilo, cianoacrilato, silicio y el aceite de madera (Tung).

2.3 AUTO-REPARACIÓN DEL HORMIGÓN CON BACTERIAS

Este mecanismo de auto-reparación se basa en la utilización de una bacteria que mediante su proceso metabólico es capaz de inducir la precipitación de carbonato de calcio (CaCO_3) para sellar microgrietas.

La formación de minerales a partir de organismos es un fenómeno que aparece de manera frecuente en la naturaleza, principalmente en el agua de mar, agua dulce y suelos, y se produce por las actividades metabólicas básicas de los microorganismos (Hammes & Verstraete, 2002).

En el caso de la formación de carbonato de calcio mediante bacterias, se pueden distinguir diferentes procesos para que ocurra.

Para comprender mejor el sellado de las grietas y la acción de la bacteria, en esta sección se describe qué es lo que rellena la grieta, y teóricamente cuáles son los procesos que podrían explicar el fenómeno.

2.3.1 FORMACIÓN DE CRISTALES

La teoría respecto a la formación de cristales, habla sobre dos etapas: nucleación y crecimiento de cristales mediante capas monomoleculares alrededor del germen de cristalización o núcleo. Las nuevas capas se van adhiriendo en la cara donde su adhesión libera más energía. Las diferencias energéticas suelen ser pequeñas y pueden ser modificadas por la presencia de impurezas o cambiando las condiciones de temperatura y presión (Elwell & Scheel, 1975).

Para que ocurra la cristalización es necesario que el sistema esté sobresaturado (σ), es decir el producto iónico (P.I.), que se refiere a la multiplicación de las concentraciones de cada ion del soluto (ecuación 2-3), es mayor que el valor de la constante de solubilidad (K_{ps}). Las ecuaciones (2-4,2-5,2-6) presentan los posibles escenarios.

$$P.I. = A^- B^+ \quad (2-3)$$

$$K_{ps} < A^- B^+ \rightarrow \text{Sobresaturado} - \text{Precipitación} \quad (2-4)$$

$$K_{ps} = A^- B^+ \rightarrow \text{Equilibrio} - \text{Saturación} \quad (2-5)$$

$$K_{ps} > A^- B^+ \rightarrow \text{Disolución} \quad (2-6)$$

Sin embargo, la condición de sobresaturado no es suficiente para que un sistema comience a cristalizar, deben existir ciertos embriones, núcleos o semillas como centros de cristalización (nucleación) (Diaz, 2009).

La mayoría de los sitios de nucleación no alcanzan el estado cristalino porque en una solución saturada existe también una tendencia de los núcleos a regresar a la solución (se re-disuelven) esto debido al hecho de que estos pequeños núcleos tienen un área superficial muy grande con

respecto a su volumen, lo que implica que existan muchos átomos (sobre la superficie externa del pre-cristal) con los enlaces químicos no compensados, lo que lo hace más soluble que un cristal de gran volumen en que la mayor parte de sus átomos son internos y con sus enlaces químicos completamente compensados. Es por esto que para que el núcleo no se disuelva debe alcanzar un radio superior al radio crítico, siendo el radio crítico el límite entre el tamaño del área superficial y el volumen, por lo tanto necesita que crezca con una rapidez tal de reducir su energía superficial, y que alcance un tamaño estable (Klein & Hurlbut, 1996).

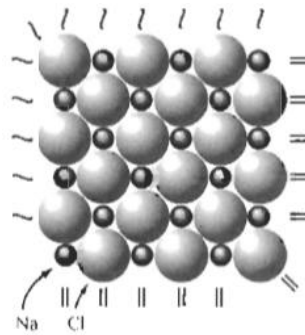


Figura 2 - 4: Sección a través de un vértice de un cristal de NaCl mostrando iones perfectamente enlazados y empaquetados en la parte interna del cristal y enlaces no compensados en la superficie externa (~ representa enlaces químicos no compensados y = enlaces químicos compensados) (Klein & Hurlbut, 1996).

Las fuerzas que actúan sobre estos núcleos son de dos tipos: atractivas y repulsivas. Las atractivas, resultan de la interacción entre las partículas que forman al núcleo y tienden a mantenerlo unido, son proporcionales al número de enlaces compartidos y por lo tanto a su volumen. Las repulsivas son el resultado de la interacción del núcleo con el solvente y tenderán a disolverlo, por lo que son proporcionales al número de enlaces libres y en consecuencia a la superficie del núcleo. Para que el núcleo sea estable las fuerzas atractivas deben predominar sobre las repulsivas. El tamaño crítico de estabilidad del núcleo ocurrirá cuando ambas fuerzas sean iguales.

Se puede definir si un proceso es energéticamente favorable para la formación de cristales según la diferencia de energía libre de Gibbs (ΔG) (Elwell & Scheel, 1975). Una agrupación de n átomos para conformar la nueva fase viene dada por la expresión (2-7).

$$\Delta G = \frac{4\pi r^3}{3v} kT \ln S + 4\pi r^2 \gamma \quad (2-7)$$

Donde r : radio del núcleo, v : volumen molecular, k : constante de Boltzman, γ : tensión superficial y S : sobresaturación.

El máximo valor para r estará definido por la ecuación de Gibbs-Thomson (2-8).

$$r^* = \frac{2v\gamma}{kT \ln S} \quad (2-8)$$

A medida que aumenta la sobresaturación en un sistema disminuye el radio crítico necesario para que el núcleo sea estable, y por lo tanto la nucleación se ve favorecida.

El proceso de formación de los núcleos se clasifica en dos tipos; la nucleación primaria u homogénea, que está referida a todos los procesos en el cual el sistema no presenta cristales y ocurre en el interior de una sustancia uniforme, y la nucleación secundaria o heterogénea, que es generada en un sistema sobresaturado, y se presenta cuando la solidificación se da sobre la superficie de algún material sumergido, o algunas impurezas insolubles, esto debido a que disminuyen la energía libre requerida para formar un núcleo estable.

El caso de la precipitación de cristales de carbonato de calcio corresponde a una nucleación heterogénea sobre la pared de la célula bacteriana una vez que se ha alcanzado la sobresaturación del sistema (Páramo, Narváez, & Ortega, 2015).

Cuando ya se ha conformado el núcleo estable, es decir con un radio superior al crítico, el cristal necesita el continuo aporte de iones y su subsecuente incorporación a los sitios de la cara en crecimiento. Según el modelo clásico de crecimiento cristalino para un cristal que tiene una fase plana con un escalón, los iones se moverán a la superficie del cristal y luego se difundirán hacia los sitios de incorporación o pliegues ya que un átomo que ingrese a tal pliegue será capaz de formar enlaces vecinos más cercanos con tres átomos en el cristal (Elwell & Scheel, 1975). Esto se puede observar en la Figura 2-3, donde el ión que se incorporará está representado por un cubo (ad atom), éste puede incorporarse al pliegue (kink) o en un sitio de la capa inferior (vacancy).

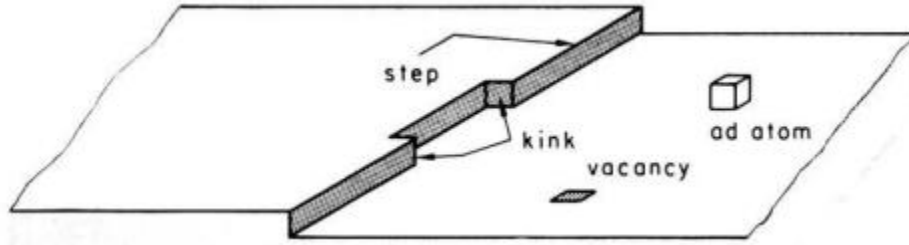


Figura 2 - 5: Modelo idealizado de superficie de cristal plana (Elwell & Scheel, 1975).

Si un cristal que tiene una interfaz escalonada y está en contacto con una solución sobresaturada, se puede considerar que el proceso de crecimiento ocurre en las siguientes etapas (Figura 2-4).

- (i) Transporte de soluto al vecindario de la superficie del cristal.
- (ii) Difusión a través de una capa límite, adyacente a la superficie, en la que existe un gradiente en la concentración de soluto debido al agotamiento del material en la interfaz de solución de cristal.
- (iii) Adsorción en la superficie del cristal.
- (iv) Difusión sobre la superficie.
- (v) Adjunto a un paso.
- (vi) Difusión a lo largo del paso.
- (vii) Integración en el cristal en un pliegue.

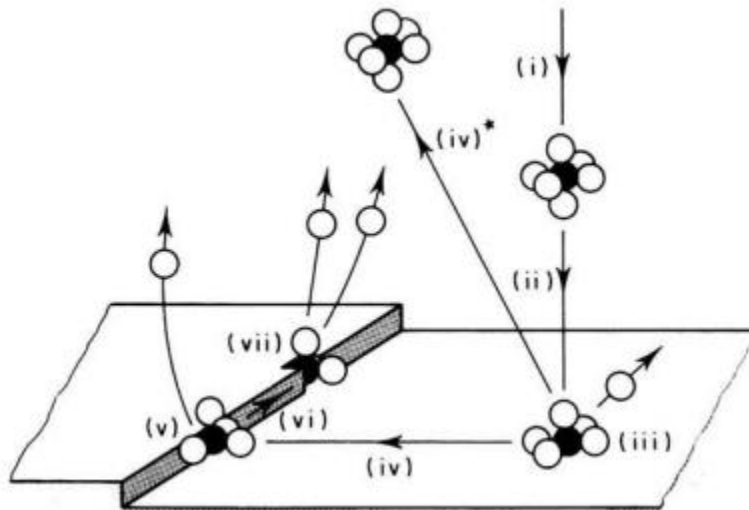


Figura 2 - 6: Etapas en el crecimiento del cristal de la solución (Elwell & Scheel, 1975).

Finalmente el cese del crecimiento ocurre cuando caen los niveles de sobresaturación o por una acumulación de defectos en la superficie del cristal debido a la incorporación de impurezas.

Este estudio se basa en el aprovechamiento de los cristales de carbonato de calcio para conseguir la auto-reparación del hormigón. El carbonato de calcio es uno de los minerales más abundantes que podemos encontrar en los seres vivos, y es posible identificar en su formación cinco polimorfos, es decir que tienen la misma molécula pero en diferente ordenamiento. Tres de ellos son formas cristalinas no hidratadas; calcita, aragonita y vaterita; y dos son hidratadas; el carbonato de calcio hexahidratado ($\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y monohidratado ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

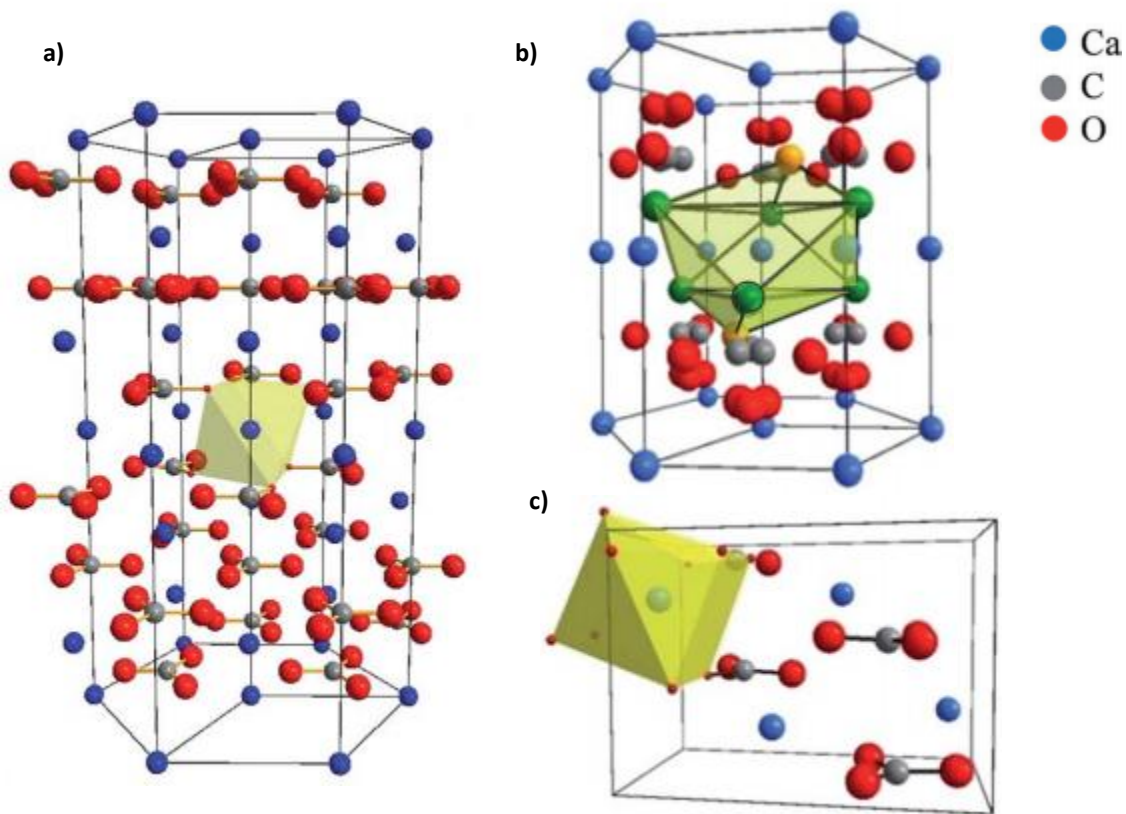


Figura 2 - 7: Células estructurales que corresponden a los polimorfos a) Calcita, b) Vaterita y c) Aragonita (Blanco-Gutierrez, et al., 2014).

2.3.2 BIOMINERALIZACIÓN

La biomineralización es el estudio de los procesos que conducen a la conformación de materiales minerales producidos por organismos vivos. Tal es el caso de conchas, huesos, dientes, e incluso

cálculos renales. Estas estructuras orgánicas-inorgánicas se producen por una extracción selectiva y absorción de iones del ambiente llegando a tener un alto grado de organización (Mann, 2001).

Se pueden distinguir dos procesos fundamentalmente diferentes en la biomineralización. El primero se puede observar en numerosos animales, y es un proceso controlado por una matriz orgánica, es decir el organismo construye un marco orgánico o molde en el cual se introducen activamente los iones apropiados y luego se los induce a cristalizar y crecer. El tipo de mineral, la orientación de los ejes cristalográficos y la micro-arquitectura están determinados genéticamente. El segundo proceso básico de formación de minerales se atribuye a algunas especies bacterianas y diversas algas verdes y pardas, y se caracteriza por la formación de minerales extracelulares y / o intercelulares a granel, sin la elaboración de matrices orgánicas (Lowenstam & Weiner, 1981).

En particular las bacterias, son los seres vivos que más tipos de biominerales pueden producir, siendo capaces de originar más de 60 fases minerales distintas. Dado su pequeño volumen, un grupo de bacterias tiene la relación más alta de área superficial/volumen que cualquier otro grupo de organismos, por lo que en presencia de grupos químicos cargados en la superficie de sus células, tienen una potente capacidad de nucleación mineral.

Los factores que rigen a los procesos de cristalización, se aplican a los procesos de la biomineralización, sin embargo ésta se regula de cierto modo por los organismos que la generan, en el caso de esta investigación por la participación de bacterias.

2.3.3 BIOMIMETISMO

El biomimetismo es la ciencia que busca imitar procesos químicos y/o mecánicos de la naturaleza para integrarlos a las nuevas tecnologías y entregar soluciones a problemas que la naturaleza ya ha resuelto (Benyus, 1997).

El biomimetismo en este contexto busca la simulación de la biomineralización, utilizando los mecanismos de la biomineralización para lograr materiales con una estructura y función específica. Los materiales tradicionales de ingeniería son estáticos, a diferencia de los materiales biológicos que van evolucionando para responder y adaptarse al ambiente. Un hueso, por ejemplo, al fracturarse puede formar un coágulo de sangre, que posteriormente se convertirá en un callo cartilaginoso, más tarde se someterá a revascularización y calcificación, y finalmente se remodelará, restaurando su funcionalidad ósea (Marsell & Einhorn, 2011). Esta clase de

fenómenos han inspirado la fabricación de materiales inteligentes dentro de la ingeniería, como lo es el hormigón auto-reparable (Sección 2.2).

2.3.4 PRECIPITACIÓN DE CALCITA MEDIANTE LA ACCION BACTERIANA

Vías para la biomineralización de carbonato de calcio

Los procesos para la formación de carbonato de calcio mediante organismos vivos pueden seguir diferentes caminos. En primer lugar se diferencia una vía autótrofa y una heterótrofa. La vía autótrofa corresponde a aquellos microorganismos que captan la energía de la radiación luminosa (fotosintetizantes), y usan CO_2 como fuente de carbono, por lo tanto inducen la reducción de CO_2 del entorno inmediato de las bacterias. Cuando existe presencia de iones de calcio en el medio, tal agotamiento favorece la precipitación de carbonato de calcio.

En la vía heterótrofa pueden ocurrir dos procesos bacterianos, una precipitación pasiva y una activa. La precipitación pasiva o carbonatogénesis pasiva funciona produciendo iones de carbonato y bicarbonato e induciendo varias modificaciones químicas en el medio que conducen a la precipitación de carbonato de calcio. Éste proceso es inducido por dos ciclos metabólicos: ciclo del nitrógeno (amonificación de aminoácidos, degradación de urea y ácido úrico, y reducción disimilatoria de nitratos) y del ciclo del azufre (reducción disimilatoria de sulfatos).

En la precipitación activa o carbonatogénesis activa las partículas de carbonato se producen mediante intercambios iónicos a través de la membrana celular siguiendo mecanismos aún poco conocidos.

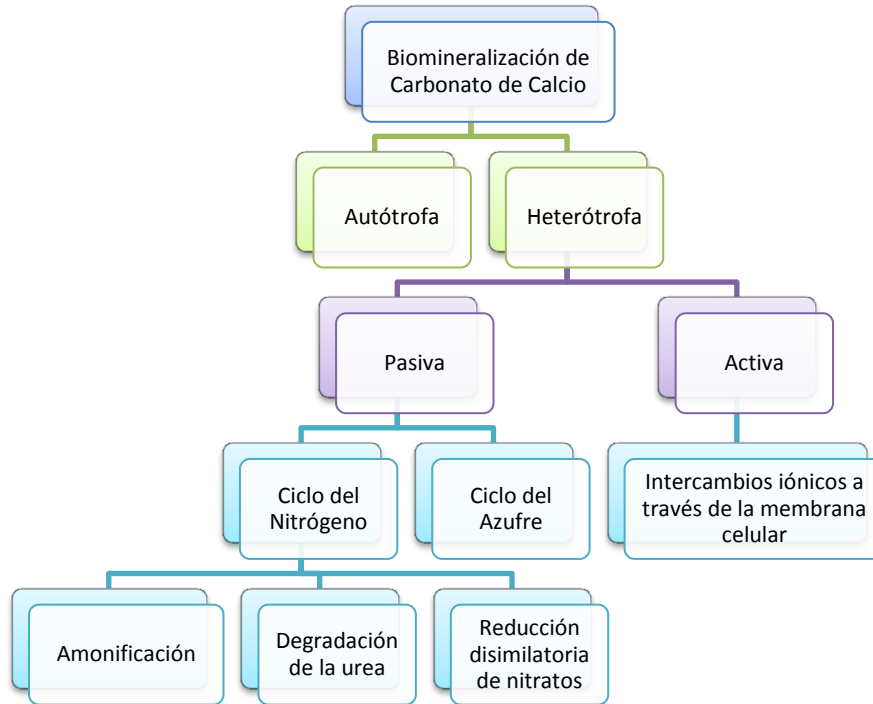


Figura 2 - 8: Esquema sobre las vías para la producción de carbonato de calcio (Hammes & Verstraete, 2002).

Al existir la posibilidad de precipitar carbonato de calcio mediante cualquiera de estas vías supondría que todas las bacterias serían capaces de inducirlo por alguno de estos caminos. El camino seguido por la bacteria utilizada en esta investigación no se conoce con certeza, pero según lo descrito se atribuye a una biomineralización heterótrofa activa.

Descripción del procedimiento para la biomineralización de carbonato de calcio

La precipitación de carbonato de calcio sería la respuesta de las bacterias cuando se encuentran en un medio enriquecido. Los primeros productos sólidos van recubriendo la superficie de los cuerpos bacterianos y se fusionan hasta formar un revestimiento rígido. Todas estas pequeñas partículas se ensamblan formando estructuras "precristalinas". Estas estructuras van creciendo y progresivamente muestran estructuras cristalinas. (Castanier, Le Métayer-Levrel, & Perthuisot, 1999).

Para que se logre la precipitación de calcita para la auto-reparación del hormigón se necesita la relación de cuatro factores fundamentales (Kile, Eberl, & Hoch, 2000)

- Concentración de cationes de calcio en el medio (Ca^{2+})
- Concentración disuelta de carbono inorgánico (DIC)
- pH

- Disponibilidad de los sitios de nucleación.

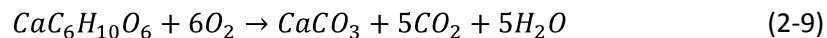
La concentración de calcio será un factor entregado por el medio a la bacteria, mientras que la capacidad de crear un ambiente alcalino (alto pH y aumento de DIC) es un factor que se ha podido atribuir a las bacterias a través de diversas actividades fisiológicas (Castanier, Le Métayer-Levrel, & Perthuisot, 1999). El hormigón de por sí es un alcalinizante, lo que favorecería el proceso.

El rol de las bacterias como sitio de nucleación hace referencia a su capacidad para ser el inicio de la separación de fases en un sistema que se ha sobresaturado y con esto comenzar el proceso de cristalización. Se describe la nucleación en la sección 2.3.1.

Como resultado de un bajo número de Reynolds¹, las bacterias están rodeadas por una delgada capa acuosa, que crea físicamente un microambiente. Esto forma una interfaz entre la célula bacteriana y el entorno exterior, en la que pueden prevalecer diferentes concentraciones de protones (pH), DIC y Ca²⁺ (Hammes & Verstraete, 2002). Unido a la naturaleza electronegativa de las membranas celulares (posibles sitios de nucleación de cristal), este puede crear un entorno de precipitación (Schultze-Lam, Fortin, Davis, & Beveridge, 1996).

Reacciones químicas para la biomineralización de carbonato de calcio (Jonkers, Thijssen, Muyzer, Copuroglu, & Schlangen, 2010)

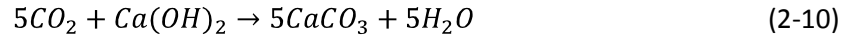
Como se mencionó, dentro de los 4 factores es necesaria cierta cantidad de cationes de calcio en el medio. La fuente de calcio proporcionada para este estudio consistió en el lactato de calcio (CaC₆H₁₀O₆). La conversión metabólica bacteriana del lactato de calcio ocurre de acuerdo a la siguiente reacción (2-9)



Una molécula de lactato de calcio (CaC₆H₁₀O₆) reacciona con 6 moléculas de oxígeno (O₂), lo que produce una molécula de carbonato de calcio (CaCO₃), 5 moléculas de dióxido de carbono (CO₂) y 5 de agua (H₂O).

¹ Parámetro adimensional que combina una longitud de escala, una velocidad de escala y la velocidad cinemática. Si el Número de Reynolds es relativamente pequeño, el flujo es laminar, si es grande, el flujo es turbulento (Potter & Wiggert, 2003).

Las moléculas de CO_2 producidas son capaces de reaccionar con el hidróxido del calcio ($Ca(OH)_2$) aportado por el cemento y formar mayor cantidad de $CaCO_3$ junto con moléculas de agua (2-10).



Aunque la precipitación del carbonato de calcio se ha investigado extensamente tanto en entornos naturales como en laboratorios definidos condiciones, los mecanismos exactos de precipitación permanecen sin resolver.

2.3.5 BACTERIA *BACILLUS PSEUDOFIRMUS*

Se ha observado la capacidad de precipitar carbonato de calcio en varias bacterias del tipo bacilo. Para este estudio se utilizó la bacteria *Bacillus Pseudofirmus*, que corresponde a una anaerobia facultativa, es decir, puede desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, del tipo grampositivo, lo que indica que su envoltura celular comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglucano, la que a su vez les confiere una gran resistencia.

Las colonias que forma son amarillas y redondas con márgenes irregulares. Las células tienen forma de barra, produciendo esporas ovaladas. Las cepas muestran un crecimiento cuando se encuentran a temperaturas entre de 10 a 45 ° C. (Nielsen, Fritze, & Priest, 1995).

Dentro de las ventajas que otorga este tipo de microorganismo para resistir el proceso de fabricación del hormigón se encuentra su capacidad formadora de endosporas y su tolerancia a ambientes alcalinos. Crece en un rango de pH de 7.5 a 11.4 y puede resistir grandes aumentos repentinos en el pH externo (B. Janto, 2011).

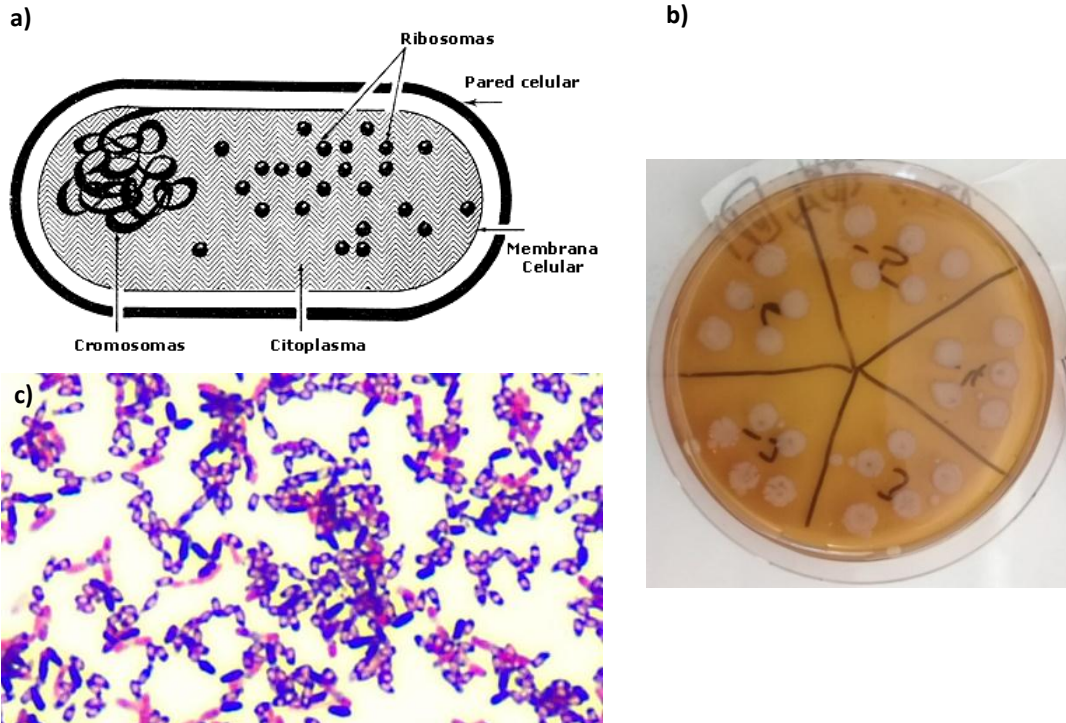


Figura 2 - 9: a) Esquema de una célula bacteriana b) Colonias de la bacteria en placa c) Bacterias luego de tinción gram.

2.4 FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO DEL HORMIGÓN AUTO-REPARABLE

Durante los últimos años ha incrementado el interés por la aplicación de un hormigón auto-reparable, por lo que las investigaciones al respecto han tenido un gran auge (Figura 2-10).

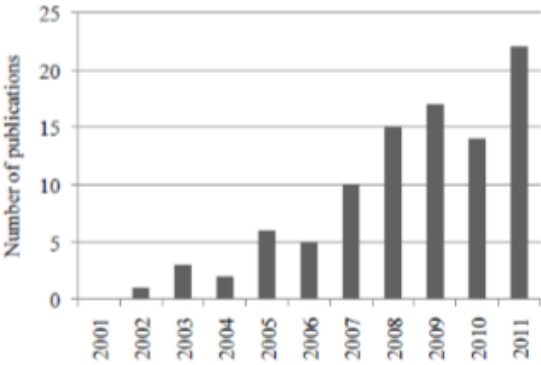


Figura 2 - 10: Número de publicaciones referidas a la auto-reparación del hormigón (Ubeda, 2014).

Dentro de esta estadística se encuentra la auto-reparación por medio de bacterias, la que cada vez gana más terreno dado los resultados que se ha ido mostrando. Universidades de China, India,

Holanda, Alemania, Estados Unidos han realizado diferentes estudios sobre el tema, sin embargo, al utilizar cada autor diferentes métodos experimentales y de análisis, resulta difícil estandarizar respecto de cuál es el mejor procedimiento y cuál es la mejor bacteria para la auto-reparación.

A continuación se presentan algunos de los factores más relevantes a considerar para definir los parámetros usados en esta investigación.

2.4.1 CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS

No se ha definido claramente, la cantidad óptima de bacterias que se deben insertar en la mezcla. Según algunos autores con altas concentraciones de bacterias (6×10^8 esporas por cm^3 de hormigón) la resistencia a la compresión puede disminuir hasta en un 10%, lo cual traería más desventajas que beneficios a la aplicación de bacterias en el hormigón (Jonkers & Schlangen, 2008).

En un estudio realizado por la Universidad de Juárez, México, la mayor resistencia a la compresión utilizando diferentes concentraciones de bacterias se logró con 10^5 células por ml de agua total utilizada en la mezcla, con un aumento de 18.83% con respecto a las probetas de control. (Narayanasamy, Alvarado, & Sanchez). Sin embargo, se desconoce la eficacia de la auto-reparación versus las diferentes concentraciones de bacterias.

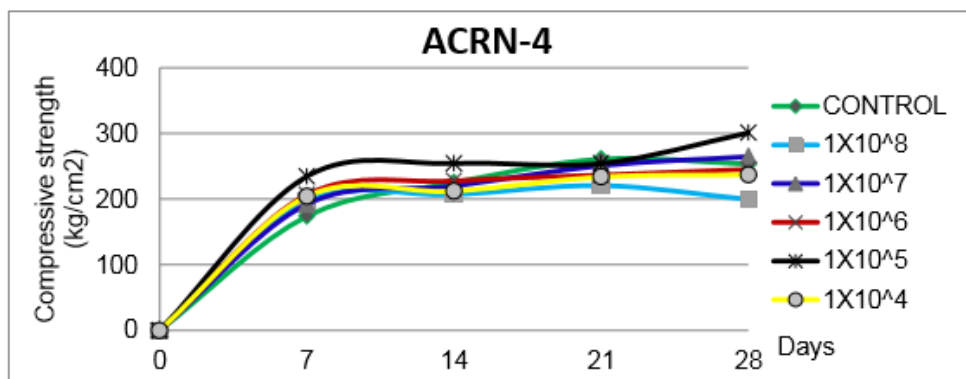


Figura 2 - 11: Resistencia a la compresión de cubos de mortero de cemento en relación con diferentes concentraciones de células de la cepa bacteriana ACRN 4.

Estudios más recientes han mostrado un incremento en la resistencia a la compresión en diferentes tipos de bacterias con concentraciones elevadas. En la [Tabla 2-1](#) se muestran varios tipos de bacterias, las concentraciones usadas y los resultados para la resistencia a la compresión.

Bacteria used	Best results	Bacterial concentration
Bacillus sp. CT-5	Compressive strength 40% more than the control concrete	5×10^7 cells/mm ³
Bacillus megaterium	Maximum rate of strength development was 24% achieved in highest grade of concrete 50 Mpa	30×10^5 cfu/ml
Bacillus subtilis	Improvement of 12% in compressive strength as compared to controlled concrete specimens with light weight aggregates	2.8×10^8 cells/ml
Bacillus aerius	Increase in compressive strength by 11.8% in bacterial concrete compared to control with 10% dosage of RHA	10^5 cells/ml
Sporosarcina pasteurii	Compressive strength 35% more than the control concrete	10^5 cells/ml
AKKR5	10% increase in compressive strength as compared to control concrete	10^5 cells/ml
Shewanella Species	25% increase in compressive strength of cement mortar compared with the control mortar	100,000 cells/ml

Tabla 2 - 1: Varios tipos de bacterias y sus resultados de resistencia a la compresión (Kunamineni, et al., 2017).

En todos los resultados de la Tabla 2-1 se ven mejoras de la resistencia a la compresión, sin embargo, en ninguno se utiliza el método de protección de las bacterias por medio de impregnación en arcilla expandida.

Los estudios de la Universidad de Ghent revelaron que la concentración de bacterias debería ser superior a 10^6 células/ml para obtener una cantidad considerable de precipitación de carbonato de calcio (Tziviloglou, y otros, 2016). En algunas investigaciones de esta universidad, sí se utilizó arcilla expandida para proteger a las bacterias por lo que este será el parámetro considerado para este estudio.

2.4.2 FUENTE DE CALCIO

Como se mostró en la reacción (2-9), es necesaria la incorporación de calcio en el ambiente de la bacteria para que se produzca la oxidación² del carbono.

Las fuentes de calcio utilizadas para la auto-reparación del hormigón con bacterias son bastante variadas; se puede encontrar autores que utilizan alginato ($(C_{12}H_{14}CaO_{12})_n$), acetato ($C_4H_6O_4Ca$), lactato ($CaC_6H_{10}O_6$), formiato ($Ca(HCOO)_2$) y nitrato de calcio ($Ca(NO_3)_2$).

Se ha comparado el agente de auto-reparación preparado con bacterias y tres diferentes fuentes de calcio: lactato, formiato y nitrato de calcio (Luo & Qian, 2016). Se observó que el agente con lactato podría retrasar la hidratación del cemento, lo que daría como resultado un aumento en el tiempo de fraguado final; en cambio, los agentes de auto-reparación con formiato y nitrato hubo

² Una reacción de oxidación disminuye el número de enlaces C—H, o aumenta el número de enlaces C—O (Yurkanis Bruce, 2007)

una aceleraron la hidratación. Además, al evaluar la resistencia a la compresión se observó que esta depende no solo de la fuente de calcio, sino también de la cantidad de agente que tenga en relación a la mezcla (Figura 2-11).

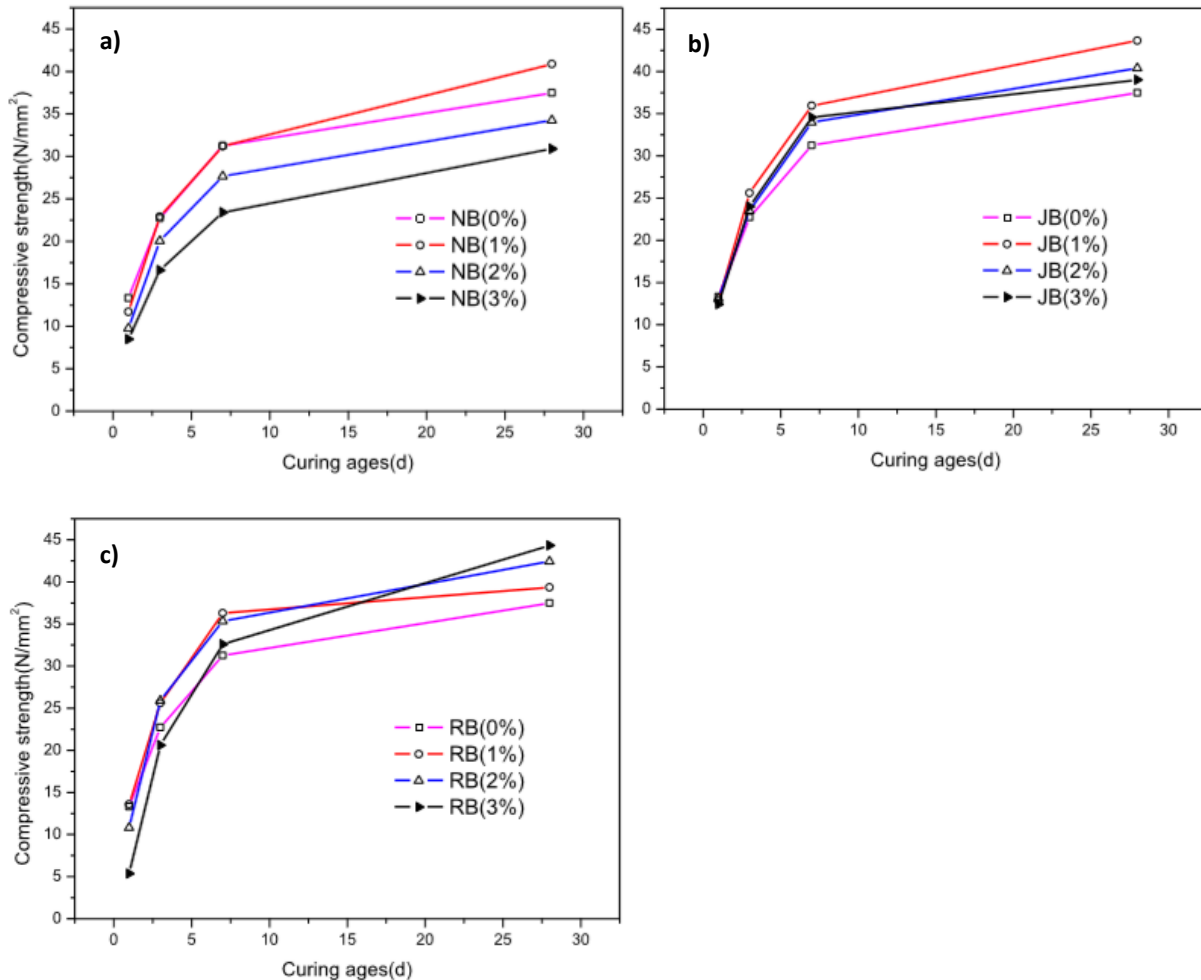


Figura 2 - 12: Resistencia a la compresión para muestras de hormigón con diferentes cantidades de agente de auto-reparación. a) Agente con Nitrato de Calcio, b) Agente de auto-reparación con Formiato de Calcio, c) Agente de auto-reparación con Lactato de Calcio (Luo & Qian, 2016) .

El agente con nitrato de calcio (NB), aumentó la resistencia a compresión del hormigón solo cuando tenía un 1% con respecto al total de la mezcla, para el 2 y 3% hubo una pérdida de resistencia.

El agente con formiato de calcio (JB) también aumenta la resistencia a la compresión al tener un 1%, luego comienza a descender, pero hasta el 3% sigue siendo mayor a las probetas de control.

Para el caso del agente con lactato de calcio (RB) se observa un aumento De la resistencia a los 28 días proporcional a los porcentajes del agente.

Dados los resultados en la resistencia a la compresión del lactato de calcio y los resultados comprobados de otros investigadores en la auto-reparación del hormigón (Tziviloglou, Wiktor, Jonkers, & Schlangen, 2016), se utilizó este reactivo como fuente de calcio para la bacteria.

2.4.3 TÉCNICAS DE ENCAPSULACIÓN DE LAS BACTERIAS

Se ha aplicado el agente de auto-reparación de manera directa en la mezcla, y se han visto resultados positivos, sin embargo, las bacterias van disminuyendo su población con el tiempo, por lo que el agente pierde su eficacia.

En la gráfica de la Figura 2-12 se puede observar como aquellas grietas que fueron producidas en el hormigón a los 7 y 14 días alcanzan una auto-reparación completa. La auto-reparación de las grietas producidas luego de los 60 días disminuye considerablemente (Luo, Qian, & Li, 2015).

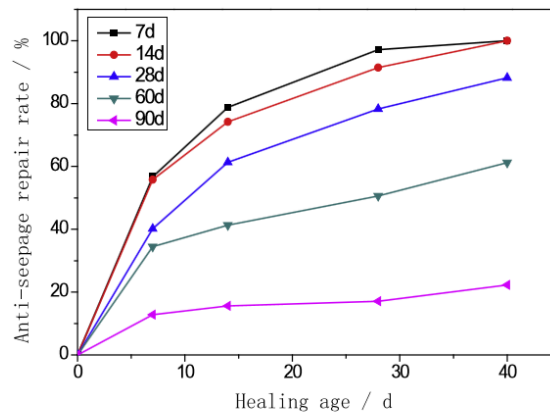


Fig. 12. Crack healing ratio of specimens in different cracking age.

Figura 2 - 13: Porcentaje de auto-reparación de las grietas de especímenes agrietados a diferentes edades desde su fabricación (Luo, et al., 2015).

Una forma de superar esta limitación, y permitir que el hormigón siga siendo un material auto-reparable en el tiempo, es encapsulando las bacterias, protegiéndolas sin afectar ninguna de las propiedades del hormigón ni la precipitación de carbonato de calcio. Se han investigado diversas formas de proteger a las bacterias en la mezcla de hormigón; agregados de arcilla expandida (LWA) (Tziviloglou, Wiktor, Jonkers, & Schlangen, 2016), microcápsulas a base de melanina (Wang, Soens, & Verstraete, 2014), tierra de diatomeas (Wang, De Belie, & Verstraete, Diatomaceous

earth as a protective vehicle for bacteria applied, 2012), gel de sílice y poliuretano (PU) en tubos de vidrio (Wang, Van Tittelboom, De Belie, & Verstraete, 2012), nano plaquetas de grafito (GNP) (Khaliq & Basit Ehsan, 2016), e hidrogel (Wang, y otros, 2015).

Encapsulación a base de melanina

En el estudio sobre la encapsulación a base de melanina, se usó el nitrato de calcio como la fuente de calcio y se midió la auto-reparación de las grietas según la relación entre el área inicial y el área sellada. El hormigón con esporas encapsuladas mostró una relación auto-reparación entre el 48% y el 80%, mientras que para las muestras sin esporas solo llegó al 50%. Además, La mayor reducción en el área de grietas se observó cuando las muestras se sometieron a ciclos húmedos y secos con agua como medio (Wang, Soens, & Verstraete, 2014).

La tierra de diatomeas

Este compuesto es un mineral rico en sílice y formado a partir de la cáscara de microorganismos llamados diatomeas, tiene una estructura altamente porosa y es posible proteger a las bacterias del alto pH del hormigón. Las bacteria utilizadas en este estudio eran ureolíticas y se pudo comprobar que aquellas inmovilizadas con la tierra de diatomeas tenían una actividad ureolítica mucho más alta que las bacterias no inmovilizadas; se descompusieron 12-17 g/l de urea en el cemento durante 3 días en el caso de las bacterias con tierra de diatomeas, mientras que para las otras se descompuso menos de 1 g/l de urea en el mismo periodo. Además se observó que las grietas con el agente se rellenaron completamente. Si bien, este método resulto efectivo, no se ha demostrado en con otro tipo de bacterias. El proceso metabólico de las bacterias usadas en esta investigación no es sobre hidrólisis de la urea, sino oxidación de carbono (Wang, Soens, & Verstraete, 2014).

Hidrogel

El uso de hidrogel para la encapsulación de bacterias proporciona una fuente de humedad interna para la actividad bacteriana y actúa como caparazón protector para las bacterias. La auto-reparación de las bacterias protegidas bajo esta técnica fue de aproximadamente 40% -90% y se observó una disminución máxima en la permeabilidad al agua de aproximadamente el 68%. Además, es posible la utilización de este método en lugares tropicales que se caracterizan por alta humedad y precipitación, debido a la gran capacidad de absorción de los hidrogeles. Sin embargo, la resistencia a la tracción y a la compresión se deterioraron un 23,40% y 30% respectivamente con la adición del 1% del hidrogel (Wang, y otros, 2015).

Encapsulación en agregado liviano (LWA)

Los agregados de arcilla son livianos y blandos, lo que permitiría que al momento de producirse una grieta esta rompa el agregado y permita la acción de la bacteria. Además, son altamente porosos lo que permite la correcta encapsulación del agente de auto-reparación. Los experimentos han probado después de dos semanas de inmersión en agua el sellado de un ancho de grieta máximo de 0.46 mm, y después de 6 meses, no se observó ninguna pérdida en la viabilidad de las bacterias. Este fue el método de encapsulación utilizado en este estudio, dada su disponibilidad en el laboratorio y a que otorga una protección adecuada a las bacterias (Wang, y otros, 2015).

Nanoplaquetas de grafito (GNP)

Se ha observado que GNP es un buen compuesto para proteger a las bacterias. En el estudio realizado por (Khaliq & Basit Ehsan, 2016) se utilizaron muestras incorporadas con GNP y LWA. Las muestras agrietadas a los 3 y 7 días obtuvieron una mejor auto-reparación para las que contenían el GNP. Sin embargo, las muestras agrietadas posteriormente a los 14 y 28 días entregaron mejores resultados en las que tenían el agente de auto-reparación contenido en la LWA (Figura 2-13). Esto podría confirmar la eficacia del agregado liviano (LWA) para conservar a las bacterias en el tiempo (Wang, y otros, 2015).

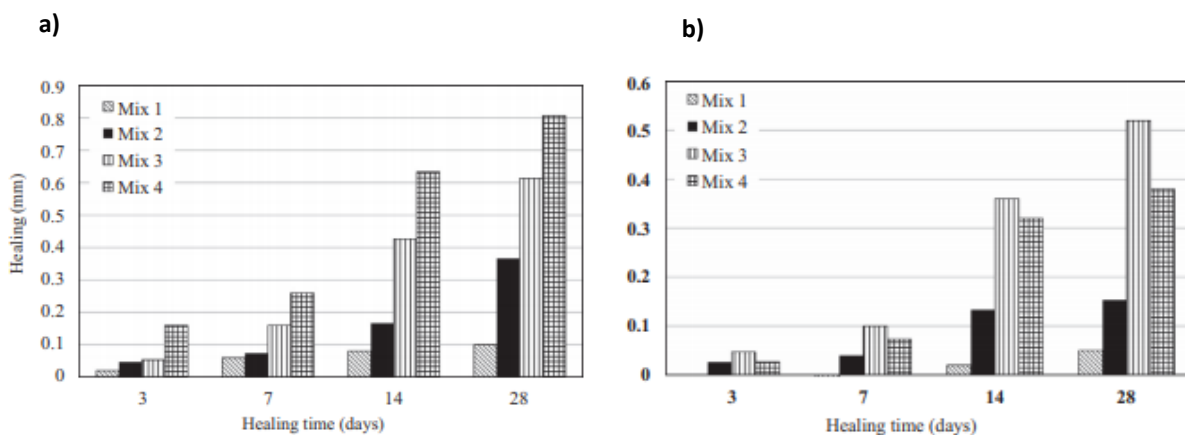


Figura 2 - 14: Auto-reparación de las muestras según su espesor en mm en el tiempo (días). La mezcla 1 no tiene agente de auto-reparación, la mezcla 2 tiene las bacterias sin protección, la mezcla 3 contiene el agente en LWA, y la mezcla 4 contiene el agente en GNP.

2.4.4 CONDICIONES DE HUMEDAD PARA LA AUTO-REPARACIÓN

Es indispensable la presencia de agua para que se produzca la precipitación de carbonato de calcio. El agua logra sacar a las bacterias de su estado de latencia, permite que se inicie el proceso de formación de la calcita y colabora con la difusión del oxígeno para que ocurra la reacción oxidativa. Sin embargo, visto de manera práctica, no todas las construcciones de hormigón se encuentran sumergidas en agua; esto significaría la necesidad de una intervención manual de regado para que las bacterias puedan reparar las grietas y el hormigón perdería su connotación de auto-reparable. Para que no sea necesaria la intervención humana, el material deberá aprovechar el agua proporcionada por el ambiente; esto puede ser la humedad del ambiente o la lluvia.

A modo de simular esta situación, (Luo, Qian, & Li, 2015) sometió a los especímenes con el agente de auto-reparación a tres condiciones: totalmente sumergidos (Water curing), a ciclos de mojado-secado, en donde se mantuvieron 12 horas sumergidos en agua y 12 horas fuera (Wet-dry cycles curing), y un tercer grupo en que estuvo en un ambiente con una humedad relativa del 90% (Wet curing). En la Figura 2-14 se puede observar que en los especímenes sumergidos y sometidos a ciclos de mojado-secado hubo una eficiente reparación. Aquellos que solo se mantuvieron húmedos (Humedad relativa de 90%) no hubo visibles reparaciones, alcanzándose solamente un 43% de reparación a los 28 días.

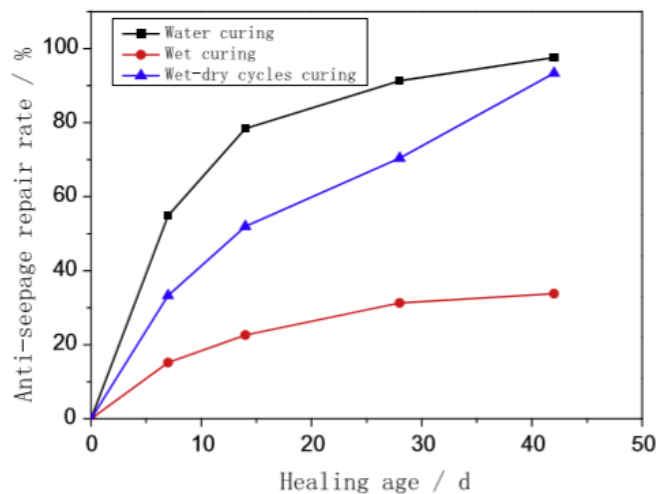


Figura 2 - 15: Porcentaje de auto-reparación en probetas sometidas a diferentes maneras de proporcionar humedad (Luo, et al., 2015).

Algunas de las técnicas utilizadas para proteger a las bacterias mencionadas en la sección 2.4.3, son capaces de absorber agua y con esto auto-reparar el hormigón sin necesidad de sumergirlo en agua.

En la encapsulación a base de melanina se observó el mejor rendimiento de auto-reparación cuando se expuso el hormigón a ciclos mojado-secado (período mojado de 16 h y período seco de 8 h). Por otro lado, el hidrogel también tiene la capacidad de absorber agua; se observó en especímenes sometidos a ciclos de mojado-secado grietas con un máximo de 0.5 mm auto-reparadas.

Los ciclos de mojado-secado podrían favorecer además el sellado de las grietas al disminuir la difusión de la precipitación en formación.

3. FACTORES DE ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1 FACTORES DE ESTUDIO

El objetivo general de este trabajo es comparar el efecto de tres diferentes temperaturas y dos tipos de cemento en la capacidad de la auto-reparación del hormigón mediante la bacteria *Bacillus Pseudofirmus*. Estos factores podrían afectar directamente el desempeño de la bacteria, y por ende la auto-reparación, como bien podrían hacerlo de manera indirecta mediante otros fenómenos.

Además, se estudió si el agente de auto-reparación (2.1.6) podría tener incidencia en la resistencia a compresión del hormigón.

3.1.1 TEMPERATURA

La bacteria *Bacillus Speudofirmus* corresponde a una de tipo mesófilo (sección 2.3.4), y su óptimo crecimiento ocurre a los 30°C (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-Organisms BCCM), por lo que una variación en la temperatura podría afectar otras actividades enzimáticas como la precipitación del carbonato de calcio.

Por otro lado, la auto-reparación autógena (se describe en la sección 2.2.1) es un fenómeno que no puede aislarse de la auto-reparación con bacterias ya que es propia de cualquier hormigón, y se ha observado en otros estudios la incidencia que tiene la temperatura en sus resultados.

En el estudio acerca de reparación autógena propuesto por (Reinhardt & Jooss, 2003) se comparó la permeabilidad de probetas agrietadas y puestas a 20°, 50° y 80°C. Las grietas con un ancho de 0.05 mm no presentaron mayores diferencias entre las temperaturas, no así en las grietas de 0.1 y 0.15 mm, en donde las grietas expuestas a mayor temperatura presentaron mayor permeabilidad como se observa en la Figura 3-1.

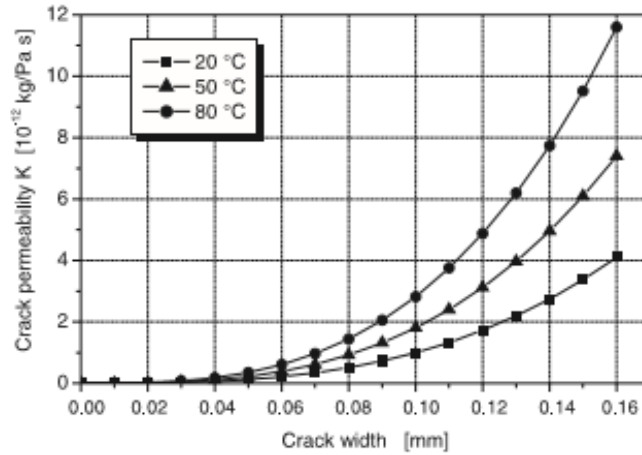


Figura 3 - 1: Representación de la permeabilidad K según ancho de las grietas a distintas temperaturas (Reinhardt & Jooss, 2003).

La influencia de la temperatura se puede respaldar teóricamente mediante la ley de Hagen-Poiseuille (Reinhardt & Jooss, 2003), Ecuación (3-1).

$$Q_{ro} = \frac{\xi \omega \Delta p l}{\eta d} [m^3/s] \quad (3-1)$$

$$K = \frac{\omega^3 \rho}{\eta} \quad (3-2)$$

$$\Delta p = \rho g h \quad (3-3)$$

$$Q_{ro} = \frac{\xi h g l K}{d} [m^3/s] \quad (3-4)$$

Donde Q_{ro} es la tasa de flujo, ξ Rugosidad, ω Ancho de la grieta, l largo de la grieta, η viscosidad del agua, d Espesor de la probeta y K Permeabilidad del agua.

La densidad y la viscosidad del agua son afectadas por los cambios de temperatura. A 20°C la densidad será de 1000 Kg/m³ y a 80°C de 970 Kg/m³. La viscosidad a 20°C será de 1 MPa y a 80°C será de 0.35 MPa, al estar la permeabilidad directamente relacionada con el cociente entre la densidad y la viscosidad (2), se tendrá que a mayor temperatura el cociente será mayor (Tabla 3-1), por lo que a mayor temperatura existirá más permeabilidad de las grietas, o menor sellado en el hormigón.

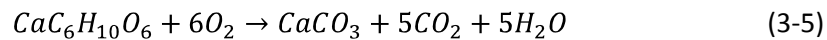
Tabla 3 - 1: Cociente entre densidad y viscosidad del agua según su temperatura.

Temperatura (°C)	Densidad (Kg/m ³)	Viscosidad (MPa)	ρ / η
20	1000	1	1000
80	970	0.35	2771

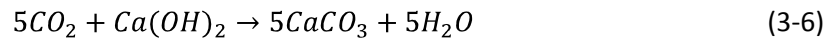
3.1.2 TIPOS DE CEMENTO

El segundo factor que se estudió es el tipo de cemento utilizado para la preparación del hormigón auto-reparable. Se consideró el cemento Portland y Puzolánico (Sección 1.3 y 2.1.2).

Cuando precipita el carbonato de calcio durante la auto-recuperación por bacterias una de los productos que genera es el dióxido de carbono (3-5), el cual al reaccionar con el hidróxido de calcio producirá mayor cantidad de carbonato de calcio (3-6) (Huang, Ye, Qian, & Schlangen, 2016). Es por esto que la cantidad de hidróxido de calcio que tenga el tipo de cemento utilizado puede afectar el rendimiento del sellado de fisuras en el hormigón.

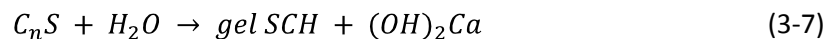


Lactato de calcio + oxígeno → Carbonato de calcio + Dioxido de carbono + Agua



Dioxido de carbono + Hidróxido de Calcio → Carbonato de calcio + Agua

Los principales componentes del cemento Portland son el silicato tricálcico (C₃S) o alita (de 40 a 60%), silicato bicálcico (C₂S) o belita (20 a 30%), aluminato tricálcico (C₃A) o celita (7 a 14%) y ferrito aluminato tetracálcico (FAC₄) o ferrita (5 a 12%), siendo los Silicatos (C_nS) los más abundantes, constituyendo más del 80%. Al esquematizar la hidratación de los silicatos tenemos la Hidratación primaria (3-7) (Becker E. , CEMENTO PÓRTLAND - Características y Recomendaciones de Uso, 2000).



Donde C_nS : *Silicato cálcico*, SCH : *Silicato cálcico hidratado* y $(OH)_2Ca$: *Hidróxido de calcio*

Si bien es el gel SCH el principal responsable del desarrollo de resistencia y de la durabilidad del hormigón y el hidróxido de calcio es muy poco resistente desde el punto de vista mecánico, puede participar en la generación de carbonato de calcio como se mostró en (3-6).

Por otro lado, el cemento Puzolánico también hidratará en primera instancia los silicatos presentes en él (hidratación primaria) (3-7), pero, posteriormente ocurrirá la hidratación secundaria (3-8) donde se combina el hidróxido de calcio formado anteriormente con el dióxido de silíceo aportado por las puzolanas.



Como se puede observar en la hidratación de la puzolana no hay generación de hidróxido de calcio. La Figura 3-2 muestra que a medida que avanza el proceso de hidratación, el hidróxido de calcio disminuye (Becker E. , CEMENTO PÓRTLAND PUZOLÁNICO - Características y Recomendaciones, 2001).

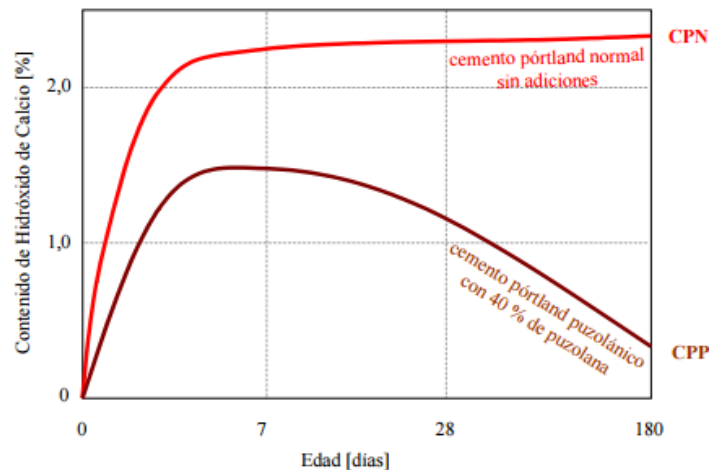


Figura 3 - 2: Variación en el contenido De Hidróxido de Calcio ($Ca(OH)_2$) durante la hidratación del cemento portland normal y cemento portland puzolánico (Becker, 2001).

Esto puede traducirse en un mejor desempeño del cemento Portland para la auto-reparación del hormigón mediante bacterias.

3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para estudiar la auto-reparación del hormigón con bacterias según la temperatura, se consideraron 3 temperaturas (Tabla 3-2).

Tabla 3 - 2: Temperaturas a las que someterá a las probetas en el proceso de auto-reparación.

Temperatura	
4°C	Temperatura Extrema
23°C	Temperatura ambiente.
30-40°C	Óptimo para la actividad bacteriana

Los 4°C representan una temperatura extrema para la bacteria dada su naturaleza mesófila (sección 2.3.4).

Los 23°C representan la temperatura ambiente, la cual ha sido utilizada en la mayoría de las investigaciones acerca de auto-reparación con bacterias (Wiktor & Jonkers, 2011), (Stuckrath, Quantification of chemical and biological calcium carbonate precipitation: Performance of self-healing in reinforced mortar containing chemical admixtures, 2014) (Siddique, y otros, 2016), entregando resultados positivos.

Los 30°C representan la mejor temperatura para el crecimiento de la bacteria, sin embargo, no fue posible mantener este valor fijo debido a que el horno utilizado para guardar las probetas se emplea para el secado de diferentes muestras a altas temperaturas (mayores a 100°C) y no es capaz de mantener una temperatura baja constante. La máxima temperatura registrada fue de 40°C, mientras que en el rango inferior alcanzó los 28°C.

Todas las probetas utilizadas en el estudio de la temperatura se fabricaron con cemento Portland. Se consideró probetas con el agente de auto-reparación (B) que se describió en la sección 2.1.6 y probetas de control (C) para comparar resultados.

Para el estudio de la auto-reparación según los tipos de Cemento, se usaron los cementos Portland y Puzolánico. Además de las probetas C y B, se incluyó un tercer tipo de mezcla que consiste en la incorporación del lactato de calcio a la arcilla, sin las bacterias ni el extracto de levadura (L). Esto debido a que una alta cantidad de calcio podría, por sí solo, ser capaz de auto-reparar el hormigón

(Stuckrath, Quantification of chemical and biological calcium carbonate precipitation: Performance of self-healing in reinforced mortar containing chemical admixtures, 2014).

Todas las probetas utilizadas en el estudio de los tipos de cemento se mantuvieron a una temperatura de 23°C.

Para el análisis de la resistencia a la compresión del hormigón, se usó cemento Portland en los tres tipos de mezcla: C, L y B.

Para cada variable se hicieron tres repeticiones y se promediaron los resultados.

La Tabla 3-3 presenta la matriz experimental con las variables independientes estudiadas y el tipo y número de ensayos realizados.

Tabla 3 - 3: Matriz experimental.

		Tipo de Cemento					
		Portland (PT)			Puzolánico (PZ)		
		Control (C)	Lactato de Calcio (L)	Lactato de Calcio + Bacterias (B)	Control (C)	Lactato de Calcio (L)	Lactato de Calcio + Bacterias (B)
Temperatura °C	4				-	-	-
	23	 	 	 			
	30-40				-	-	-

Simbología,



: Cuantificación del porcentaje de Auto-reparación mediante análisis visual.



: Ensayo de resistencia a la compresión.

El trabajo experimental se divide en tres etapas (Figura 3-3). La preparación del agente de auto-reparación (Capítulo 4), la preparación de las mezclas y fabricación de las probetas prismáticas y

cúbicas de hormigón (Capítulo 5), y finalmente los análisis que consisten en el ensaye a compresión de las probetas cúbicas y la verificación de la auto-reparación de las probetas prismáticas agrietadas luego del curado (Capítulo 6).

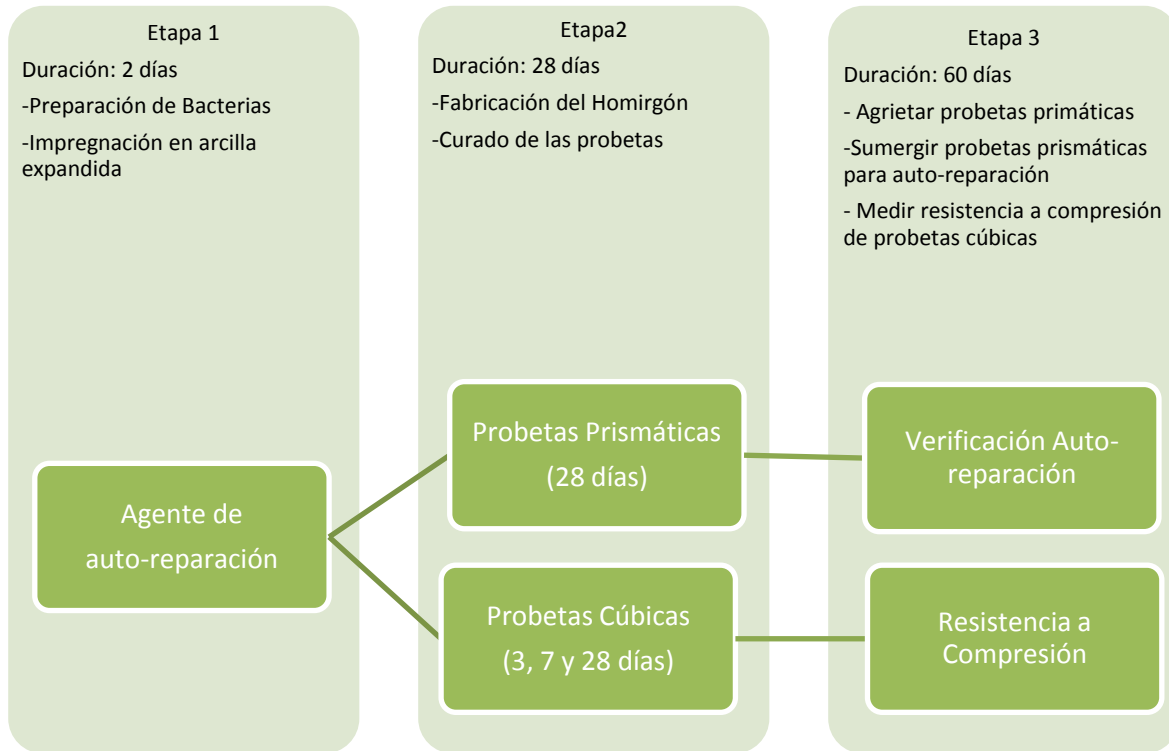


Figura 3 - 3: Esquema general del trabajo experimental.

4. METODOLOGÍA PARA LA PREPARACIÓN DEL AGENTE DE AUTO-REPARACIÓN

4.1 INTRODUCCIÓN

Como se comentó en el capítulo 2, el hormigón auto-reparable requiere del agente de auto-reparación para actuar. Este agente está compuesto por un árido liviano impregnado por una suspensión de bacterias, una fuente de calcio, y nutrientes para la bacteria (sección 2.1.4).

Primero se debe alcanzar un número de bacterias suficientes que cumplan con el sellado del hormigón y posteriormente es necesario proteger a la bacteria del medio hostil que significa el cemento, por lo que se empleó como método de protección la impregnación de la bacteria en su forma de endoespora en la arcilla expandida.

Luego, se debe llevar a la bacteria desde su estado vegetativo o activo a la formación de endoesporas. Las esporas o endoesporas son células en reposo que forman ciertas bacterias Gram-positivas ante la carencia de nutrientes esenciales. Las endoesporas son elementos específicos de las bacterias que consisten en células deshidratadas con una supervivencia muy prolongada, que poseen paredes gruesas y varias capas adicionales. Estas estructuras se forman en la parte interna de la membrana plasmática bacteriana. Cuando se las libera en el ambiente, las endoesporas pueden sobrevivir al calor extremo, a la falta de agua y a la exposición a numerosos compuestos químicos y a radiaciones (Tortora, Funke, & Case, 2007).

Las endoesporas, debido a que tienen un tamaño similar a las partículas de cemento, se deben proteger especialmente de la fase de mezclado y vibrado para que no mueran por el aplastamiento del cemento. Las endoesporas serán protegidas al introducirlas dentro de un árido liviano. El árido liviano es un material física y químicamente neutro, que no desprende gases, no se pudre, y no es atacable por parásitos u hongos. Además, no le afectan las sustancias químicas y es altamente resistente a las heladas y a los cambios bruscos de temperaturas. El árido liviano es un sustituto para los áridos convencionales (rocas naturales) que se usan en el hormigón para aligerarlo, pues su densidad oscila entre la mitad y un tercio de la densidad del árido natural, lo cual supone que el nuevo hormigón sea mucho más liviano y la estructura del edificio más ligera y barata (BORSI, 2001).

En este capítulo se describen los procedimientos para que la bacteria crezca, forme endoesporas, y se proteja en la arcilla para formar finalmente el agente de auto-reparación. Además, se explican

los parámetros utilizados para verificar la viabilidad de las bacterias durante el procedimiento y los métodos para determinarlos.

4.2 MÉTODOS PARA RESPALDAR LA VIABILIDAD DE LA BACTERIA *BACILLUS PSEUDOFIRMUS*

4.2.1 DENSIDAD ÓPTICA (D.O.)

La densidad óptica (DO) fue el parámetro utilizado para establecer la densidad poblacional de un cultivo de bacterias. DO es el término que se refiere a la absorbancia por unidad de longitud que recorre la luz al atravesar una sustancia (4-1):

$$DO_{\lambda} = \frac{A_{\lambda}}{l} = \frac{1}{l} \log \frac{I_0}{I_1} \quad (4-1)$$

Donde l corresponde al espesor de la muestra en cm, λ es la longitud de onda de la luz aplicada, I_0 la intensidad incidente sobre la solución en Cd³ e I_1 es la intensidad que sale de la solución en Cd (Figura 4-1). Esta intensidad de luz es posible medirla a través del espectrofotómetro (Figura 4-2).

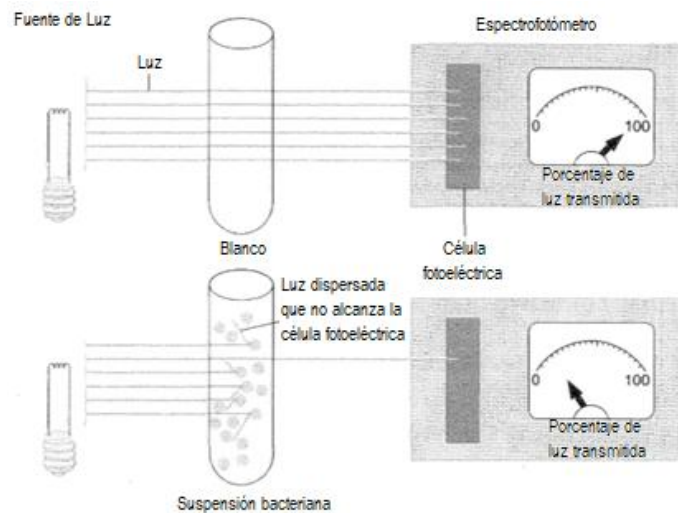


Figura 4 - 1: Estimación de la cantidad de bacterias por la turbidez. La cantidad de luz que llega es inversamente proporcional al número de bacterias en condiciones estandarizadas, Cuanto menor es la cantidad de luz transmitida mayor es la cantidad de bacterias en la muestra (Tortora, Funke, & Case, 2007).

³ Cd: Candela; unidad básica del Sistema Internacional que mide la intensidad luminosa.



Figura 4 - 2: Espectrofotómetro utilizado lectura mediante el software Autosoft.

Por otro lado, es necesario establecer una relación entre la cantidad de bacterias vivas y la respectiva DO de la suspensión, pues si bien una sustancia puede tener un alto grado de turbidez, esto no asegura que las bacterias presentes se encuentren viables. “Una bacteria muerta ocupará el mismo espacio que una viva” (Tortora, Funke, & Case, 2007). Para esto, se respaldaron los resultados con el Método del Número Más Probable.

4.2.2 MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE

El recuento de células viables se determina mediante el Método del Número Más Probable (NMP) (Woomer, 1994). La técnica consiste en estimación estadística basada en el hecho de que a mayor número de bacterias en una muestra, mayor será la dilución necesaria para reducir la densidad, hasta el punto en que ninguna bacteria pueda crecer en la serie de tubos de dilución. Los pasos que se llevan a cabo son detallados a continuación:

Muestra: Se toma 1 ml de la muestra líquida con bacterias o 1 gr si corresponde a las bacterias en un sólido. Para el caso del gramo, este se debe moler en un mortero estéril.

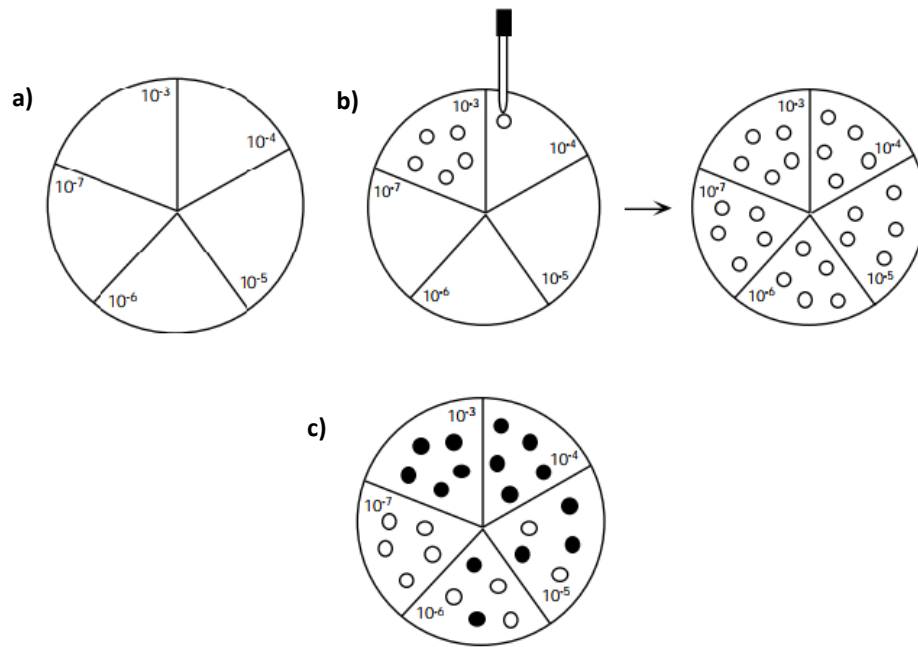
Diluciones en serie: Se diluye la muestra serialmente, transfiriendo 1 ml a un tubo con 9 ml de 0.85% NaCl. Se repite en serie el procedimiento hasta alcanzar una dilución 10^{-7} .

Placas Petri: utilizando un marcador, se divide la placa Petri en cinco zonas de igual tamaño. Cada una corresponde al factor de dilución a ser inoculado (Figura 4-3a).

Inoculación: Se transfiere 5 μ l de la dilución apropiada al área correspondiente. Se repite esta operación cinco veces por cada dilución. (Figura 4-3b)

Permitir que el inóculo seque sobre el medio de crecimiento. Sellar la placa, invertir e inocular a 25° C por 7 días.

Evaluación del crecimiento: Para cada dilución de ascendencia se evalúa el crecimiento o No crecimiento sobre cada replica inoculada. Los resultados se indican como se muestra en la Figura 4-3c.



Diluciones $10^{-3} - 10^{-4} - 10^{-5} - 10^{-6} - 10^{-7} :: 5 - 5 - 3 - 2 - 0$

Figura 4 - 3: a) Placa Petri marcada b) Dilución del cultivo c) Resultados observables.

Datos y Análisis: Del Anexo 1 se pueden extraer los valores para determinar la población estimada para la muestra. Si el patrón de respuestas no se encuentra en la tabla, se promedia el valor estimado del patrón superior e inferior en la Tabla. Estos valores son el NMP sin ajustar. Para calcular la densidad poblacional de la muestra, entonces tendrá que multiplicar el NMP sin ajustar por el factor de corrección de volumen, por el recíproco del factor de dilución menor inoculado en la placa.

4.2.3 CURVA DE CRECIMIENTO

En las bacterias, el crecimiento de la población se produce por la división de la célula, esto se conoce como fisión binaria o bipartición, una forma de reproducción asexual.

La curva del crecimiento bacteriano representa gráficamente el aumento de la población de bacterias en función del tiempo, y se pueden distinguir básicamente cuatro fases: retraso, logarítmica o exponencial, estacionaria y de declinación.

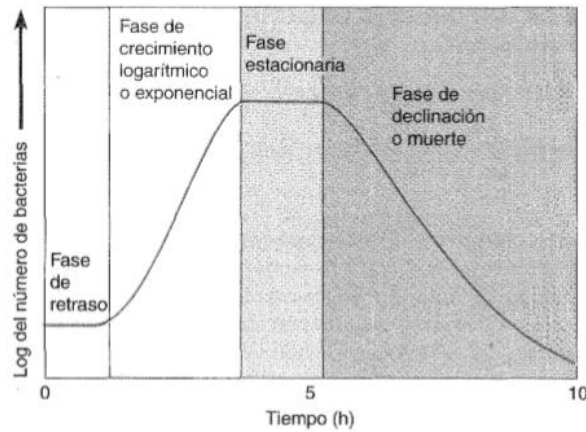


Figura 4 - 4: Curva de crecimiento bacteriano que muestra las cuatro fases típicas del crecimiento (Tortora, et al., 2007).

La fase de retraso, podría denominarse también de adaptación, pues el número de células cambia muy poco debido a que las células no se reproducen de inmediato en un medio nuevo.

Cuando las células ya comienzan a dividirse y entran en un período de crecimiento o de incremento logarítmico hablamos de la fase logarítmica o fase de crecimiento exponencial. La reproducción celular alcanza una actividad máxima durante este período y su tiempo de generación llega a un mínimo constante.

En la fase estacionaria, la tasa de crecimiento disminuye, el número de muertes microbianas compensa el de células nuevas y la población se estabiliza. La actividad metabólica de las células que sobreviven también se torna más lenta en esta fase.

En la fase de declinación el número de muertes supera el número de bacterias formadas. Esta fase continúa hasta que la población disminuye a una pequeña fracción de células más resistentes o hasta que todas sus integrantes mueren (Tortora, Funke, & Case, 2007). Sin embargo, cuando una bacteria es capaz de formar endosporas, abandonará su crecimiento exponencial debido a la escasez de los nutrientes en el medio.

En la Figura 4-5 se observa que la fase de retraso de la bacteria *Bacillus Pseudofirmus* dura una hora, mientras que su estado estacionario lo alcanza a las 8 horas (Stuckrath, Valenzuela, & Lopez, Remediación del hormigón mediante bacterias, 2012).

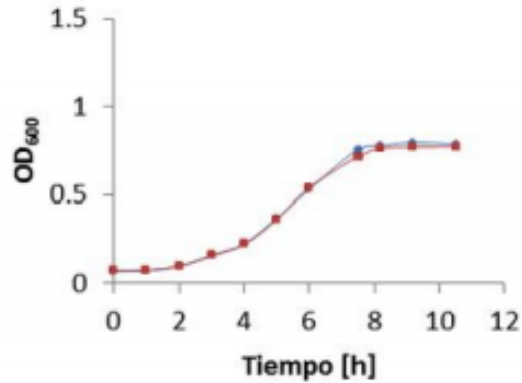


Figura 4 - 5: Curva de crecimiento de la bacteria *Bacillus Pseudofirmus* (Stuckrath, et al., 2012).

El crecimiento y la esporulación de la bacteria se realizaron siguiendo los valores de la densidad óptica obtenida de su curva de crecimiento. Así, es posible asegurar que se llegó a la etapa estacionaria. Paralelamente se corroboró la esporulación con el método de tinción Gram y el de Schaeffer- Fulton

4.2.4 TINCIÓN GRAM Y TINCIÓN DE SHAEFFER-FULTON

Tinción Gram

Con el método de Tinción Gram, se puede distinguir el tipo de pared celular que posee la bacteria (sección 2.1.5). De este modo es posible identificar a la bacteria bajo el microscopio y comprobar que no ha sufrido algún tipo de contaminación.

Para realizar este método se comienza con poner la muestra en un portaobjetos y con ayuda de un mechero fijarla por calor. Se aplica a la muestra, durante un minuto, violeta de genciana o cloruro de metilrosanilina, el cual es el principal colorante que se emplea en esta técnica. El colorante tiñe de color violeta tanto las células Gram-positivas como las células Gram-negativas porque ingresa en el citoplasma de ambos tipos de células. Luego, la aplicación de yodo (el mordiente) determina la formación de cristales con el colorante que no pueden atravesar la pared celular debido a su gran tamaño. Éste se aplica por 1 min. Se continúa con la aplicación de alcohol durante 30 segundos. El alcohol deshidrata el peptidoglucano de las células Gram-positivas y las torna aún más impermeables a los cristales de violeta de genciana-yodo. En el caso de las células Gram-negativas el efecto es muy diferente, dado que el alcohol disuelve la membrana externa de las células e incluso crea en la delgada capa de peptidoglucano pequeños orificios a través de los

cuales se difunden los cristales de colorante-yodo. Finalmente se agrega safranina por 10 segundos (la tinción de contraste), como las bacterias Gram-negativas se tornan incoloras después del lavado con alcohol, este agregado determina que las células adquieran un color rojizo. La safranina crea un contraste con el colorante principal (violeta de genciana). Si bien la safranina es absorbida tanto por las células Gram-positivas como por las células Gram-negativas, el color rojizo de este colorante es enmascarado por el colorante violeta más intenso que absorbieron antes las células Gram-positivas.

Tinción de Shaeffer-Fulton

Para garantizar que las bacterias se encuentran en su estado de espora se emplea el método de tinción de Schaeffer- Fulton. Esta técnica consiste en aplicar el colorante primario verde de malaquita, y fijar con calor (mechero o antorcha) durante 5 minutos. El calor ayuda a que el colorante atraviese la pared de la endospora. Se espera a que la muestra se enfríe y luego se lava el preparado con agua durante cerca de 30 segundos para eliminar el verde de malaquita de todas las partes de las células salvo las endosporas. Finalmente, se aplica sobre la muestra la safranina como colorante de contraste, para teñir las porciones de la célula distintas de las endosporas.

4.3 CRECIMIENTO Y ESPORULACIÓN DE LA BACTERIA *BACILLUS PSEUDOFIRMUS*

4.3.1 CULTIVO DE LA BACTERIA

Para la investigación se adquirió una ampolla con la bacteria *Bacillus Pseudofirmus* LMG 17944 liofilizada, de la colección del *Belgian Co-ordinated Collections of Micro-Organisms BCCM*. Dentro de las ventajas que otorga este microorganismo se encuentra su capacidad formadora de endosporas y su tolerancia a ambientes alcalinos (sección 2.3.4), además de su evidenciada capacidad de auto-reparación del hormigón (Stuckrath, Quantification of chemical and biological calcium carbonate precipitation: Performance of self-healing in reinforced mortar containing chemical admixtures, 2014).

Se preparó un medio de cultivo sólido y líquido (sin agar) con los reactivos propuestos por el proveedor (Tabla 4-1), posteriormente se esterilizó mediante autoclave.

La bacteria utilizada es alcalófila, es decir es un microorganismo que se desarrolla en ambientes con valores de pH comprendidos entre 8.5 y 11. Para modificar el pH del Medio de Cultivo 253 se preparó la solución Na-sesquicarbonato que contiene bicarbonato y carbonato de sodio. Dado que

estos reactivos en presencia de calor podrían producir gases tóxicos (monóxido de carbono), no es seguro auto-clavar la solución, y por lo tanto se esterilizó por medio de la técnica de filtrado. Se agregó la solución Na-sesquicarbonato al Medio de Cultivo 253 para regular el pH y volverlo alcalino (Tabla 4-2).

Tabla 4 - 1: Medio de Cultivo 253, Belgian Co-ordinated Collections of Micro-Organisms BCCM.

Reactivo	Cantidad	Unid.
Extracto de carne Lab-Lemco	1	g
Extracto de levadura	2	g
Peptona	5	g
NaCl	5	g
Agar	20	g
Agua destilada	1000	ml
Solución de sesquicarbonato de sodio	100	ml

Tabla 4 - 2: Solución Na-sesquicarbonato de sodio.

Reactivo	Cantidad	Unid.
NaHCO ₃	4.2	g
Na ₂ CO ₃	5.3	g
Agua destilada	100	ml

Se esperó 24 horas para garantizar que no hubiese crecimiento de microorganismos, y por lo tanto asegurar su esterilidad.

Finalmente se realizó el traspaso de la bacteria desde la ampolla de vidrio (Figura 4-6b) al Medio de Cultivo 253 líquido y sólido. Se agregó agar para obtener el medio sólido.

En la Figura 4-6a se presenta el Medio de Cultivo 253 en su fase sólida dentro de las placas Petri y su fase líquida en el tubo para centrifugar.

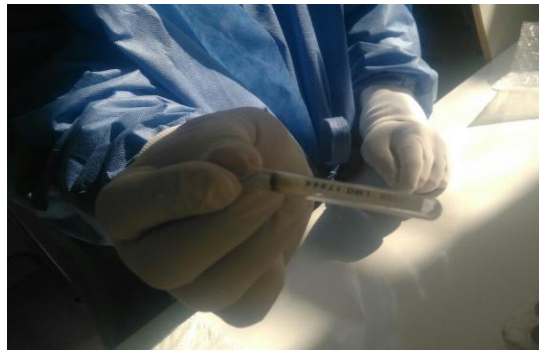
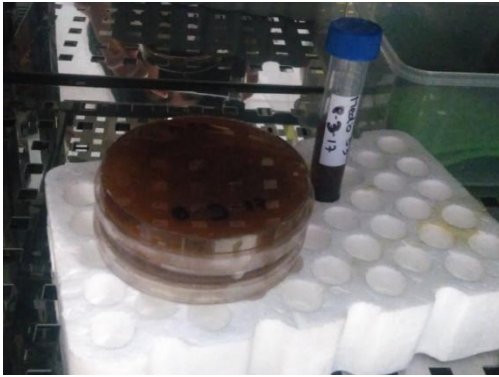


Figura 4 - 6: a) Medio de Cultivo 253 líquido y sólido. b) Bacteria liofilizada contenida en ampolla de vidrio.

Al día siguiente ya fue posible observar el crecimiento de la bacteria y se procedió a realizar la técnica de tinción Gram (sección 4.2.4), con esa técnica se pudo observar la bacteria bajo el microscopio y comprobar que no estaba contaminada con otros microorganismos.

En la Figura 4-8 se presentan imágenes obtenidas mediante microscopio óptico de las bacterias en su fase vegetativa y de espora. Las bacterias aparecen en color violeta, lo que demuestra su naturaleza Gram-positiva.

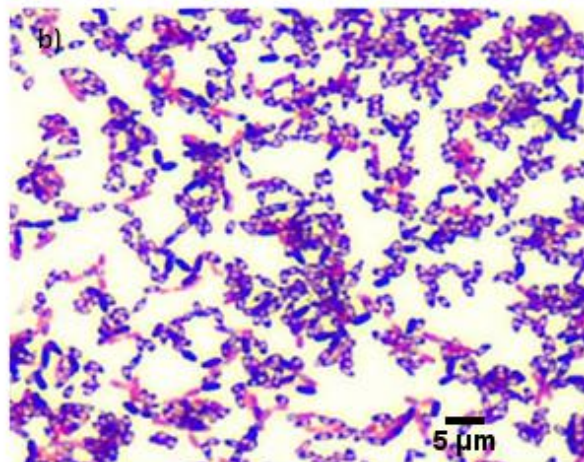
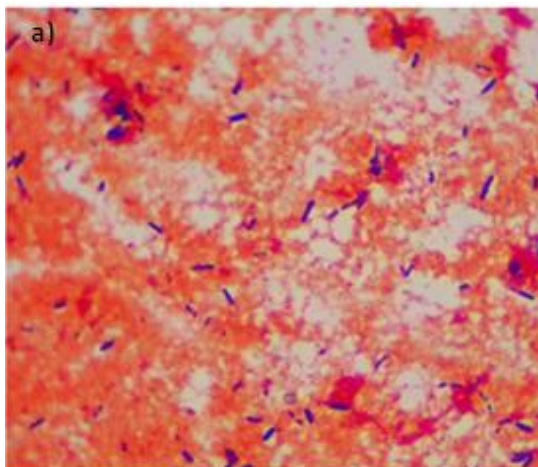


Figura 4 - 7: Bacteria *Bacillus Pseudofirmus* (color morado) en Medio de Cultivo 253 (color naranja) en estado activo o vegetativo. b) Bacteria en su estado de espora en Medio Mineral.

4.3.2 ESPORULACIÓN DE LA BACTERIA *BACILLUS PSEUDOFIRMUS*

Se puso dos colonias frescas de bacterias, cultivadas previamente en placas Petri con el Medio de Cultivo 253 sólido, en 20 ml de Medio de Cultivo 253 líquido. Se centrifugó para distribuir apropiadamente los nutrientes del medio de cultivo durante 3 horas a 190 rpm a una temperatura de 37°C. Si bien la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria *Bacillus Pseudofirmus* es a los 30°C, el equipo agitador disponible en el laboratorio tenía calibrada la temperatura a los 37°C, bajo estas condiciones se han visto anteriormente resultados positivos para el crecimiento y esporulación (Stuckrath, Quantification of chemical and biological calcium carbonate precipitation: Performance of self-healing in reinforced mortar containing chemical admixtures, 2014).

Transcurrido el periodo se midió con el espectrofotómetro la densidad óptica de la suspensión, alcanzándose una D.O. de 0.95 con 620 nm de longitud de onda.

De la suspensión obtenida, se inoculó 200 µm y puso en 200 ml de medio mineral (Tabla 4-2). Los reactivos presentes en este medio llevan a la bacteria a formar esporas. Se deja la nueva suspensión agitando a 190 rpm a una temperatura de 37°C, durante toda la noche. La densidad óptica de la suspensión al día siguiente fue de 0.6, lo que representa una concentración de 10⁹ cel/ml.

Tabla 4 - 3: Medio mineral. Reactivos para un litro de solución.

Reactivo	Cantidad	Unid.
NH ₄ Cl	0.2	g
KH ₂ PO ₄	0.02	g
CaCl ₂ x2H ₂ O	0.298	g
KCl	0.2	g
MgCl ₂ x6H ₂ O	0.2	g
Extracto de levadura	0.1	g
MnSO ₄ xH ₂ O	0.009	g
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x2H ₂ O	5.88	g
NaHCO ₃	4.2	g
Na ₂ CO ₃	5.3	g
Agua destilada	1000	ml

Solución SL12B	1	ml
----------------	---	----

Tabla 4 - 4: Reactivos para 100 ml de solución SL12B.

Reactivo	Cantidad	Unid.
Na ₂ EDTA	3	g
FeSO ₄ x7H ₂ O	1.1	g
CoCl ₂ x6H ₂ O	190	mg
MnCl ₂ x4H ₂ O	61	mg
ZnCl ₂	42	mg
NiCl ₂ x6H ₂ O	24	mg
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	18	mg
H ₃ BO ₃	300	mg
CuCl ₂ x2H ₂ O	2	mg
Agua destilada	100	ml

Para garantizar la existencia de las esporas, se empleó el método de tinción de Schaeffer- Fulton (4.2.4). En la Figura 4-8 puede observarse de color verdoso las bacterias en forma de endosporas (flecha b), mientras que las bacterias que estaban aún activas (células vegetativas) se encuentran de color violeta (flecha a).

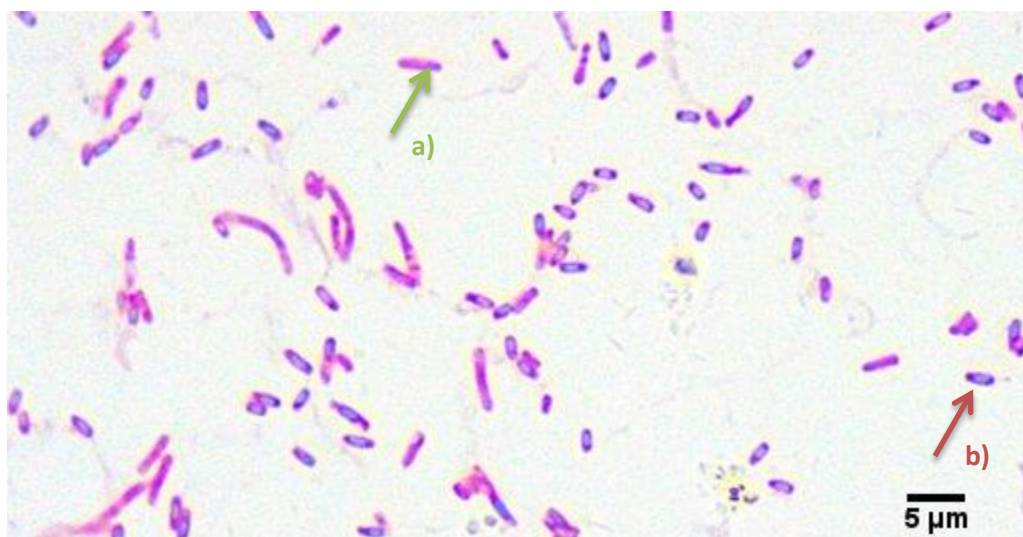


Figura 4 - 8: Bacterias en medio mineral. (a) Célula vegetativa. (b) Esporas teñidas con verde malaquita.

4.4 PREPARACIÓN DEL AGENTE DE AUTO-REPARACIÓN

La preparación del agente de auto-recuperación consiste en mezclar la suspensión con las endosporas de la bacteria, junto con una fuente de calcio (Lactato de Calcio) y algún nutriente (Extracto de Levadura) para que la bacteria se alimente cuando se active nuevamente. Posteriormente esta solución biológica se encapsula en un árido liviano.

4.4.1 LACTATO DE CALCIO Y EXTRACTO DE LEVADURA

La fuente de calcio seleccionada fue el Lactato de Calcio ($CaC_6H_{10}O_6$) marca *Aldrich* (Figura 4-9). El Lactato de Calcio es una sal que consta de dos aniones de lactato ($C_3H_5O_3^-$) por cada catión de calcio (Ca^{2+}). Es una de las principales fuentes de calcio que se usa como suplemento de calcio con fines médicos. Otros usos incluyen antiácidos, aditivos alimentarios e ingredientes en productos de higiene oral. No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento de la Unión Europea (REACH Parlamento Europeo, 2015).



Figura 4 - 9: Lactato de Calcio.

Se usó 200 gramos de Lactato de Calcio por cada litro de suspensión con bacterias, para obtener una cantidad mayor de agente de auto-reparación para sellar las grietas (Tziviloglou, Wiktor, & Jonkers, 2013), sin embargo según The DrugBank (version 5.0.11, released 2017-12-20) la solubilidad del Lactato de Calcio en el agua es de 191 g/L.

Para nutrir a las bacterias activadas durante la auto-reparación, se utilizó extracto de levadura. El extracto de levadura es un extracto soluble en agua de células de levadura autolisadas, está compuesto por aminoácidos, péptidos, vitaminas solubles en agua e hidratos de carbono y se puede usar como aditivo para medios de cultivo.

Según el proveedor *Merck KGaA*, la solubilidad del Extracto de Levadura es de 410 g/l, sin embargo sólo se utilizó 5 gramos de Extracto de Levadura por cada litro de suspensión con bacterias ya que el mejor rendimiento de la bacteria sería con esta cantidad (Zhang, y otros, 2017).

4.4.2 ARCILLA EXPANDIDA

El árido liviano seleccionado para el estudio corresponde a la arcilla expandida *AREXPAN*, producida en el norte de España por la empresa *ARCIRESA*. Tiene una granulometría de 0-4 mm (Tabla 4-5). Se seleccionó la arcilla expandida dado su bajo costo, disponibilidad, y su alto índice de porosidad (Paul & Lopez, 2011), lo cual otorga a las bacterias el espacio propicio para resguardarlas.

Tabla 4 - 5: Granulometría arcilla expandida *AREXPAN*. Peso total de la muestra: 391.7 gr.

Tamiz	Peso (g)	% Ret	% Pasa
3/8"	0.4	0.1	100
4	134.5	34.3	65.65
8	164.8	42	23.56
30	31.1	7.9	15.62
50	18.5	4.7	10.90
100	20.6	5.3	5.64
200	21.8	5.6	0.076

La absorción se determinó según el *"Paper towel method"*, especificado por la ASTM C1761-13b, 2013: "Standard Specification for Lightweight Aggregate for Internal Curing of Concrete". Se calcula mediante la fórmula 4-1:

$$\alpha = \frac{B-C}{C} \cdot 100\% \quad (4-1)$$

Donde *B* representa la masa del árido saturado superficialmente seco (sss) y *C* la masa del árido seco. Todas las pruebas de absorción se realizaron a una temperatura de 4°C debido a que es la temperatura que se usó para impregnar la suspensión con bacterias.

Se tamizó parte de la arcilla expandida entre la malla ASTM n° 4 (4.75 mm) y la malla 20 (850 µm).

Los tamices ASTM n° 5 (4 mm) y n° 18 (1 mm) que fueron utilizados por (Jonkers & Schlangen, 2008) no se encontraban disponibles en el laboratorio, por lo que se escogió los que más se ajustaban.

Se comparó la absorción de la arcilla expandida utilizando toda su granulometría y la arcilla expandida tamizada, con el propósito de seleccionar aquella que pudiera absorber una mayor cantidad de solución biológica.

En Figura 4-10 se compara la absorción para la arcilla expandida tamizada y sin tamizar para 1, 2 y 3 días.

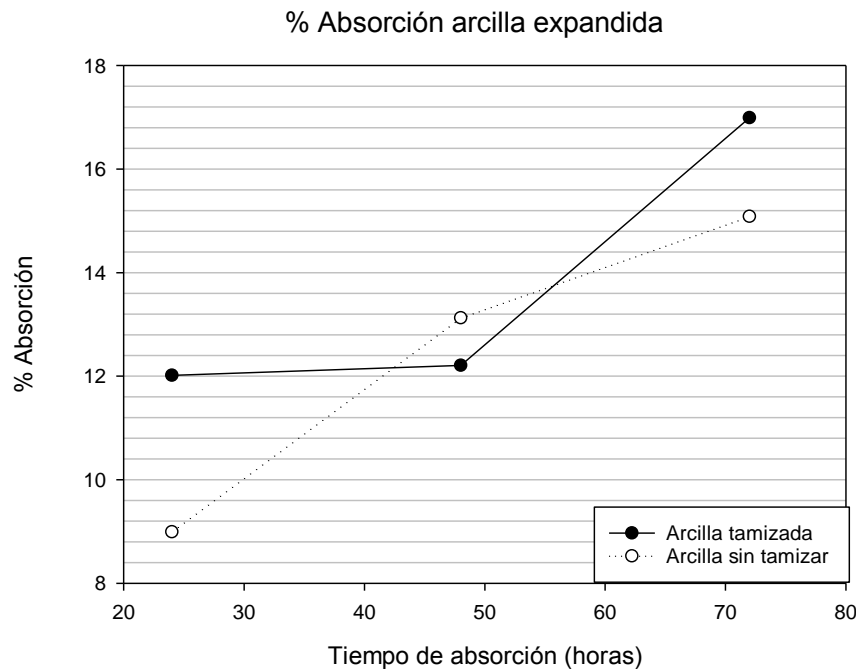


Figura 4 - 10: Porcentaje de absorción de la arcilla en el tiempo.

A los 3 días de absorción la arcilla expandida tamizada tuvo una absorción de 16.99% mientras que la arcilla expandida sin tamizar 15.08%. A los 2 días la diferencia entre la arcilla expandida tamizada y sin tamizar fue más estrecha, con 12.21% para la arcilla tamizada y 13.12% para la arcilla sin tamizar. A las 24 horas la diferencia de absorción fue mayor, con 8.99% para la arcilla sin tamizar y 12.01% de la arcilla tamizada.

Se busca que la etapa de absorción sea breve, ya que gran parte de las bacterias podría dejar su estado de espora y activarse, es por esto que se utilizó la arcilla tamizada durante 24 horas absorbiendo la solución biológica cada vez que se fabricaron las probetas de hormigón.

La variación de la absorción en el tiempo de la arcilla expandida tamizada entre las mallas n°4 y n°20 se presenta en la Tabla 4-6.

Tabla 4 - 6: Porcentaje de absorción de la arcilla expandida tamizada entre las mallas n°4 y n°20.

Tiempo [hr]	4	24	48	72
% Absorción	7.74	12.01	12.21	16.99

El valor de la absorción usada para las 24 horas fue de 12% del peso de la arcilla, según esto se cuantificó la cantidad de solución biológica para producir el agente de auto-reparación.

4.4.3 IMPREGNACIÓN EN ARCILLA EXPANDIDA

Se secó la arcilla expandida en el horno por 24 horas, y luego se dejó enfriar hasta temperatura ambiente.

Se preparó la solución biológica mezclando la suspensión con bacterias (4.3.2), Lactato de Calcio y Extracto de Levadura (Tabla 4-7).

La cantidad de solución biológica usada correspondió al 12% del peso de la arcilla.

Tabla 4 - 7: Dosificación para Agente de Auto-Reparación.

Suspensión con Bacterias %	12
Lactato de Calcio g/l	200
Extracto de Levadura g/l	5

Se impregnó la arcilla con la solución biológica en bolsas herméticas de plástico. Se guardaron las bolsas cerradas, para disminuir la difusión de oxígeno, durante toda la noche a una temperatura de 4°C y así disminuir el riesgo de activación de las bacterias.



Figura 4 - 11: Bolsa de plástico con el Agente de Auto-reparación.

Se realizó la impregnación de la arcilla con la suspensión biológica durante tres días. 24 horas luego de cada impregnación se verificó la presencia de la bacteria, por lo que se tomó una muestra y se determinó su concentración mediante el método NMP descrito anteriormente. Los resultados se presentan en la Tabla 4-8.

Tabla 4 - 8: Concentración de bacterias en el agente de auto-reparación mediante el método del NMP.

Día	Concentración de bacterias cel/ml
1	1.56.E+07
2	3.38.E+07
3	1.47.E+07
Promedio	2.14.E+07

5. METODOLOGÍA PARA LA PREPARACIÓN DEL HORMIGÓN PARA VERIFICAR AUTO-REPARACIÓN Y RESISTENCIA A COMPRESIÓN

5.1 INTRODUCCIÓN

La fabricación de un hormigón auto-reparable tiene un costo mayor al de uno tradicional dados los gastos asociados a la producción y protección de la bacteria. Se estima que un hormigón auto-reparable tiene el doble del costo de un hormigón tradicional (Huanga, Yeb, Qian, & Schlangen, 2015), es por esto que se fabricó el hormigón empleando los métodos regulares que se siguen en un laboratorio de obras civiles, exceptuando el agente de auto-reparación que se describió en el capítulo 4, para no seguir encareciéndolo.

Manteniendo la línea de fabricación convencional del hormigón, los materiales y equipos usados no fueron esterilizados previamente. Sin embargo, una vez fabricadas las probetas de hormigón auto-reparable, se desinfectaron todos aquellos materiales y equipos que tuvieron contacto con el agente de auto-reparación. Si bien la bacteria *Bacillus Pseudofirmus* no es patógena como se mencionó en la sección 2.3.4, se tomó esta medida para prevenir su proliferación.

Posteriormente se procedió a la fabricación de las probetas prismáticas que se utilizaron para verificar la auto-reparación, y las probetas cúbicas que se ensayaron para el estudio de la resistencia a compresión.

Las probetas prismáticas fueron agrietadas siguiendo parte de la metodología llevada a cabo por la *Delft University of Technology* (Jonkers & Schlangen, 2008), con el propósito de impedir que se fracturaran totalmente y para obtener grietas de anchos aproximadamente menores a 1 mm, ya que, según los resultados de investigaciones anteriores, el mayor ancho inicial que ha logrado auto-reparar fue de 0.46 mm (Wiktor & Jonkers, 2011)

Para la ejecución de los ensayos a compresión se siguió las especificaciones de la ASTM C 109/C 109M: *Standard Test Method for Compressive Strength of Hydraulic Cement Mortars (Using 2-in. or [50-mm] Cube Specimens)*.

5.2 FABRICACIÓN DE PROBETAS DE HORMIGÓN

5.2.1 MATERIALES

Agua

Se utilizó agua potable procedente de la empresa Aguas Cordillera S.A. para la fabricación, curado y auto-reparación de las probetas de hormigón.

El agua potable de Aguas Cordillera cumple con todas las normas vigentes de la calidad del agua en Chile (Anexo B).

Además, se analizó el contenido de los principales cationes y aniones del agua una vez finalizada la auto-reparación para observar como variaron las concentraciones (6.5.2)

Arena

Se usó arena fina marca Easy, de origen chileno. En la Tabla 5-1 se presenta su granulometría determinada mediante la norma NCh 165 Of 77.

Tabla 5 - 1: *Granulometría Arena Fina. NCh 165 Of 77.*

Malla	Promedio retenido [g]	%Retenido	%Retenido acumulado	% Pasante
4	0	0	0	100
8	0.16	0.07	0.07	99.93
10	0.05	0.02	0.09	99.91
30	2.34	1	1.09	98.91
50	28.68	12.34	13.43	86.57
100	111.95	48.18	61.61	38.39
Fondo	89.21	38.39	100	0

Para la fabricación de las probetas de hormigón, no se usó toda la granulometría de la arena, ésta fue tamizada de manera mecánica, entre los tamices normados por la ASTM e-11/2009 n° 20 (850 µm) y n° 100 (150 µm). Los tamices ASTM n° 18 (1 mm) y n° 120 (125 µm) que fueron utilizados por Jonkers (2008) no se encontraban disponibles en el laboratorio, por lo que se escogió los que más se ajustaban.

Para establecer la dosificación de la mezcla se determinó la absorción y densidad de la arena ya tamizada, según la norma NCh 1117 Of 77. Los resultados se presentan en la Tabla 5-2.

Tabla 5 - 2: Densidad sss, densidad seca y absorción de arena fina tamizada.

Densidad Real sss kg/m ³	2455.99
Densidad Real Seca kg/m ³	2432.86
Absorción %	0.95

Cemento

Para el análisis se utilizaron dos tipos de cemento: Portland y Puzolánico con el propósito de comparar los resultados en las probetas auto-reparadas fabricadas con cada uno de ellos (Sección 3.12.).

El cemento fue proporcionado por la empresa chilena Cementos Bicentenario SA (BSA). BSA PREMIUM es un cemento con un alto grado de resistencia, correspondiente a un cemento tipo Portland. BSA ESPECIAL está compuesto principalmente por clínker, yeso y puzolanas por lo que clasifica como cemento Puzolánico. Ambos cumplen con los requerimientos de la norma NCh 148 Of .68 para su clasificación (Ficha técnica proporcionada por la empresa en el Anexo C).

Según la norma NCh 154 Of 69 se determinó el peso específico relativo del cemento, que consiste en establecer una relación entre una masa de cemento y el volumen de líquido que esta masa desplaza en un matraz. Se calcula según la siguiente expresión:

$$P_{e\text{relativo}} = \frac{m}{V_2 - V_1}$$

Donde m es la masa de la muestra de cemento y $V_2 - V_1$ es el volumen del líquido desplazado por la muestra. La densidad se determinó con el propósito de establecer la cantidad de cemento en la dosificación de la mezcla.

Los resultados del peso relativo del cemento Portland y Puzolánico se presentan en la Tabla 5-3.

Tabla 5 - 3: Peso Específico determinado con según norma NCh 154 Of 69.

Tipo de Cemento	Volumen 1 (ml)	Volumen 2 (ml)	Peso cemento (g)	Pe (g/ml)	Pe (g/ml) promedio
Puzolánico	250.20	270.50	64.00	3.15	3.15
	250.30	270.70	64.00	3.14	
	250.30	270.60	64.00	3.15	
Portland	250.40	270.50	64.00	3.18	3.19
	250.80	270.80	64.00	3.20	
	250.90	271.00	64.00	3.18	

Agente de auto-reparación

Consiste en la arcilla expandida impregnada con la suspensión de bacterias *Bacillo Pseudofirmus*, Lactato de Calcio y Extracto de Levadura. El proceso de preparación del agente se describe en la sección 4.4.

5.2.2 PROCEDIMIENTO

Se confeccionó el hormigón utilizando una mezcladora Hobart modelo HL120 (Figura 5-1a). Se puso el agua en el recipiente de la mezcladora y luego se incorporó el cemento. Se mezcló durante 30 segundos en el nivel 1 (107 rpm). Se incorporó la arena y el agente de auto-reparación. Para evitar el contacto directo con la bacteria se utilizaron guantes quirúrgicos en la manipulación del agente de auto-reparación. Se mezcló durante 30 segundos en el nivel 1. Se removió el mortero adherido en la superficie de la mezcladora y se dejó reposar por 60 segundos. Se volvió a mezclar el mortero durante 60 segundos en el nivel 2 (198 rpm). La mezcla se puso en moldes para probetas prismáticas de 16x4x4 cm y probetas cúbicas de 5x5x5 cm (Figura 5-1b-1c).



Figura 5 - 1: a) Mezcladora Hobart modelo HL120. b) Molde para probetas cúbicas 5x5x5 cm. c) Molde para probetas prismáticas 16x4x4 cm.

Las probetas prismáticas se reforzaron con dos fierros de acero galvanizado corriente BCC (Bajo Contenido de Carbono) de 2.11 mm de diámetro. Se compactó el hormigón en las probetas por vibración externa, que consiste en poner los moldes fijos en una placa con una frecuencia de vibración de al menos 50 s-1. Luego de compactar se enrasó la superficie de las probetas con una espátula y se cubrieron con un film plástico para conservar la humedad. Se dejaron las probetas en los moldes a temperatura ambiente (NCh 1017 OF 75).

Las probetas se desmoldaron luego de 24 horas y se dejaron en un recipiente con agua potable durante 28 días para aumentar su resistencia. Si bien el hormigón continúa ganando resistencia incluso luego del año de fabricación, a los 28 días la tasa de aumento disminuye. Esto se puede observar en la Tabla 5-4, que proporciona valores estimados del porcentaje de resistencia que gana en relación a los 28 días (EHE, 2008). Visto de manera práctica, en la mayoría de las obras no se espera más de este tiempo para someter a la estructura a las condiciones normales que deberá soportar.

Tabla 5 - 4: Porcentaje de resistencia a compresión según la edad del hormigón en relación a los 28 días.

Edad del hormigón (días)	3	7	28	90	360
Hormigones de endurecimiento normal	0.4	0.65	1	1.2	1.35
Hormigones de endurecimiento rápido	0.55	0.75	1	1.15	1.2

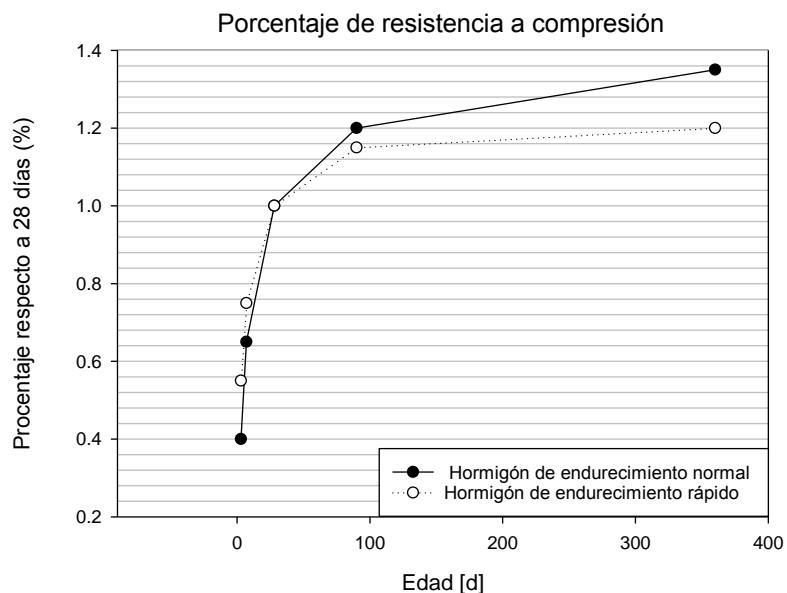


Figura 5 - 2: Gráfico de resistencia a compresión según edad del hormigón.

En el caso de las probetas cúbicas se mantuvieron sumergidas por 3, 7 y 28 días, según indica el ensayo de compresión (Sección 5.4.)

En la Tabla 5-5 se especifica la dosificación del hormigón, en donde se consideró una elevada relación de agua/cemento (0.5) con el propósito de que la mayoría de las partículas de cemento queden hidratadas, y así aislar el efecto de auto-reparación autógena del hormigón (Sección 2.2.1).

Tabla 5 - 5: Dosificación.

Materiales	Cantidad (Kg/m ³)
Cemento*	530
Arcilla Expandida	300
Arena	690
Agua	265
a/c	0.5
% Total de árido	56.5

El agente de auto-reparación estudiado podría aplicarse en hormigón sumergidos, por lo que se optó cumplir con la especificación para la dosificación de cemento de la norma NCh 170 que propone una cantidad mínima de 400 kg/m^3 para hormigones sumergidos.

5.3 INDUCCIÓN DE GRIETAS EN LAS PROBETAS PRISMÁTICAS DE HORMIGÓN

Las grietas se formaron mediante la prensa hidráulica utilizada para el *Ensayo de Tracción por Flexión NCh1038*. Se apoyaron los prismas de hormigón dejando una luz de ensayo L de 10 cm para luego aplicar una carga en el centro que se fue aumentando constantemente como se muestra en la Figura 5-3. La carga se aplicó en la cara de llenado de las probetas debido a la ubicación de los fierros.

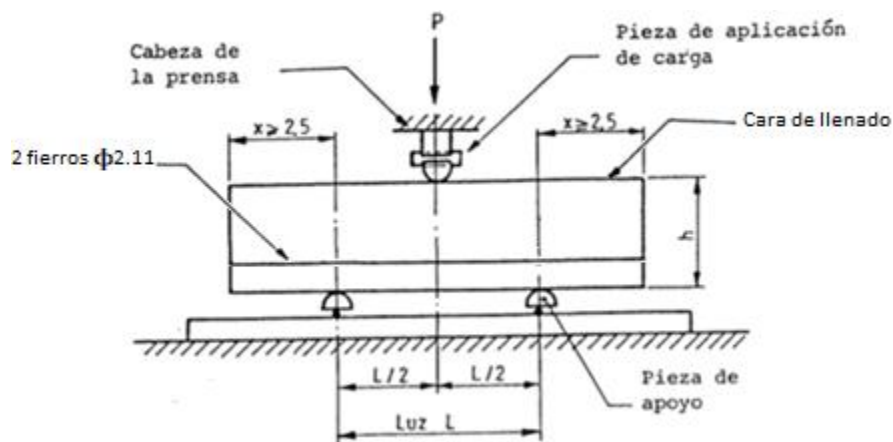


Figura 5 - 3: Esquema de ensayo de tracción por flexión con carga P aplicada en el centro de la luz L .

El control de la aplicación de la carga fue manual. Se detuvo la carga al momento de escuchar el crujido de la grieta, por lo que las cargas fueron variando según la resistencia de cada probeta de hormigón. Algunas probetas fueron descartadas ya que se fracturaron totalmente.

El promedio de las cargas aplicadas para obtener las grietas en cada tipo de mezcla se presentan en la Tabla 5-6.

Tabla 5 - 6: Promedio de las cargas aplicadas para agrietar las probetas prismáticas según tipo de mezcla.

Tipo de Mezcla	Máx Carga [kN]	Resistencia [MPa]	Desv	%C.V
LPT	3.53	13.17	0.16	1.19
BPT	3.41	12.64	0.56	4.46
CPT	3.67	13.66	0.40	2.92
LPZ	4.31	16.00	0.39	2.45
BPZ	4.05	15.08	0.61	4.01
CPZ	3.99	14.83	0.13	0.90

Donde PT es el cemento Portland, PZ cemento Puzolánico, C arcilla con agua (control), L arcilla con lactato de calcio y B arcilla con bacterias y lactato.

La Figura 5-4 muestra una probeta antes y luego de aplicar la carga.

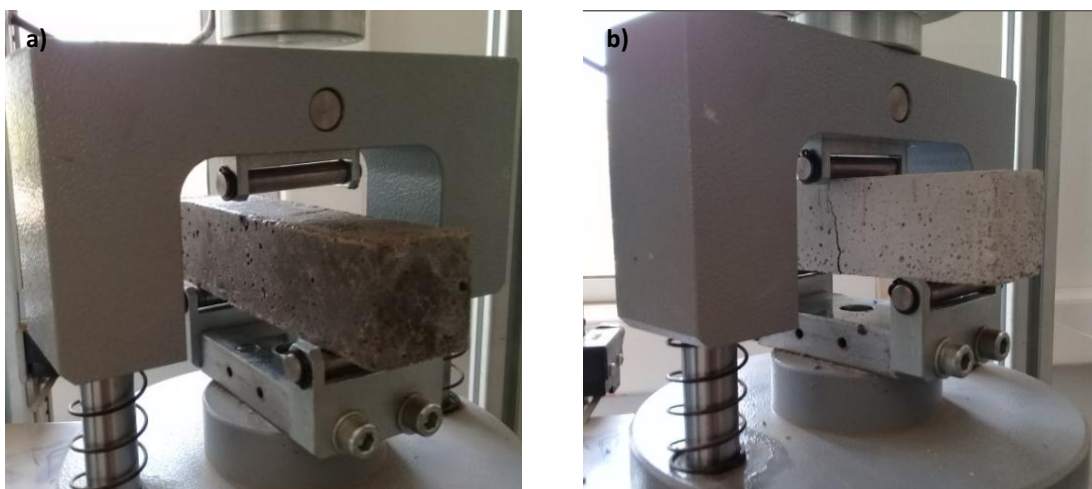


Figura 5 - 4: a) Probeta ubicada en la prensa hidráulica antes de ser cargada. b) Probeta agrietada.

5.4 ENSAYO A COMPRESIÓN DE PROBETAS CÚBICAS.

El ensayo a compresión de la ASTM C 109/C 109M para cubos de arista 50 mm proporciona un medio para determinar la resistencia a la compresión del hormigón y predecir así su desempeño en las obras de construcción. Es importante este análisis dado que la resistencia a la compresión es la principal característica mecánica del hormigón.

Para el ensayo se utilizó una prensa con placas de carga de arista igual a 5 cm. Antes de iniciar el ensayo se limpió la superficie de ambas placas.

Se retiraron las probetas del agua y se ubicaron en la prensa como se indica en la Figura 5-5. Las caras más planas se pusieron en las placas de carga, mientras que la cara de llenado se ubicó perpendicular a estas.

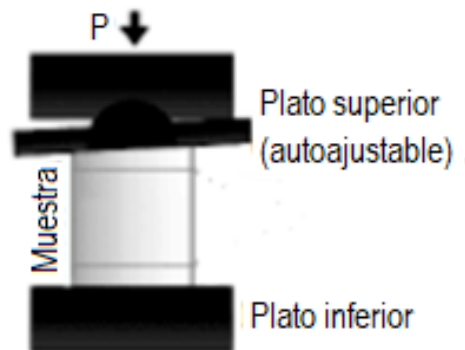


Figura 5 - 5: Esquema ensayo a compresión.

Se aplicó la carga de manera uniforme a una velocidad constante de 1900 [N/s]. Las probetas se ensayaron a los 3, 7 y 28 días. Para cada mezcla se ensayaron 3 probetas por día para obtener el promedio de los 3 resultados (Sección 6.3).

Los resultados de compresión entregados por el equipo corresponden a la carga máxima que soporta la probeta dividida por el área de la superficie cargada. (5-1)

$$f_m = \frac{P}{A} \quad (5-1)$$

Donde f_m corresponde a la resistencia a compresión en MPa, P es la carga máxima total en N, y A es el área de la superficie cargada en mm².

En la siguiente figura se presenta el equipo utilizado tanto para el ensayo a compresión como para la inducción de las grietas.

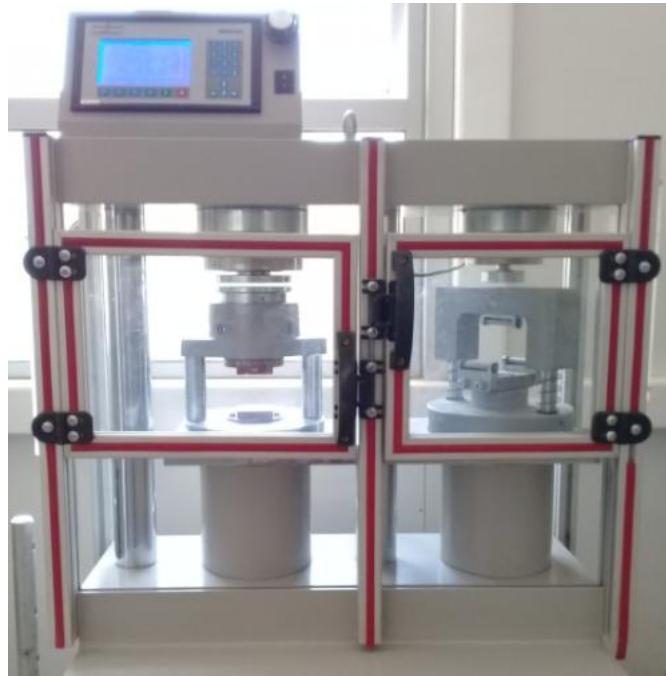


Figura 5 - 6: A la izquierda prensa para ensayo a compresión. A la derecha prensa para ensayo de tracción por flexión.

6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 INTRODUCCIÓN

Los resultados que se muestran en este capítulo corresponden a análisis cuantitativos y cualitativos de los componentes involucrados en la investigación.

En primer lugar se hizo un seguimiento de la bacteria *Bacillus Pseudofirmus* mediante el Método del Número más Probable (NMP) (Sección 4.2.2) para asegurar su viabilidad y observar su evolución durante el experimento.

Como se mencionó en el capítulo tres, se analizó el efecto del agente de auto-reparación en las propiedades mecánicas que podría aportar al material y en la auto-reparación como tal. Para el análisis enfocado en las propiedades mecánicas se estudió la resistencia a compresión, según el ensayo descrito en la sección 5.4. Por otro lado, el fenómeno de la auto-reparación se cuantificó mediante el análisis de imágenes periódicas obtenidas de las probetas con el software ImageJ.

Complementario a estos análisis se estudiaron los materiales y la interacción que tuvieron según tres técnicas: Cromatografía de líquidos, Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Con la cromatografía de líquidos se buscó una relación entre el agua antes de iniciado el proceso de auto-reparación, y luego de dos meses de contener a las probetas auto-reparadas, ya que los elementos presentes en el agua utilizada podrían afectar directamente el proceso.

Mediante DRX y SEM, se definieron los compuestos que conforman el material de sellado y la relación que podría existir con los otros materiales del hormigón.

El esquema de la Figura 6-1 muestra todos los análisis realizados y los elementos asignados a cada uno.

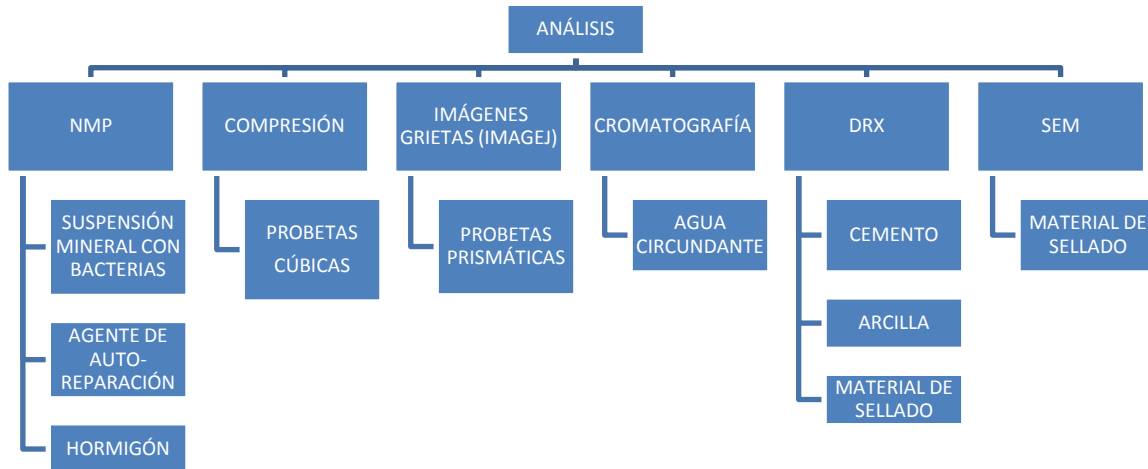


Figura 6 - 1: Esquema de los análisis realizados.

6.2 MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE

Durante tres etapas del experimento se realizó el seguimiento de la bacteria *Bacillus Pseudofirmus* mediante el método del número más probable (NMP) descrito en la sección 4.2.2, con el propósito de verificar la viabilidad de la bacteria, es decir, poder asegurar que las bacterias continuaran vivas en el proceso y que serán capaces de realizar posteriormente la auto-reparación del hormigón.

Las etapas en que se examinó la viabilidad de las bacterias se muestran en Figura 6-1.



Figura 6 - 2: Etapas para el método NMP.

Se realizó el análisis de NMP a la preparación de la suspensión de medio mineral con bacterias (Sección 4.3) dado que es el punto inicial del experimento. Aquí, además de asegurar la viabilidad de las bacterias, es importante cuantificar una concentración alta de éstas, pues inevitablemente la tasa irá disminuyendo durante el proceso.

Se continuó el análisis de NMP al momento en que concluyó la preparación del agente de auto-reparación (sección 4.4), vale decir, una vez que la arcilla queda impregnada con la suspensión biológica, el lactato de calcio y el extracto de levadura. En esta etapa la bacteria pasa de estar en un medio líquido a uno sólido, por lo que se considera un punto crítico en el estudio.

El último análisis de NMP fue al hormigón ya fabricado. Se procedió a medir las bacterias en el hormigón a los 5 días y luego al mes de su preparación. Al ser el hormigón un material mucho menos homogéneo que la suspensión de medio mineral con bacterias y que el agente de auto-reparación, la estimación de la concentración de bacterias es menos confiable. Sin embargo encontrar bacterias viva en esta etapa es crucial para que el desarrollo del experimento.

6.2.1 Suspensión de Medio Mineral con Bacterias

Se realizó NMP durante 4 días consecutivos, comenzando con el primer día de preparada la suspensión de medio mineral con bacterias descrita en la sección 4.3.2. Los resultados se presentan en la Tabla 6-1.

Tabla 6 - 1: Resultados de NMP para la suspensión con medio mineral con bacterias mediante el método del NMP.

Día	Dilución					NMP	N° de Bacterias
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷		
1	5	5	5	1	3	4532	9.06.E+08
2	5	5	5	5	0	23054	4.61.E+09
3	5	5	3	0	1	780	1.56.E+08
4	5	5	4	1	0	1690	3.38.E+08

Se observa que la suspensión de medio mineral con bacterias durante los primeros 4 días mantiene un número significativo de bacterias, con un promedio de 1.5×10^9 cel/ml lo que sería suficiente para lograr la auto-reparación (Jonkers, Thijssen, Muyzer, Copuroglu, & Schlangen, 2010). Para mantener esta concentración se dejó la suspensión almacenada a una temperatura de 4°C.

Se ve un aumento de la concentración al segundo día de preparada la suspensión, esto puede deberse a un error de precisión al momento de tomar la muestra, pero no se puede descartar que se haya generado una activación de las bacterias y con esto una continuación en el proceso de reproducción. Los días 3 y 4 se ve una disminución de las bacterias, que puede ser por el mismo

error de precisión de la muestra o porque efectivamente disminuyen las bacteria viables en la suspensión. Para evitar un error por la variación de las bacterias viables, se sugiere que la arcilla se impregne el primer día de preparada la suspensión, de este modo se aísla esta variable del estudio.

6.2.2 Agente de Auto-reparación

Se preparó el agente de auto-reparación (sección 4.4) durante tres días consecutivos con la misma suspensión de medio mineral con bacterias.

24 horas luego de cada impregnación se tomó una muestra para el análisis del NMP.

Los resultados obtenidos luego del conteo del NMP se presentan en la Tabla 6-2.

Tabla 6 - 2: Concentración de bacterias en el agente de auto-reparación mediante el método del NMP.

Día	Concentración de bacterias cel/g Valor teórico	Concentración de bacterias cel/g NMP	Diferencia Valor teórico - NMP cel/ g
1	5.53.E+08	1.56.E+07	5.37.E+08
2	1.87.E+07	3.38.E+07	-1.51.E+07
3	4.06.E+07	1.47.E+07	2.59.E+07

El valor teórico de la concentración de bacterias, se calculó según la Fórmula 6-1.

$$Conc. Bacterias 2 \frac{cel}{g} = Conc. Bacterias 1 \frac{cel}{ml} \cdot 0.12 \frac{ml}{g} \quad (6-1)$$

Donde *Conc. Bacterias 2* corresponde al valor teórico de bacterias en el agente de auto-reparación, *Conc. Bacterias 1* es la cantidad de bacterias encontradas anteriormente en el medio mineral (Tabla 6-1) y 0.12 es la dosificación de medio mineral utilizado en la arcilla (12 ml por 100 gr de arcilla).

Según la Tabla 6-2 el primer día de preparado el agente de auto-reparación habría una disminución considerable de bacterias durante el proceso de preparación del agente, el valor esperado era de 5.53×10^8 cel/g, lo que indica una disminución de 5.37×10^8 cel/g.

La diferencia entre el valor teórico y el real se estrecha durante los días 2 y 3. El día 2, hubo 1.51×10^7 cel/ ml más que al valor esperado y para el día 3 hubo 2.59×10^7 cel/ml menos al valor esperado.

Los valores obtenidos reflejan una precisión baja del método para este tipo de ensayos, pues la muestra era sólida (arcilla) y por lo tanto menos homogénea que las muestras líquidas. Los resultados sugieren que se realice un estudio más acabado de la evolución de la bacteria en este punto del experimento. Sin embargo para los objetivos de la investigación, los resultados son apropiados para suponer que existió un número razonable de bacterias para lograr la auto-reparación del hormigón.

6.2.3 Hormigón Auto-reparable.

Finalmente se determinó la concentración de bacterias en el hormigón. Se tomó una muestra del hormigón fresco y se analizó mediante NMP. Se repitió el procedimiento a los 28 días de preparado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6-3.

Tabla 6 - 3: Concentración de bacterias en hormigón auto-reparación mediante el método del NMP.

Día	Dilución					NMP	Concentración de bacterias cel/ml
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}		
0	4	1	0	0	0	16	3.20.E+06
28	3	2	0	0	0	13	2.60.E+06

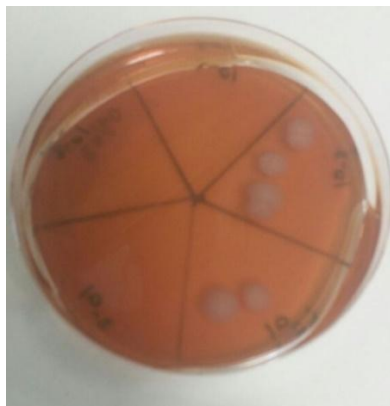


Figura 6 - 3: Placa Petri con los resultados del NMP para una muestra de hormigón luego de 28 días de curado.

El hormigón se fabricó con el agente de auto-reparación del día 1 (Tabla 6-2). El valor teórico de bacterias en el hormigón se calculó con la Fórmula (6-2)

$$\text{Conc. Bacterias } 3 \frac{\text{cel}}{\text{ml}} = \text{Conc. Bacterias } 2^* \frac{\text{cel}}{\text{g}} \cdot 0.3 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \quad (6-2)$$

Donde *Conc. Bacterias 3* corresponde al valor teórico de bacterias en el hormigón y *Conc. Bacterias 2** es el valor de la concentración de bacterias encontradas en el agente de auto-reparación el día 1. La cantidad de agente de auto-reparación usado fue de 300 g/m³ (0.3 g/ml).

Acorde a la concentración encontrada de bacterias en el agente de auto-reparación en la sección 6.1.2 la concentración de bacterias esperada era de 4.7 x10⁶ cel/ml. La cantidad encontrada según NMP fue menor a la esperada por 1.5 x10⁶ cel/ml. Este resultado mantiene el orden de magnitud esperado por lo que sigue cumpliendo con una cantidad apropiada de bacterias para la auto-reparación, pero posiblemente durante el proceso de mezclado del hormigón parte de las bacterias murieron.

La concentración de bacterias a los 28 días disminuyó 6.0 x10⁵ cel/ml. La cantidad de bacterias encontradas continúa siendo óptima para el proceso, pero durante el periodo de curado es posible que parte de las bacterias se activaran y por lo tanto no soportaran las condiciones en el hormigón.

Los resultados obtenidos carecen de precisión dado que el hormigón no es un material homogéneo y dependerán de la muestra extraída. Sin embargo, este tipo de análisis contribuyó a tener una respuesta positiva sobre la permanencia de las bacterias viables en el hormigón luego del mezclado y de la fase de curado.

6.3 COMPARACIÓN RESISTENCIA A LA COMPRESIÓN

Los resultados obtenidos en el ensayo de resistencia a la compresión (Sección 5.4) para cada mezcla con cemento Portland a los 3, 7, y 28 días se presentan en la Tabla 6-4

Tabla 6 - 4: Resultados Resistencia a Compresión en MPa.

Día	Mezcla	Lecturas	Promedio	Desv.	%C.V.
3	Bacteria Portland	32.28	32.01	0.50	1.55
		32.32			
		31.44			
	Control Portland	28.28	28.64	1.03	3.59
		27.84			
		29.8			
	Lactato Portland	33.76	32.92	0.76	2.31
		32.28			
		32.72			
7	Bacteria Portland	41.76	40.25	2.51	6.23
		37.36			
		41.64			
	Control Portland	36.28	36.81	0.96	2.60
		36.24			
		37.92			
	Lactato Portland	42.76	40.72	3.19	7.84
		42.36			
		37.04			
28	Bacteria Portland	45.68	42.89	2.48	5.79
		42.08			
		40.92			
	Control Portland	42.72	43.11	2.48	5.76
		40.84			
		45.76			
	Lactato Portland	41.76	41.68	1.12	2.69
		42.76			
		40.52			

Tabla 6 - 5: Porcentaje de variación de la resistencia a la compresión con las probetas de control como referencia.

Día	3	7	28
Bacteria Portland	11.78%	9.34%	-0.49%
Control Portland	-	-	-
Lactato Portland	14.94%	10.61%	-3.31%

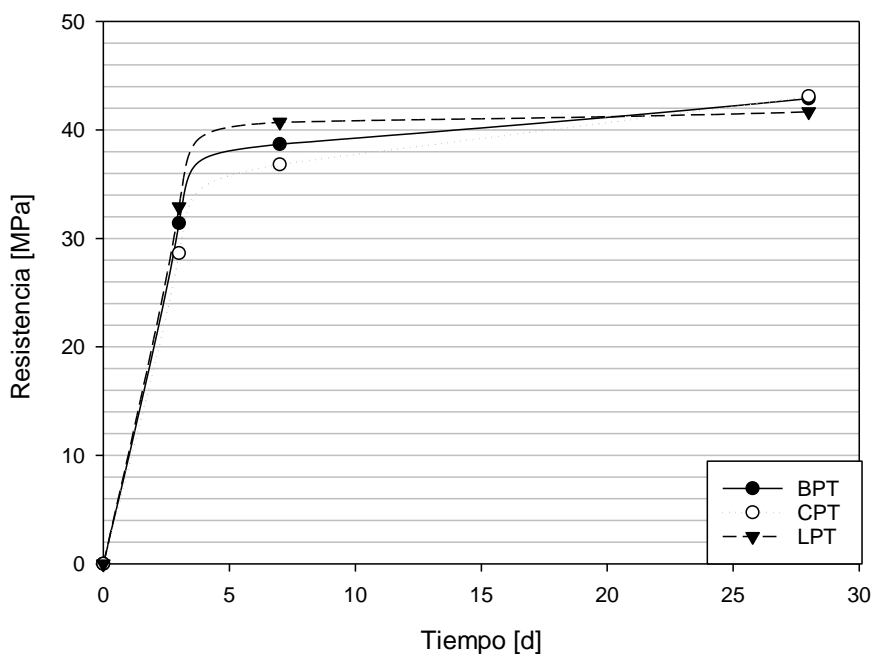


Figura 6 - 4: Resistencia a la compresión para los 3, 7 y 28 días.

De los resultados anteriores se observa que los tres tipos de mezcla presentan la misma tendencia, luego de los 7 días las tasas de crecimiento disminuyen y finalmente a los 28 días mantienen una resistencia bastante similar entre las tres.

La Tabla 6-5 muestra que a los tres días de preparadas las mezclas, las probetas con lactato de calcio (PTL) y con lactato de calcio más bacterias (PTB) presentan la resistencia más elevada, con un 14.94% y 11.78% más que el promedio de las probetas de control.

A los 7 días continúa siendo mayor la resistencia de las probetas con lactato de calcio en comparación a las de control, con un 10.61% más para la mezcla PTL y un 9.34% para la mezcla PTB. El que ambas mezclas contengan lactato de calcio sugiere un aumento en la resistencia a la compresión debido a la incorporación de lactato de calcio, y no al factor biológico (bacterias).

Incluso la suspensión con bacterias podría afectar negativamente al aporte del lactato de calcio dado su menor valor en comparación a las PTL.

Finalmente, a los 28 días se obtuvieron resultados bastante similares, siendo mayor el promedio de la resistencia de las probetas de control. La mezcla PTL fue un 0.49% menor a la de control, mientras que la PTB fue un 3.31%. Estos resultados podrían apuntar a que si bien existe un efecto del lactato de calcio, este aceleraría el aumento de la resistencia a la compresión, pero que finalmente mantiene el mismo potencial mecánico que un hormigón convencional.

A diferencia de ciertas bacterias ureolíticas en que se ha visto que aumentan la resistencia a la compresión (Vijay, Murmu, & Deo, 2017), el agente de auto-reparación usado no tendría un efecto positivo en la resistencia a la compresión, pero tampoco tendría un efecto negativo como han planteado otros investigadores (Jonkers & Schlangen, 2008). Sin embargo se sugiere estudiar otras dosificaciones para el hormigón y distintas concentraciones de bacterias para poder optimizar la mezcla, además de estudiar en mayor detalle el posible efecto del lactato de calcio, u otras fuentes de calcio.

6.4 ANÁLISIS DE IMÁGENES

La cuantificación de la auto-reparación de las grietas en el hormigón se llevó a cabo mediante dos análisis visuales. El primero considera el área total sellada de cada grieta y el segundo el espesor de la grieta en 7 puntos de cada probeta.

Periódicamente se controlaron los especímenes y se fotografiaron desde una distancia fija de 15 cm con una cámara *FUJIFILM X10*, para posteriormente analizar las fotografías con el software *ImageJ*.

Los días designados para tomar las fotografías se muestran en la Tabla 6-6, siendo el día 0 cuando se agrietaron las probetas y se dejaron sumergidas en agua luego de agrietarse.

Tabla 6 - 6: Fotografías a las probetas.

Control	1	2	3	4	5	6
Día	0	7	14	21	35	63

6.4.1 Auto-reparación según porcentaje de área sellada

El software utilizado para el análisis permite calcular las áreas de las grietas seleccionándolas según su color, es por esto que las imágenes se llevaron a un formato de 8-bit, lo que significa que la imagen estará en escala de grises pudiendo tener hasta 256 niveles de gris. Para discriminar de aquellos oscurecimientos de la imagen por la humedad se aplicó la opción *threshold* que permite umbralizar imágenes para separar según las características de interés. Finalmente con la opción *wand* se seleccionó el área de la grieta a medir.

El porcentaje de auto-reparación en el tiempo t según el área se calculó la fórmula (6-3).

$$\text{Auto-reparación}_{\text{área } t} \% = \frac{a_i - a_t}{a_i} \cdot 100\% \quad (6-3)$$

Dónde, a_i : Área inicial de la grieta a partir del mayor espesor de la grieta más angosta, y a_t : Área de la grieta en el tiempo t

Se consideró para los resultados el promedio de 3 grietas de distintas probetas. En el caso de aquellas variables en que una de sus probetas se fracturó totalmente, se utilizó una probeta ya fotografiada, pero por su otra cara (cara paralela).

En la Figura 6-5 se muestra cómo se registró el avance de la auto-reparación en el tiempo.

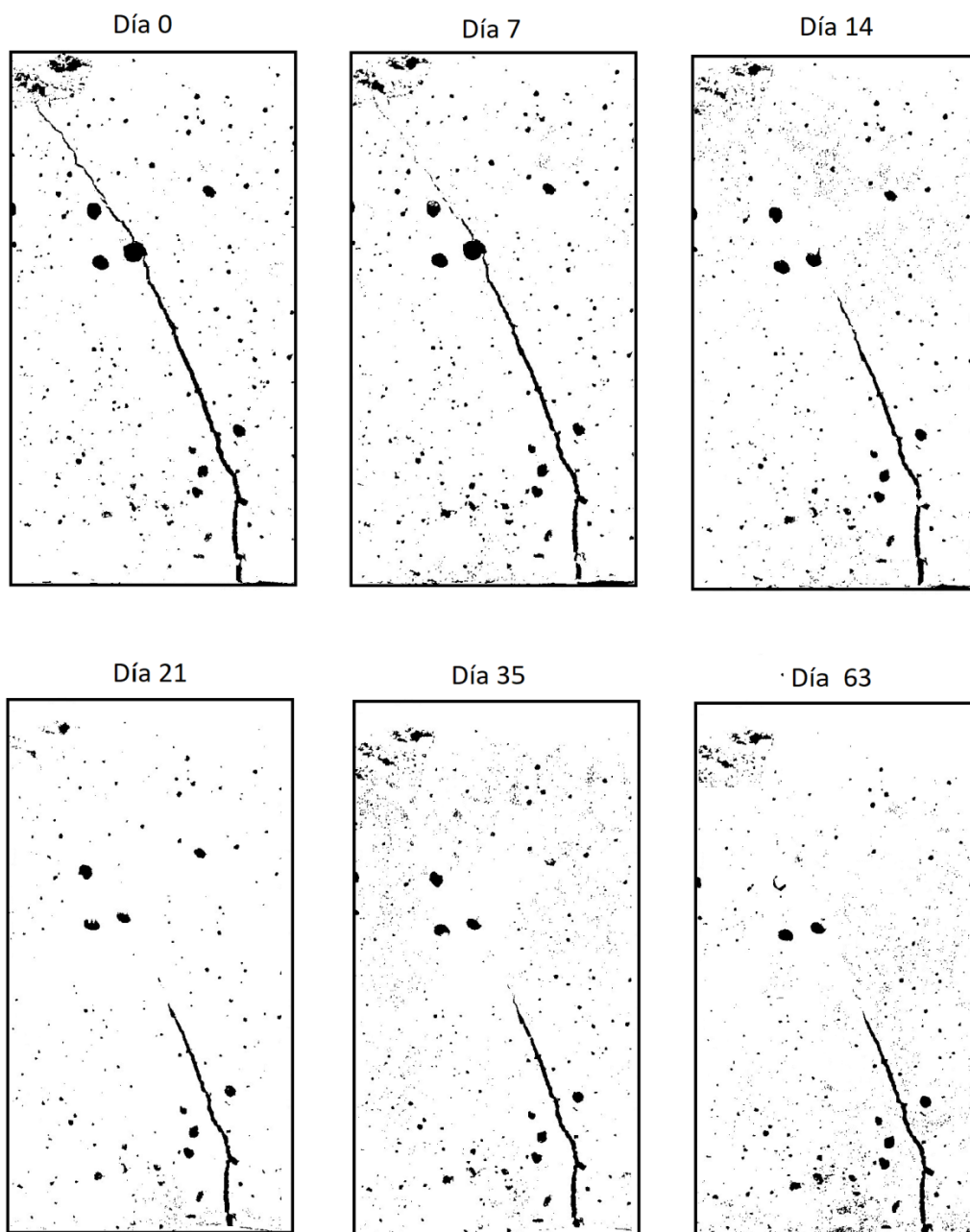


Figura 6 - 5: Cambio en el tiempo de una probeta fabricada con cemento portland y bacterias, conservada a 23°C. Para el caso de esta grieta el sellado más significativo ocurre entre el día 7 y 21, luego del día 21 el sellado se estanca.

Áreas selladas para diferentes temperaturas

Los resultados de los promedios de las áreas selladas a diferentes temperaturas se pueden ver en el Anexo D-1 y gráficamente en la Figura 6-6.

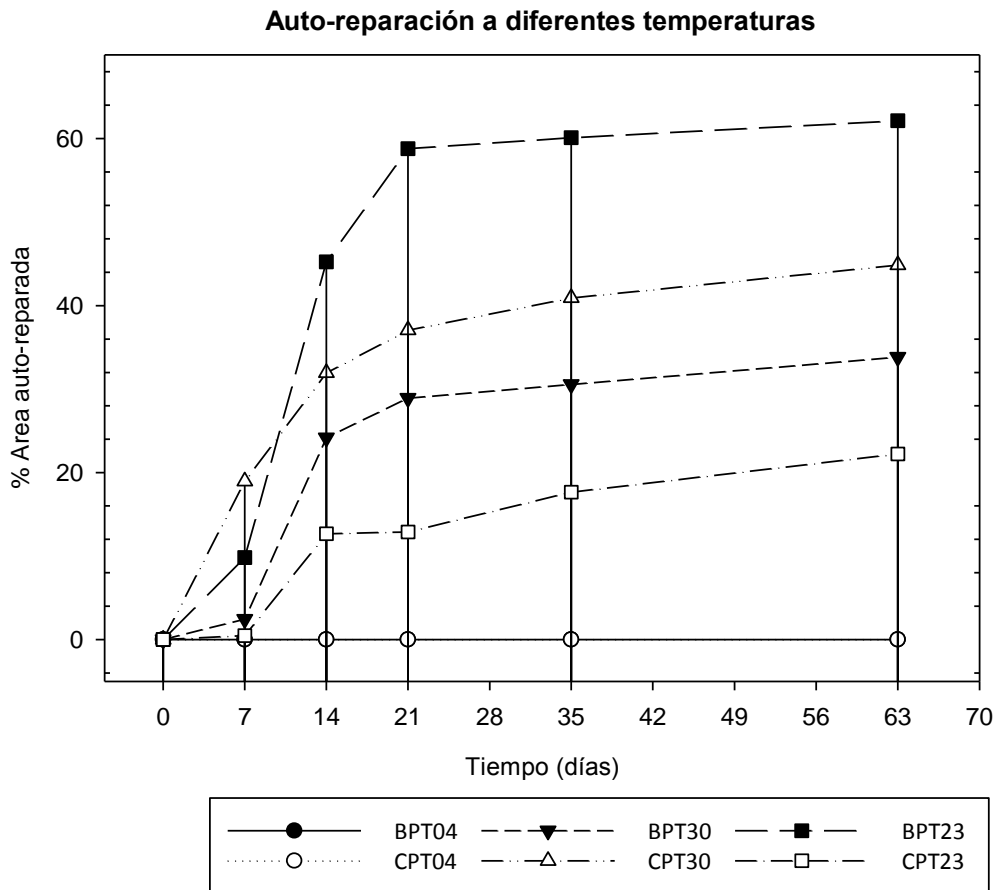


Figura 6 - 6: Gráfico del % de auto-reparación del área de las grietas a diferentes temperaturas.

El resultado más categórico que se puede observar es que no hubo sellado de las probetas de control ni de las con el agente de auto-reparación a una temperatura de 4°C (CPT04 Y BPT04), pese a que los materiales y condiciones para la fabricación y curado de las probetas dejadas a 4°C fue el mismo que se utilizó con las que se sometieron a 30 y 23°C.

Del gráfico se puede deducir que la mayor tasa de sellado ocurre entre el día 7 y 14 para las probetas a 23°C (BPT23 Y CPT23) y para la probeta con bacterias dejada a 30°C (BPT30). Para el caso de las probetas preparadas con bacterias, este resultado concuerda con el supuesto de que las bacterias alcanzan su mayor consumo de oxígeno para la actividad metabólica durante

aproximadamente los primeros 9 días desde su activación (Tziviloglou, Wiktor, & Schlangen, Performance requirements to ensure the efficiency of bacteria-based self-healing concrete, 2016)

En la Figura 6-7 se muestran el consumo de oxígeno en una muestra de hormigón con bacterias. Después de la inmersión el consumo fue casi cero, luego fue aumentando gradualmente hasta su valor máximo a las 160 h (6.6 días), posteriormente comenzó a disminuir hasta cero a las 220 h (9.16 días).

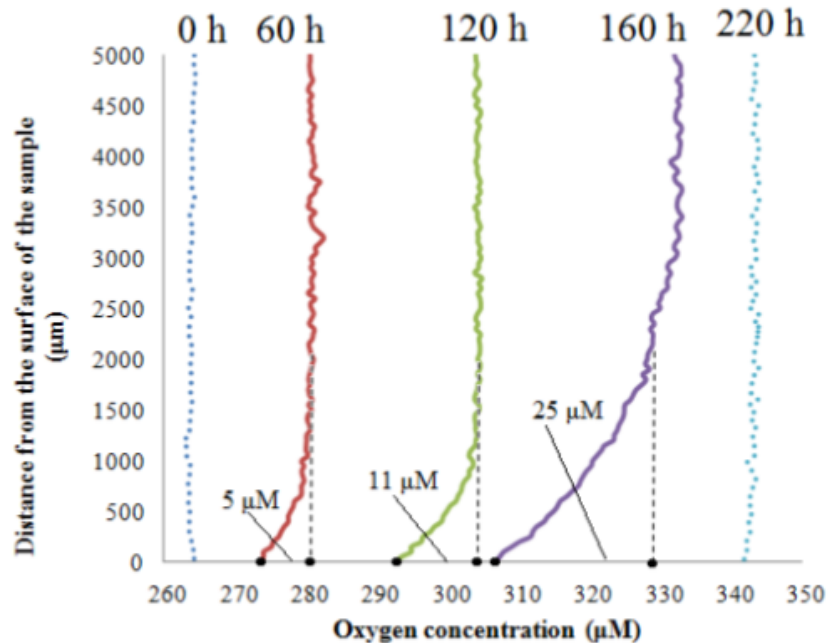


Figura 6 - 7: Perfiles de oxígeno en una muestra de hormigón a base de bacterias sumergida en una solución con pH 10.5 (Tziviloglou, et al., 2016).

Se pudo observar sellado tanto en probetas de control como en probetas con bacterias a 30 y 23°C, siendo el mejor promedio para las probetas con bacterias a 23°C (BPT23).

En el caso de las probetas a 30°C, el promedio del área de sellado fue mayor para las de control que para aquellas con el agente biológico. Este resultado puede tener dos interpretaciones; en primer lugar, dado el método empleado para agrietar, las áreas iniciales eran diferentes, al tener una mayor área, la auto-reparación puede resultar más compleja dada la difusión del material en formación.

En la Tabla 6-7 se muestra el área inicial de las grietas y la auto-reparación que se obtuvo luego de 63 días.

Tabla 6 - 7: Áreas iniciales de las grietas y su porcentaje de sellado luego de 63 días para 23 y 30°C.

Mezcla		Área Inicial [mm ²]			% Auto-reparación		
23°C	Bacteria	2.95	9.87	9.02	82.48	54.86	49.05
	Control	7.29	7.34	9.08	25.41	30.74	10.52
30°C	Bacteria	7.27	9.62	10.50	35.48	35.92	30.08
	Control	4.04	2.87	5.71	45.09	42.93	46.59

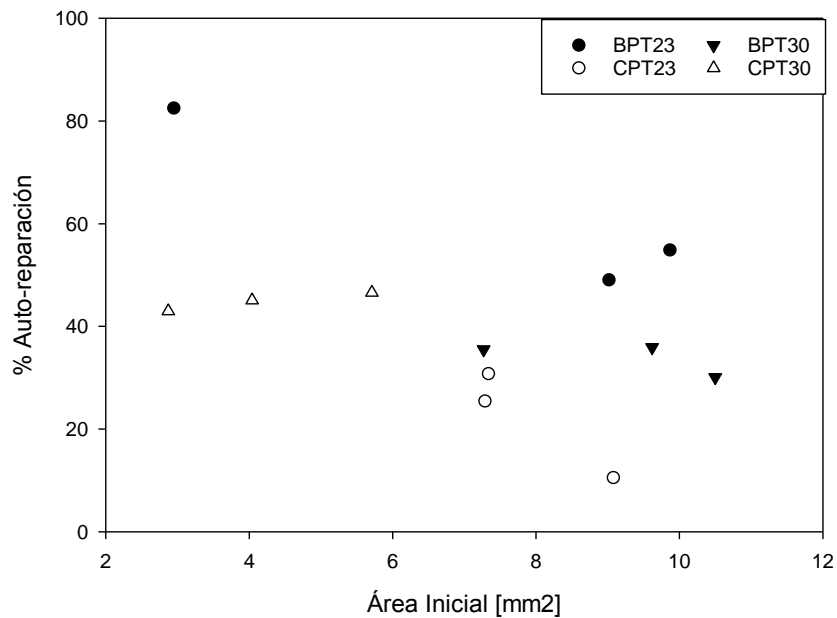


Figura 6 - 8: Gráfico del porcentaje de auto-reparación de las grietas según su área inicial.

Se puede ver en el gráfico que las probetas de control a 30° tuvieron un mejor rendimiento que las probetas con bacteria, sin embargo ninguna de las fisuras de las probetas de control tuvo un área inicial mayor que las con bacterias, es por esto que no se puede asegurar que el rendimiento de las probetas de control a 30°C es mejor que el de las probetas con bacterias.

Por otro lado, la precipitación observada en las probetas a 30°C (CPT30 Y BPT30) tenía un aspecto menos consistente que la observada en las probetas BPT23. Por lo que podría haberse tratado de una precipitación autógena en la probeta BPT30 y no debida a la intervención de las bacterias. Las probetas a 30°C se mantuvieron en un horno que no mantenía una temperatura constante, ésta podía subir hasta los 40°C lo que pudo haber afectado cualquier actividad bacteriana.

Los resultados de las probetas de control a los 23°C (CPT23) fueron menores que las probetas BPT23 e incluso que los resultados a 30°C. El material de sellado en las CPT23 era similar al observado en las probetas a 30°.

El gráfico de la Figura 6-8 confirma lo observado para las probetas con bacterias a 23°C (BPT23) en el gráfico 6-6, pues, BPT23 entrega el mejor porcentaje de sellado tanto para un área inicial muy pequeña (82.4% para 2.95 mm²), como para áreas mayores (54.86% para 9.87 mm²)

Las Figuras 6-9 y 6-10 muestran una grieta para las probetas de control y una para las probetas con bacterias expuestas a los 4°C en el día 0 y el 63 del experimento.

Las Figuras 6-11 y 6-12 muestran una grieta para las probetas de control y una para las probetas con bacterias expuestas a los 30°C en el día 0 y el 63 del experimento.

Las Figuras 6-13 y 6-14 muestran una grieta para las probetas de control y una para las probetas con bacterias expuestas a los 23°C en el día 0 y el 63 del experimento.

El sellado de la grieta BPT23, es mucho más evidente, llenando incluso parte de los poros expuestos de la probeta.

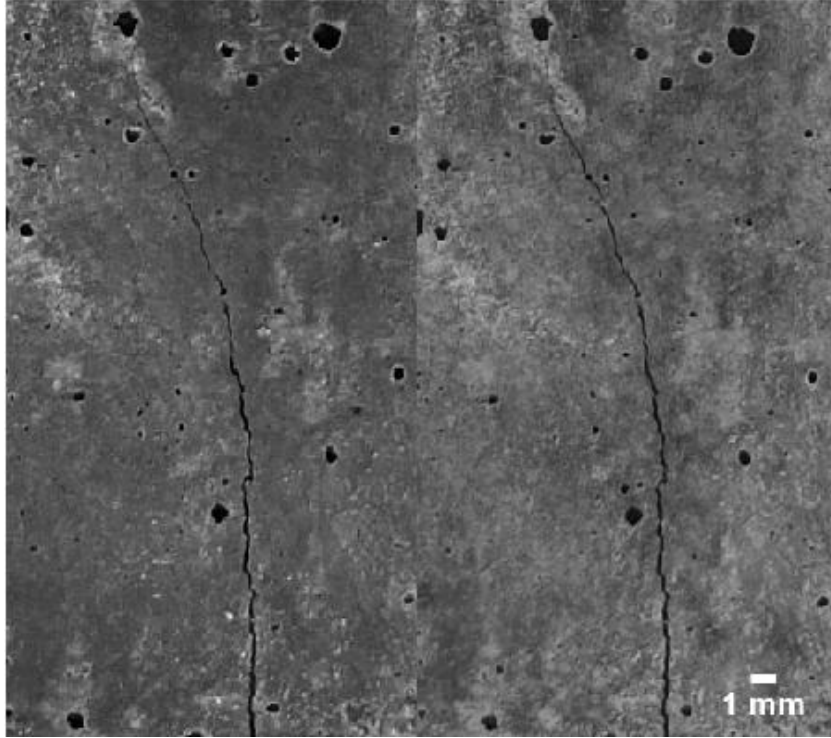


Figura 6 - 9: Grieta de probeta BPT04. a) Día 0. b) Día 63

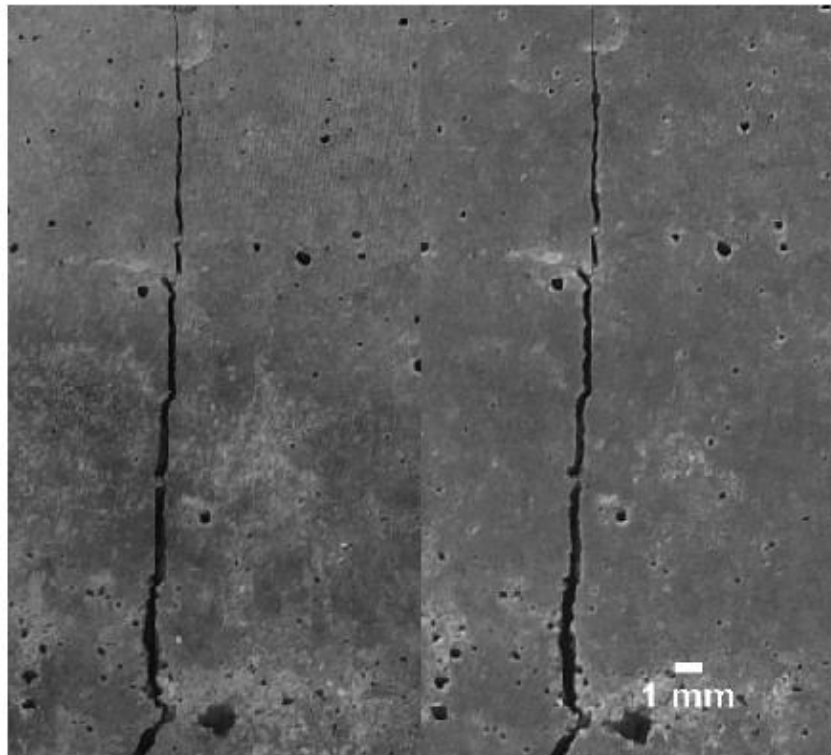


Figura 6 - 10: Grieta de probeta CPT04. a) Día 0. b) Día 63.

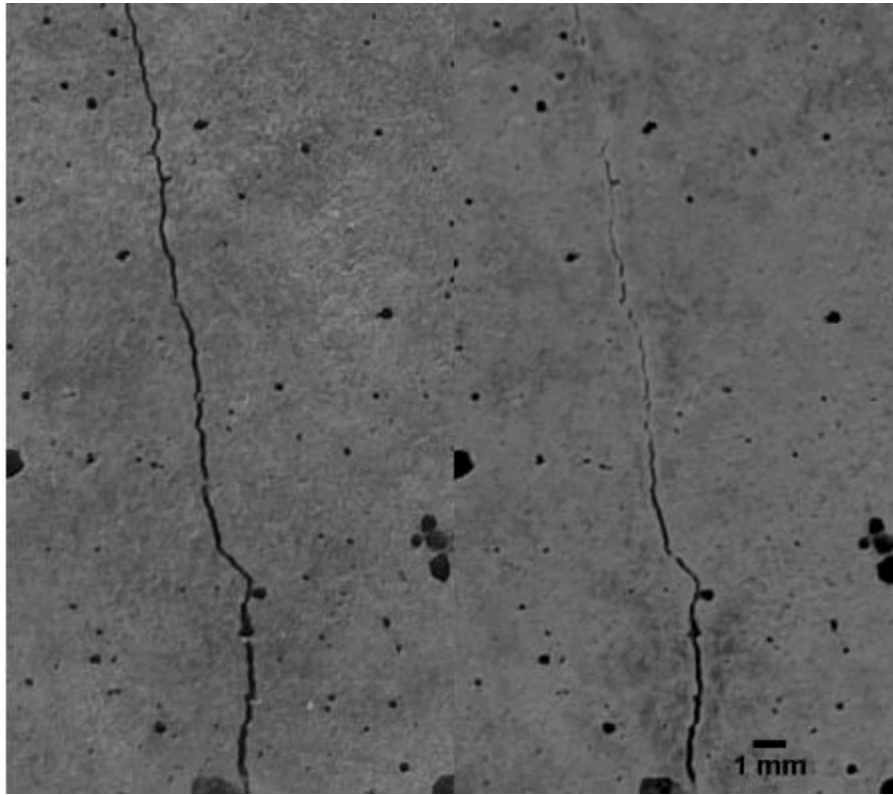


Figura 6 - 11: Grieta de probeta CPT30. a) Día 0. b) Día 63.

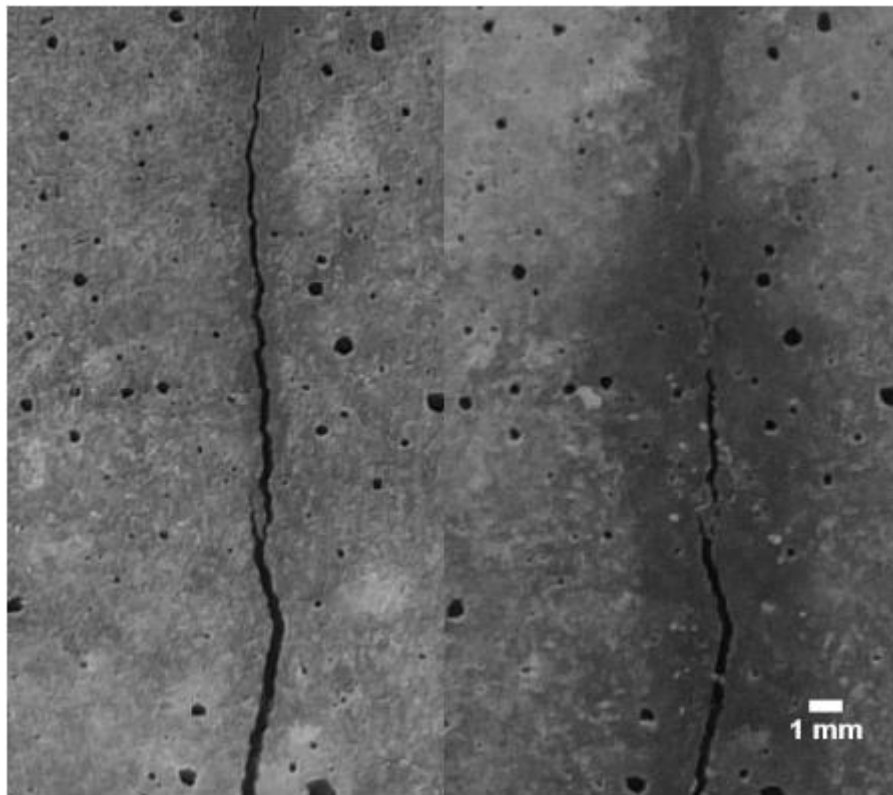


Figura 6 - 12: Grieta de probeta BPT30. a) Día 0. b) Día 63.

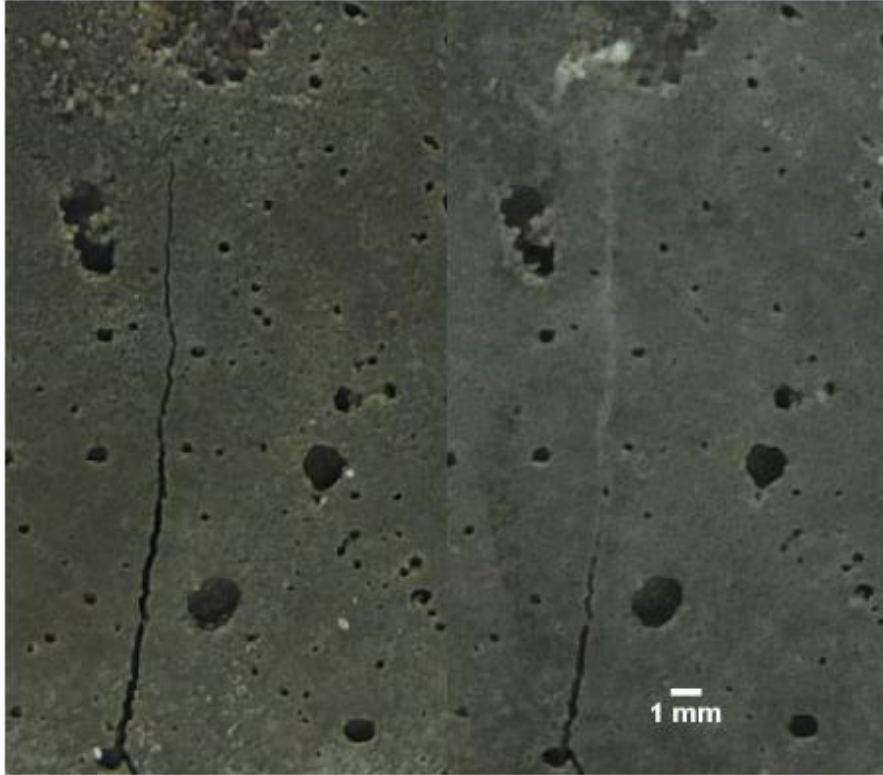


Figura 6 - 13: Grieta de probeta CPT23. a) Día 0. b) Día 63.

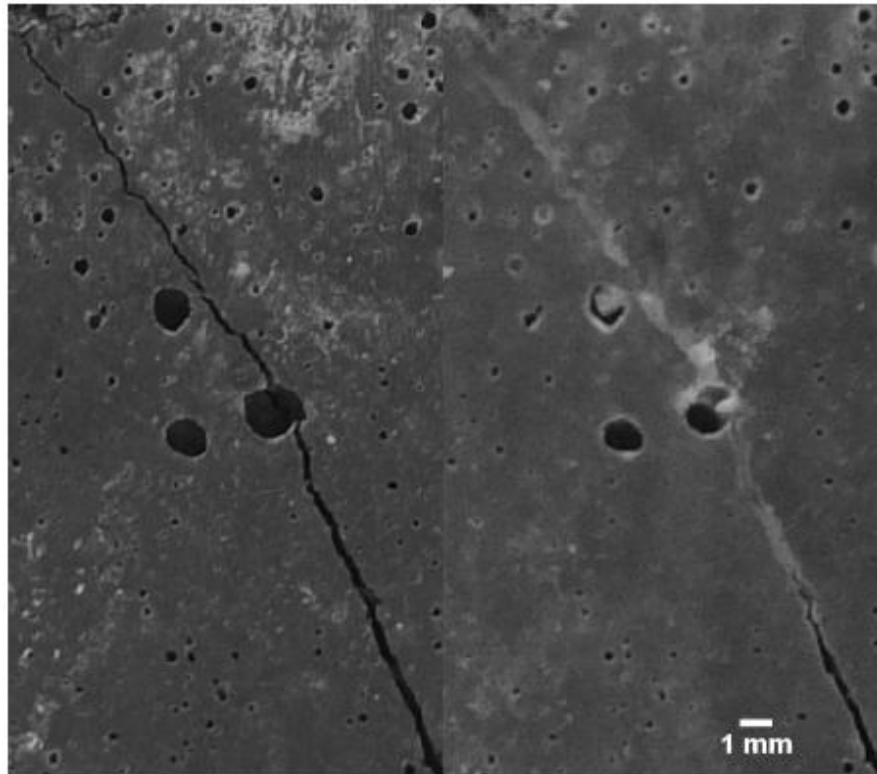


Figura 6 - 14: Grieta de probeta BPT23. a) Día 0. b) Día 63.

Áreas selladas para diferentes tipos de cemento

Los resultados de los promedios de las áreas selladas para diferentes tipos de cemento se pueden ver en el Anexo D-2 y gráficamente en la Figura 6-15. Este estudio, como se mencionó en la sección 3.2, incluyó un tercer tipo de mezcla impregnando la arcilla expandida con el lactato de calcio (sin las bacterias).

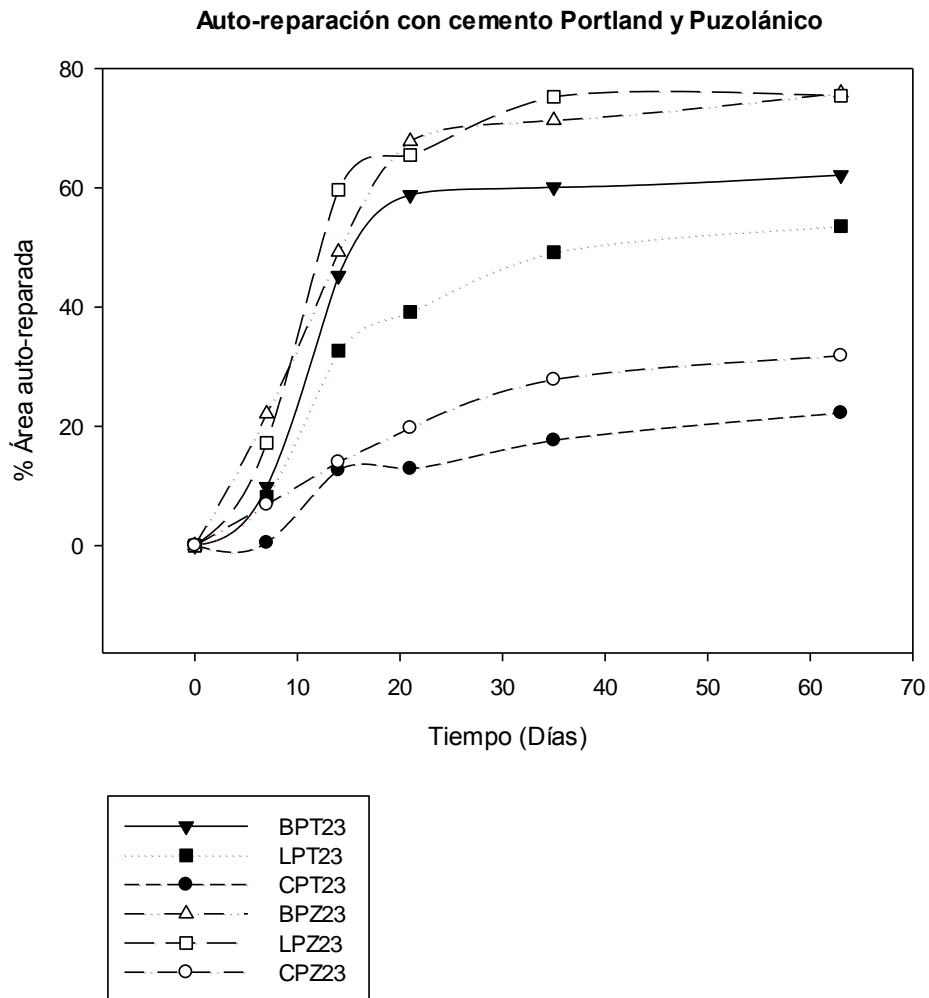


Figura 6 - 15: Gráfico del % de auto-reparación del área de las grietas para dos tipos de cemento de cementos.

Al igual que en el gráfico 6-6, la mayor tasa de sellado ocurre entre el día 7 y 14 para ambos tipos de cemento, luego del día 21 el sellado se va deteniendo.

Las probetas de control para ambos tipos de cemento (CPT23 Y CPZ23) presentaron el sellado más bajo, mientras que los mejores resultados fueron para las probetas con cemento puzolánico, tanto las probetas con bacterias como las que contenían solo el lactato de calcio.

Para el caso del cemento portland, las probetas con lactato dieron mejores resultados que aquellas que contenían las bacterias.

Según el gráfico de la Figura 6-15, se podría concluir que se obtienen mejores resultados para el cemento puzolánico, contrario a lo planteado en la hipótesis (Sección 1.2.1). Además, los resultados con la utilización del lactato de calcio sin las bacterias serían similares o incluso mejores que con las bacterias. No obstante, al igual que con los resultados anteriores, es importante observar las diferencias de las áreas iniciales entre las diferentes probetas ya que no resulta del todo comparable la precipitación de carbonato de calcio cuando se tienen grietas muy distintas.

En la Tabla 6-8 se puede observar el área inicial de las grietas y la auto-reparación que se obtuvo luego de 63 días para los dos tipos de cemento.

Tabla 6 - 8: Áreas iniciales de las grietas y su porcentaje de sellado luego de 63 días para cemento portland y puzolánico.

Mezcla		Área Inicial [mm ²]			% Auto-reparación		
Portland	Bacteria	2.95	9.87	9.02	82.48	54.86	49.05
	Lactato	9.93	3.54	-	51.19	55.93	-
	Control	7.29	7.34	9.08	25.41	30.74	10.52
Puzolánico	Bacteria	5.30	4.22	3.80	64.41	82.52	80.71
	Lactato	6.17	3.85	2.81	59.95	79.50	86.77
	Control	4.64	5.12	4.70	42.01	20.83	32.64

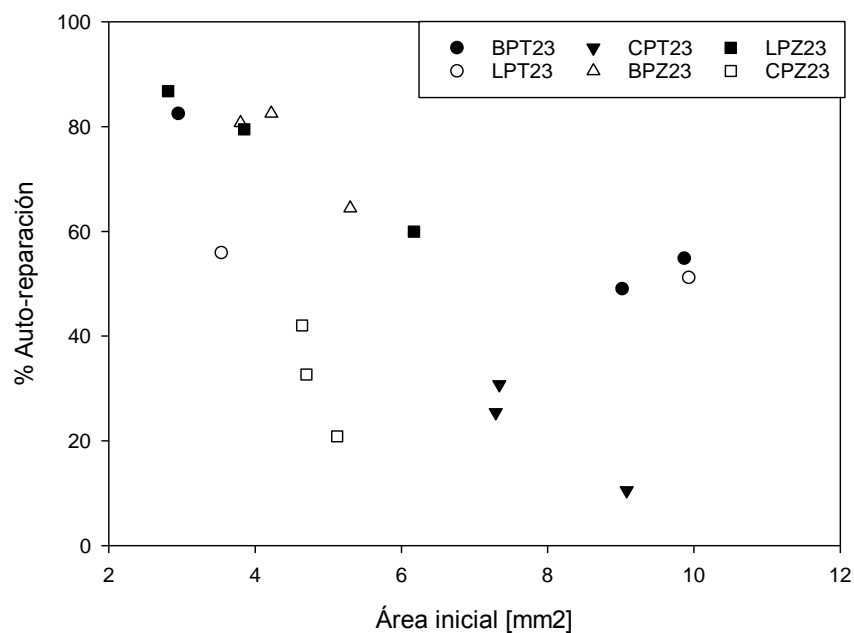


Figura 6 - 16: Gráfico del porcentaje de auto-reparación de las grietas según su área inicial.

Para las áreas pequeñas, el sellado resultó mejor para las BPT23 Y LPZ23, mientras que en áreas iniciales mayores BPT23 Y LPT23. No se puede afirmar que el mejor desempeño sea para las probetas con cemento Puzolánico, ya que ninguna de las grietas iniciales superó los 6.12 mm^2 , mientras que las probetas con bacterias y cemento portland lograron sellar hasta los el 54.86% de 9.87 mm^2 .

Las Figuras 6-17 a la 6-20 muestran una grieta para las probetas de fabricadas con cemento puzolánico y para la mezcla de cemento portland y lactato de calcio sin bacterias en el día 0 y el 63 del experimento.

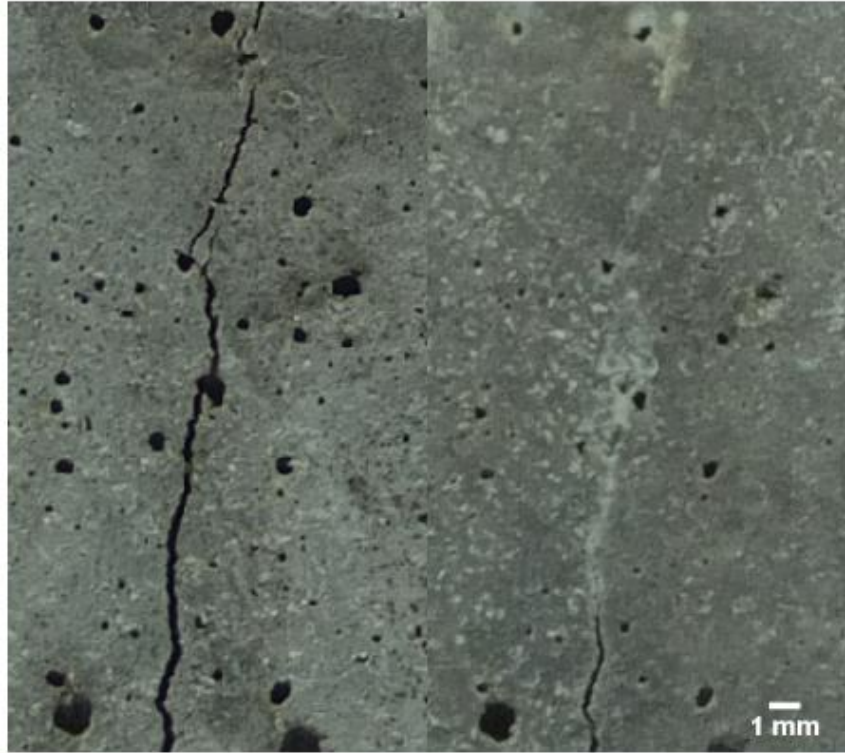


Figura 6 - 17: Grieta de probeta LPT23. a) Día 0. b) Día 63.

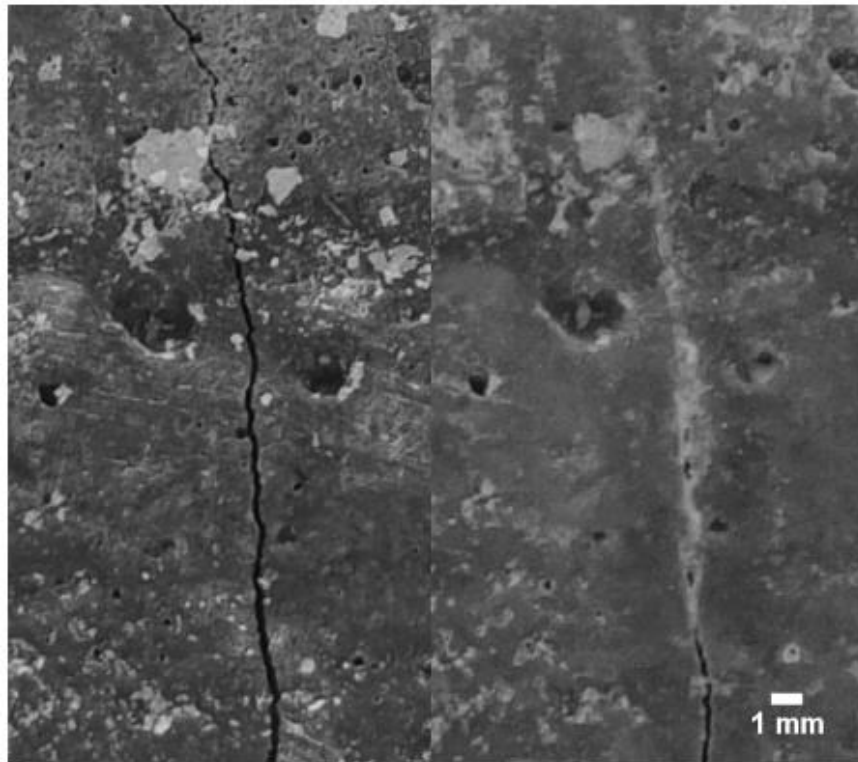


Figura 6 - 18: Grieta de probeta LPZ23. a) Día 0. b) Día 63.

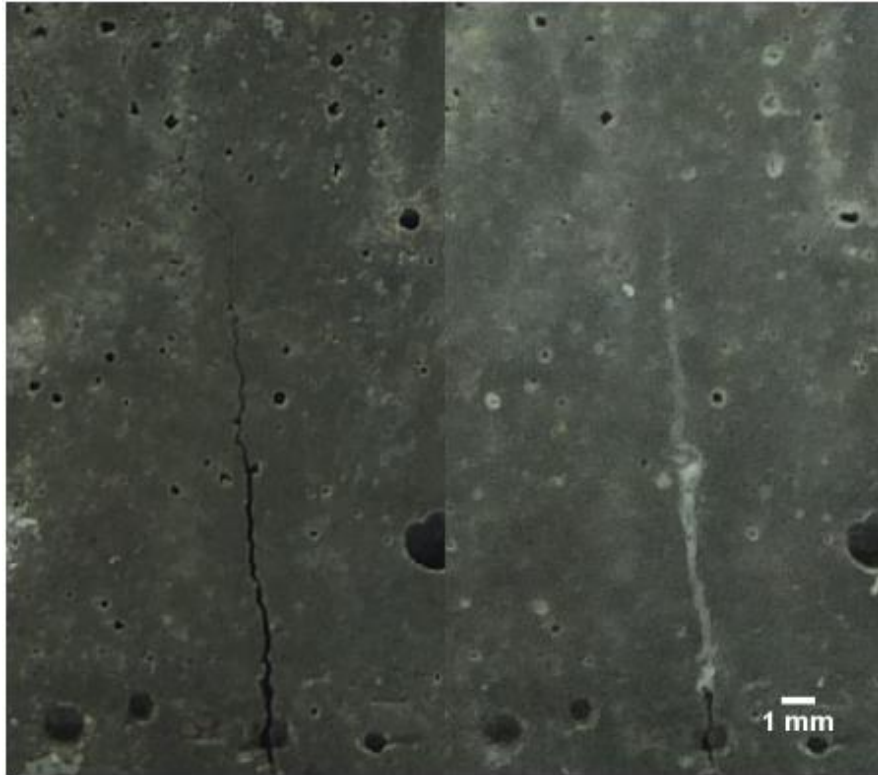


Figura 6 - 19: Grieta de probeta BPZ23. a) Día 0. b) Día 63.

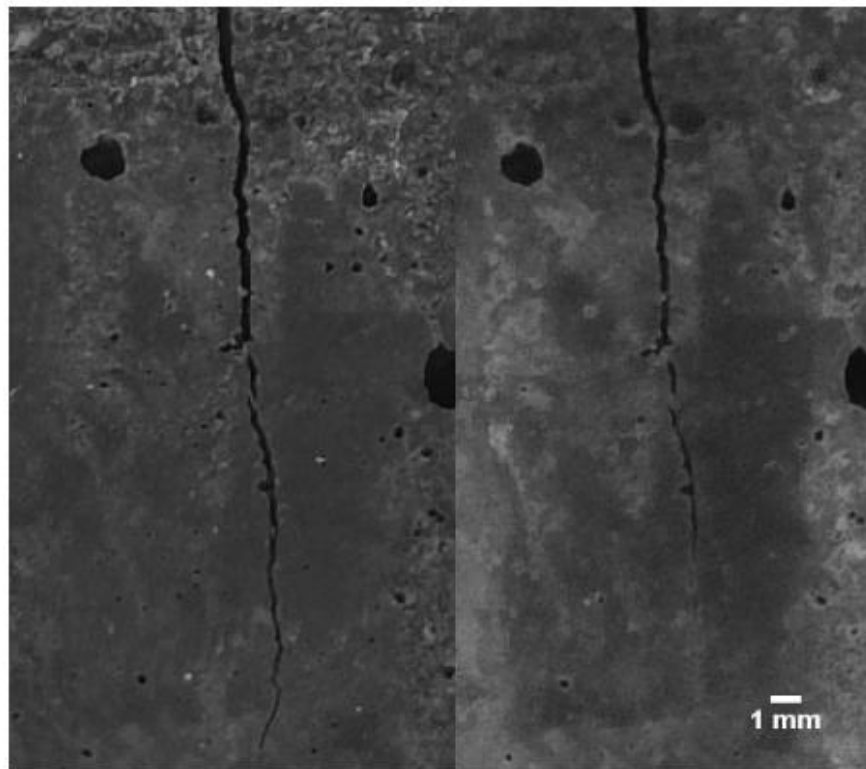


Figura 6 - 20: Grieta de probeta CPZ23. a) Día 0. b) Día 63.

6.4.2 Auto-reparación según porcentaje del espesor de la grieta auto-reparado

Debido al método utilizado para agrietar las probetas, se obtuvieron grietas distintas en cada espécimen. Las grietas se formaron aproximadamente de forma perpendicular al refuerzo, sin embargo presentan distintos largos, y sus anchos variaron sustancialmente a lo largo de su longitud.

Para fines de cuantificación, no resulta fidedigna una relación entre grietas tan variables, pues cada sellado dependerá del espesor y área inicial de la grieta, resultando una auto-reparación en las grietas más estrechas más factible que en las de mayor área. Una grieta inicial más pequeña significará un sistema más cerrado para la formación de los cristales y una menor difusión del material.

Es por eso, que se optó por complementar la información considerando la variación según los espesores de la grieta a intervalos regulares de 5 mm a lo largo de la probeta. Se realizaron mediciones del ancho de las grietas en las mismas ubicaciones para el día 0 y el día 63 y se calculó el porcentaje de auto-reparación para cada ubicación de acuerdo con la fórmula 6-4.

$$\text{Auto-reparación}_{\text{espesor } t} \% = \frac{w_i - w_t}{w_i} \cdot 100\% \quad (6-4)$$

Dónde, w_i : Espesor inicial de la grieta y w_t : Espesor de la grieta en el tiempo t.

La Figura 6-21 presenta un esquema con los puntos seleccionados para las grietas para realizar la medida de su espesor.

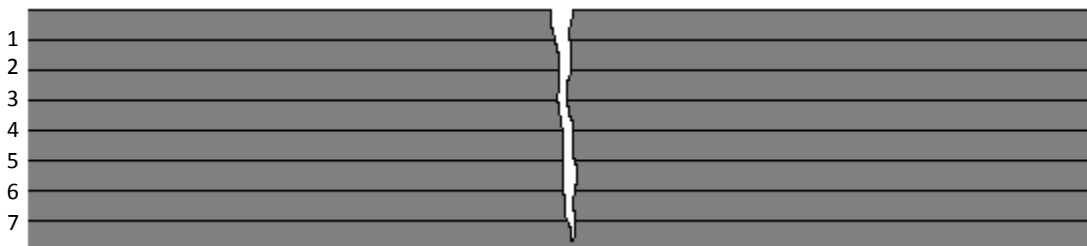


Figura 6 - 21: Esquema de una probeta agrietada y los puntos de medición para el espesor.

Espesores sellados para diferentes temperaturas

Los resultados de los espesores sellados a los 63 días del experimento se pueden ver en el Anexo D-3 y en los siguientes gráficos.

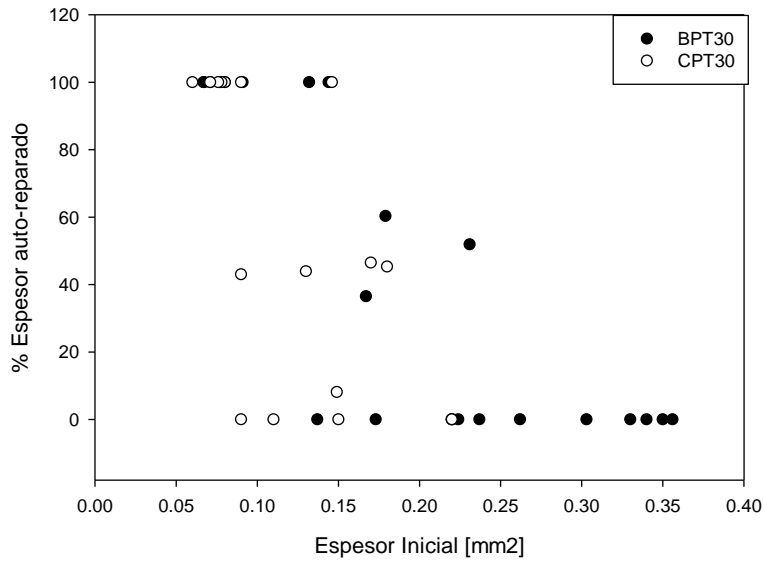


Figura 6 - 22: Comparación espesores sellados a los 30°C.

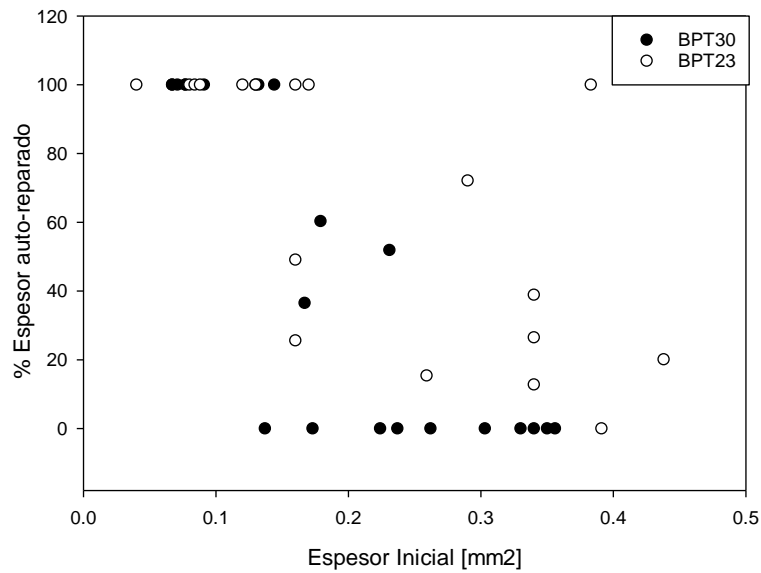


Figura 6 - 23: Comparación espesores sellados para el hormigón con bacterias a 23°C y 30°C.

A los 30°C, según las mediciones realizadas, el máximo espesor sellado fue de 0.147 [mm] para ambas mezclas (BPT30 Y CPT30), por lo que probablemente se trata de una auto-reparación autógena. Esto es visible además, con el gráfico de la Figura 6-23, en donde se aprecia que todos los espesores mayores a 0.147 mm para las probetas a 30° no se sellaron, a diferencia de las probetas a 23°C, en donde el máximo espesor sellado fue de 0.38 mm.

Espesores sellados para diferentes tipos de cemento

La Figura 6-24 muestra el gráfico de dispersión para el sellado en probetas con cemento portland. En este caso el mayor espesor sellado fue del hormigón con bacterias (0.38 mm), y luego el hormigón con lactato de calcio con 0.27 mm.

Al contrario de lo visto en el cemento portland, en el cemento puzolánico (Figura 6-25) el mayor espesor sellado fue para la mezcla con lactato de calcio (0.21 mm) y luego, la mezcla con bacterias mostró un sellado máximo de 0.18 mm.

Para las grietas pequeñas, menores a 0.1 mm, hubo un sellado del 100% para ambos tipos de cemento en probetas con bacteria como en probetas con lactato de calcio, pero no en las probetas de control. Esto hace suponer que fue fundamental la incorporación de una fuente de calcio en el hormigón, y que el calcio presente en el agua no sería suficiente suministro. El análisis del agua utilizada para la auto-reparación se puede ver en la siguiente sección (6.5).

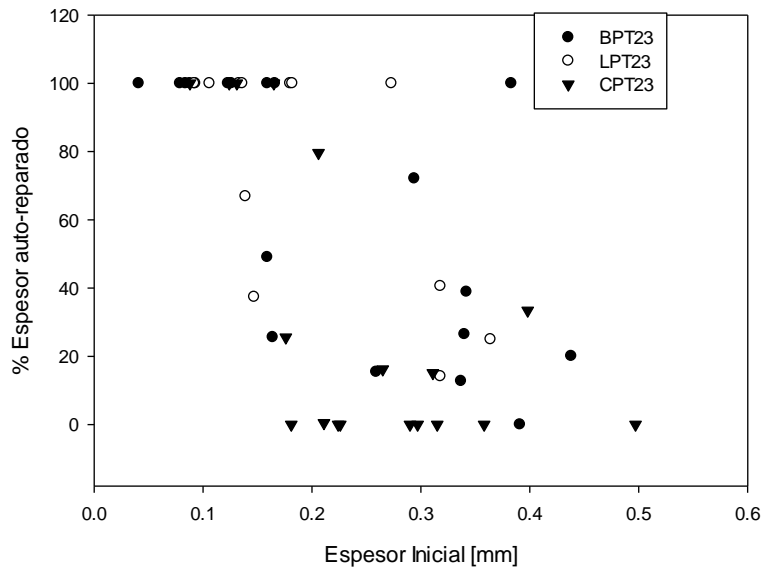


Figura 6 - 24: Comparación espesores sellados para hormigón preparado con cemento Portland y conservado a 23°C.

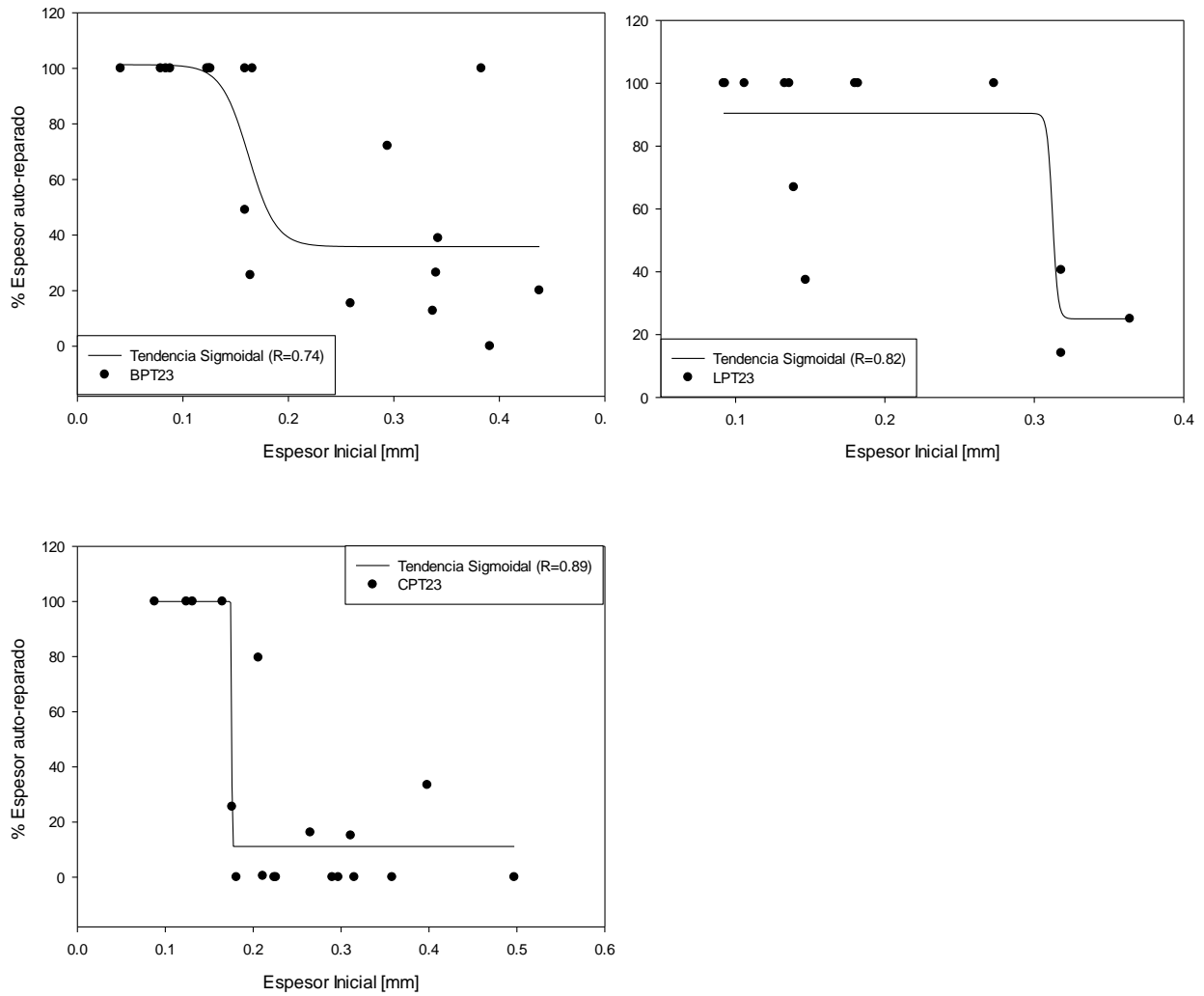


Figura 6 - 25.2: Resultados por separado para cada variable (control, lactato y bacteria) del sellado según espesores para hormigón preparado con cemento Portland a 23°C. Se puede observar una tendencia sigmoidea en cada variable.

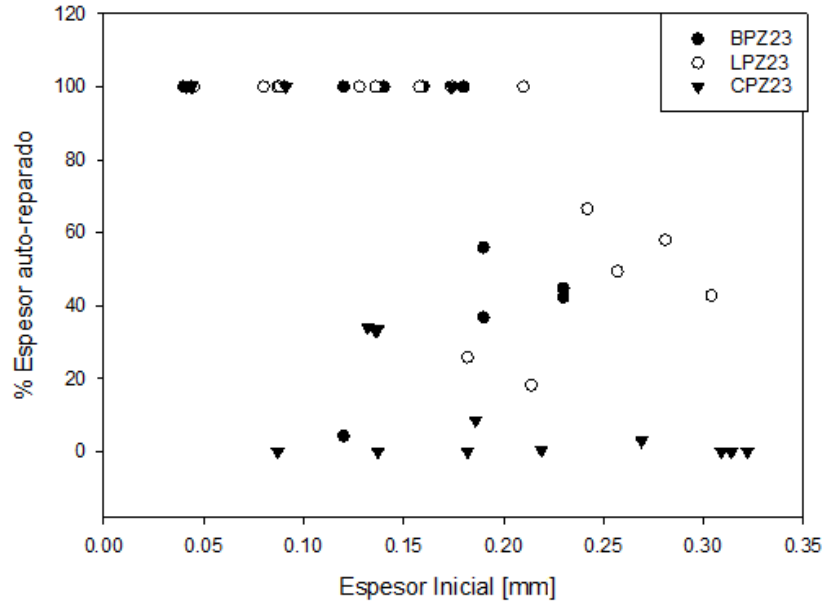


Figura 6 - 26: Comparación espesores sellados para hormigón preparado con cemento Puzolánico y conservado a 23°C.

La diferencia en la auto-reparación según el tipo de cemento se puede ver en los siguientes gráficos, en donde se aislaron las variables de la utilización del lactato de calcio de la utilización de las bacterias. La Figura 6-26 muestra los resultados para el sellado en el caso del hormigón sin bacterias, con lactato de calcio.

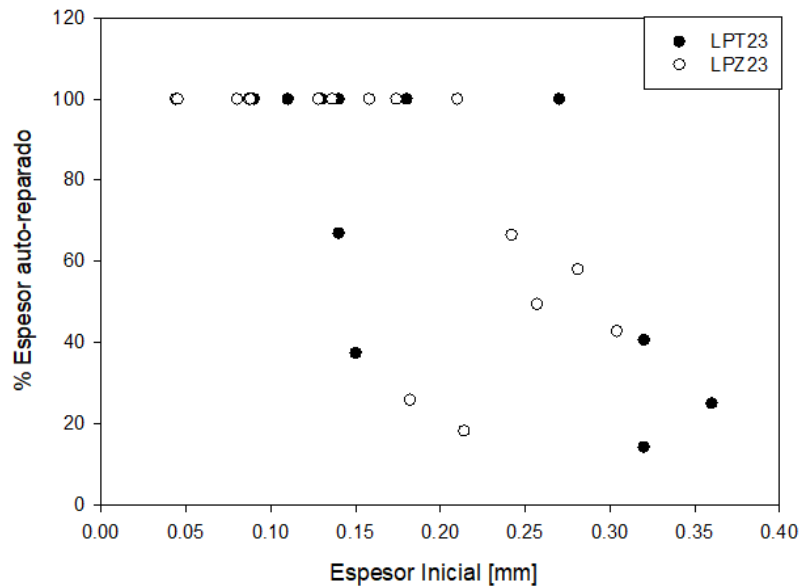


Figura 6 - 27: Comparación espesores sellados con lactato de calcio para hormigón Portland y Puzolánico 23°C.

En el gráfico se puede ver un conjunto homogéneo de datos, si bien el máximo espesor sellado fue para el cemento portland con 0.27 mm, el cemento puzolánico entregó resultados similares para el sellado.

Al comparar los tipos de cemento con el agente de auto-reparación (Figura 6-27) se observa en ambos una relación inversamente proporcional entre el ancho de grieta y el porcentaje de sellado; cuanto menor es el ancho de fisura, mayor la auto-reparación. Sin embargo dado que los espesores del hormigón con cemento Puzolánico fueron menores, se desconoce cómo sería su comportamiento con espesor más ancho.

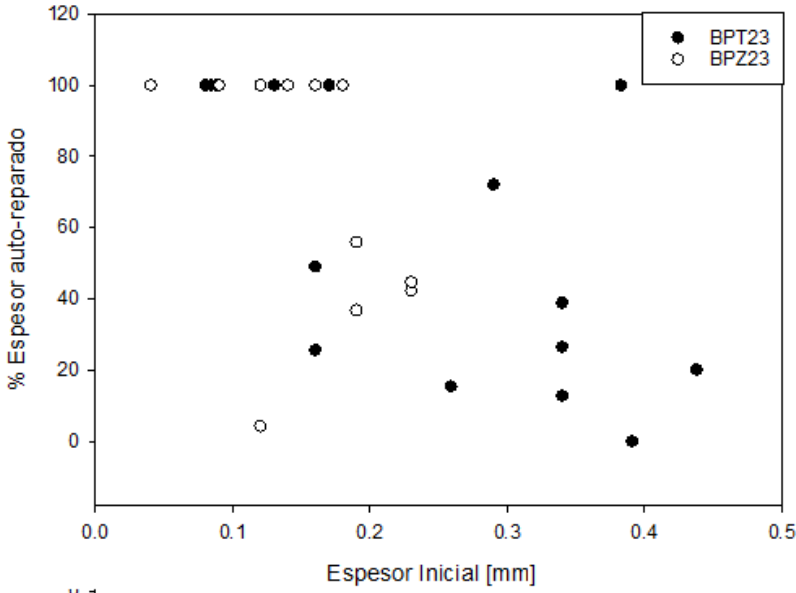


Figura 6 - 28: Comparación espesores sellados con bacterias para hormigón Portland y Puzolánico 23°C.

El mayor espesor sellado fue el de la mezcla de cemento portland con bacterias (0.38 mm).

6.5 ANÁLISIS DEL AGUA

Como se detalló en la sección 2.3.3, el agua es un factor fundamental en el proceso de auto-reparación del hormigón. Se determinó las cantidades de los cationes más abundantes disueltos en el agua utilizada en el experimento. Para este análisis se usó el método de cromatografía líquidos, del tipo intercambio iónico (IEC, de ionic-exchange chromatography).

6.5.1 Cromatografía de intercambio iónico (IEC)

La cromatografía consiste en un método de separación en que se ponen en contacto dos fases inmiscibles, una fase será estacionaria y la otra móvil. La técnica se basa en el principio de retención selectiva, para separar los distintos componentes de una mezcla. La fase móvil será un fluido (gas o líquido) que arrastra a la muestra a través de la fase estacionaria, contenida a lo largo de una columna, que se trata de un sólido o un líquido fijado. Los componentes de la mezcla interaccionan en distinta forma con la fase estacionaria. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando. Esta técnica se utiliza también para la purificación de productos.

La cromatografía líquida es aquella en que la separación involucra predominantemente un reparto simple entre dos fases líquidas, es decir tanto la fase estacionaria como la móvil serán líquidas. A esto se le llama cromatografía líquido-líquido (LLC). Dentro de esta categoría existe la cromatografía de intercambio iónico (IEC), en donde los componentes iónicos de la muestra se separan por el intercambio selectivo con contraiones de la fase. Las partículas cargadas negativamente (positivamente) se unen a la fase estacionaria cargada positivamente (negativamente) y son retenidas, mientras que las partículas cargadas positivamente (negativamente) son rechazadas por la matriz y son eluidas. La elución de las partículas cargadas negativamente (positivamente) se consigue cambiando el pH del solvente hasta igualarlo a su punto isoelectrico o hasta invertir su carga neta.

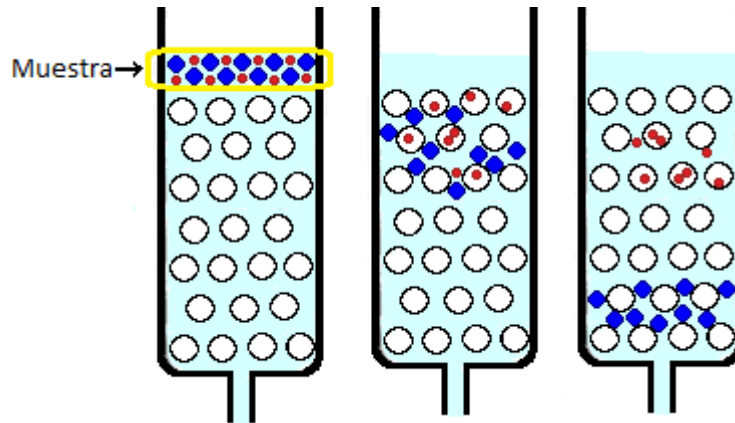


Figura 6 - 29: Esquema del principio de retención selectiva utilizado en la cromatografía.

Para el análisis se utilizó el cromatógrafo IC 930 Compact Flex marca Metrohm (Figura 6-29). El cromatógrafo se controló con el software MagIC Net. Este software permite la automatización del equipo, controlando todos los aparatos periféricos para la manipulación de líquidos y el registro de los resultados.



Figura 6 - 30: Cromatógrafo.

El cromatógrafo no se encontraba calibrado para determinar todos los cationes presentes en el agua, por lo que se determinó las cantidades de Sodio, Potasio, Calcio y Magnesio.

6.5.2 Resultados

En la Tabla 6-10 se muestran los resultados arrojados por el cromatógrafo de la concentración de miligramos de cada catión por litro de agua.

Tabla 6 - 9: Resultados de la cromatografía IEC.

Cationes	Cantidad (mg/L)	
	Agua 1	Agua 2
Sodio	40.734	263.342
Potasio	24.922	277.943
Calcio	49.853	4.28
Magnesio	7.006	0.491

Agua 1 corresponde al agua potable extraída directamente del grifo y Agua 2 al agua potable circundante en el recipiente donde se mantuvo las probetas a 23°C durante 2 meses.

Los tiempos en que el cromatógrafo determinó los cationes de cada tipo de agua se presentan en la Figura 6-30 y 6-31.

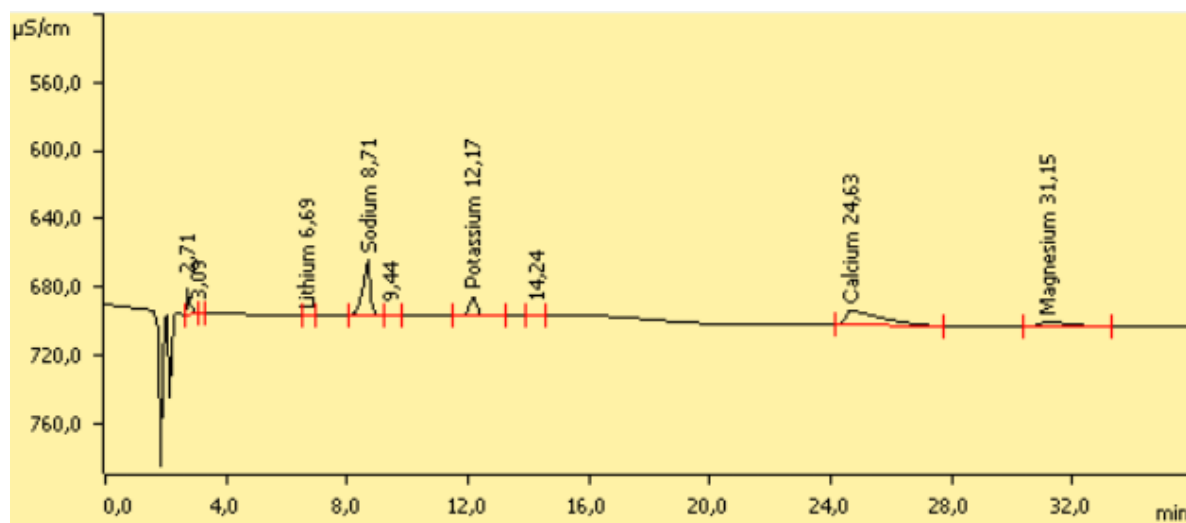


Figura 6 - 31: Gráfico de cationes Agua 1.

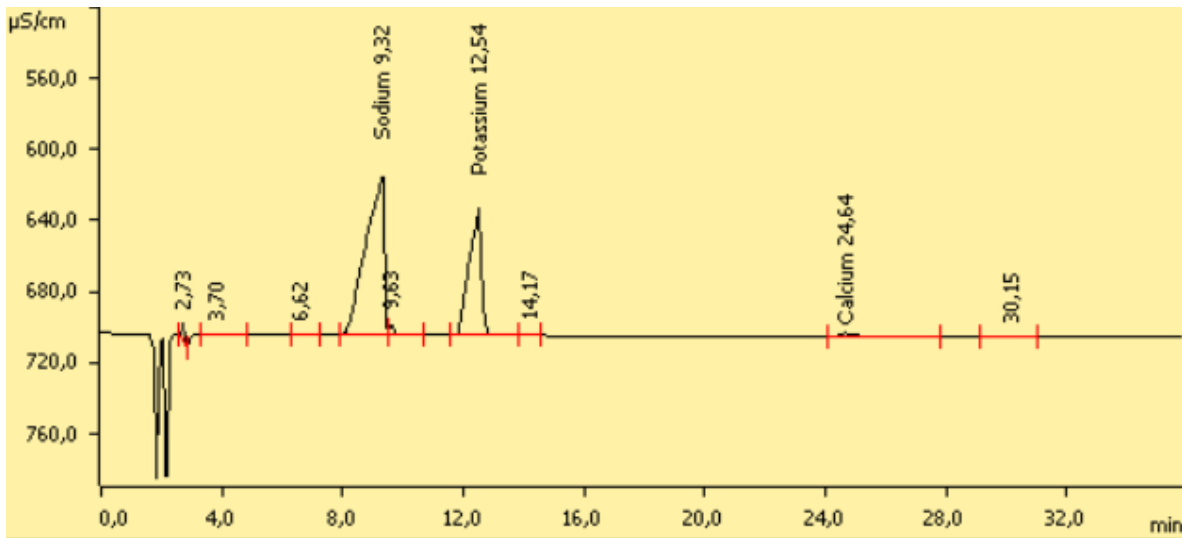


Figura 6 - 32: Gráfico de cationes Agua 2.

Los resultados muestran una disminución de los cationes de Calcio y Magnesio, y un aumento del Sodio y Potasio. La disminución de los iones de calcio es consistente con la hipótesis de que la reacción ocurrida para sellar las grietas toma calcio desde alguna fuente externa, por lo que parte de los cationes de calcio encontrados en el agua serían los responsables de la formación de Carbonato de Calcio en las grietas. Es posible a su vez, que el Magnesio también haya contribuido con la formación de algún cristal. Esto se podrá observar con mayor claridad en el análisis de Difracción de Rayos X (DRX) realizado a la muestra (6.5.1).

Una explicación lógica al aumento de los cationes de Sodio y Potasio es el traspaso de ciertos componentes del hormigón al medio líquido en donde se encontraban las muestras, particularmente de la arena con que se fabricó. Esto se podrá evidenciar también con el análisis DRX.

6.6 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX) Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Se finalizó el proceso de autoreparación luego de mantener dos meses las probetas sumergidas. Se retiraron del agua y se dejaron secar durante unos días para posteriormente analizar las muestras con el método de difracción de rayos X (DRX) y con microscopio electrónico de barrido (SEM). Con estos análisis es posible identificar los elementos que componen el material de sellado

de las grietas y caracterizarlo para determinar si sus propiedades son suficientes para proteger al hormigón y tal vez aportar con propiedades mecánicas a la estructura.

Se incluyó en el análisis de DRX una muestra de los cementos utilizados para fabricar las probetas y de la arcilla, con el propósito de encontrar una relación en la interacción con el agua.

6.6.1 Difracción de rayos X

La técnica de Difracción de Rayos X (DRX) permite identificar los minerales presentes en una muestra por su estructura cristalina. Su fundamento se basa en la interacción de la estructura cristalina de un sólido con una fuente de rayos X. Al igual que con otros tipos de radiación electromagnética, la interacción entre el vector eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa da lugar a una dispersión. Cuando los rayos X son dispersados por el entorno ordenado de un cristal, tiene lugar a interferencias (tanto constructivas como destructivas) entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación. Al incidir un rayo X en la estructura cristalina, este se refleja con cierto ángulo e intensidad que dependerá de las aristas y ángulos que componen las celdas del cristal, y se producirá una interferencia constructiva entre las ondas de los rayos X reflejados. Con esto la intensidad y ángulo de la onda difractada indicará la naturaleza del cristal (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

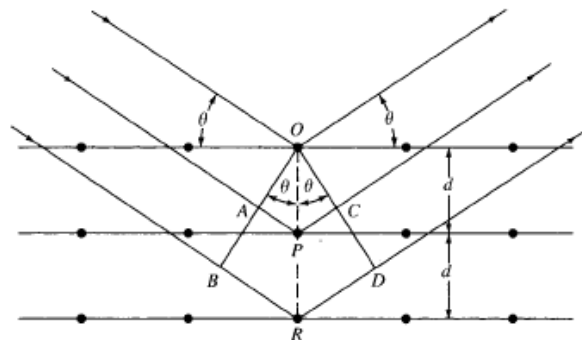


Figura 6 - 33: Difracción de rayos X producida por un cristal.

La técnica de DRX se aplicó a 3 componentes del hormigón: el cemento, la arcilla y el material de sellado de las grietas. De este modo se pudo caracterizar los dos tipos de cemento usados

(Portland y Puzolánico) y la arcilla en su estado inicial y luego de ser impregnada (como agente de auto-reparación).

En el caso del material encontrado en las grietas auto-reparadas (material de sellado) la cantidad era escasa para conseguir un análisis cuantitativo, para esto, la técnica precisa una cantidad mayor a 0.5 g. Se realizó solo el análisis cualitativo, para lo cual se escogió el material de sellado más abundante que entregó el estudio. Este corresponde a las probetas fabricadas con el agente de auto-reparación y cemento Portland (BPT). El material se extrajo con un bisturí cuidadosamente para evitar pérdidas.

Los cristales y sus contenidos encontrados en cada muestra se presentan en las Tablas 6-10, 6-11, 6-12, y 6-13. Los patrones entregados por el difractor para cada muestra se pueden ver en el Anexo E.

Tabla 6 - 10: Cemento Portland.

N°	Patrón	Nombre	Fórmula	Presencia (%wt)
1	01-086-0402 (C)	Hatrurite, syn	Ca_3SiO_5	73.67
2	00-030-0226 (*)	Brownmillerite, syn	$\text{Ca}_2(\text{Al,Fe}^{+3})_2\text{O}_5$	13.54
3	00-038-1429 (*)	Calcium Aluminum Oxide	$\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$	6.98
4	00-033-0302 (*)	Larnite, syn	Ca_2SiO_4	5.81

Tabla 6 - 11: Cemento Puzolánico.

N°	Patrón	Nombre	Fórmula	Presencia (%wt)
1	01-086-0402 (C)	Hatrurite, syn	Ca_3SiO_5	72.08
2	00-030-0226 (*)	Brownmillerite, syn	$\text{Ca}_2(\text{Al,Fe}^{+3})_2\text{O}_5$	11.94
3	00-033-0302 (*)	Larnite, syn	Ca_2SiO_4	6.32
4	00-038-1429 (*)	Calcium Aluminium Oxide	$\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$	5.61
5	00-033-0311 (*)	Gypsum, syn	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.05

Tabla 6 - 12: Arcilla expandida.

N°	Patrón	Nombre	Fórmula	Presencia (%wt)
1	00-001-0527 (D)	Kaolinite	$\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$	56.95
2	00-005-0490(D)	Quartz low	$\alpha\text{-SiO}_2$	41.76
3	01-082-1690 (C)	Lime	CaO	1.29

Tabla 6 - 13: Material de sellado.

N°	Patrón	Nombre	Fórmula
1	00-005-0586 (*)	Calcite, syn	CaCO ₃
2	00-033-0268 (I)	Vaterite	CaCO ₃
3	01-085-0457 (A)	Quartz low	alpha-SiO ₂
4	00-020-0548 (D)	Albite, calcian	(Na,Ca)(Si,Al) ₄ O ₈
5	00-004-0733 (I)	Portlandite	Ca(OH) ₂

El material de sellado encontrado contiene Calcita, Vaterita, Cuarzo bajo, Albite y Portlandita. La presencia de portlandita podría explicarse a que la muestra no se encontraba del todo limpia, al momento de extraer el material de la grieta parte del hormigón se desprendió y se mezcló con la muestra, por lo que la portlandita correspondería a la hidratación del cemento. Lo mismo pudo ocurrir con el Cuarzo bajo, ya que por la difracción realizada a la arcilla se pudo observar que el 41.76% de los cristales presentes en la arcilla correspondían a este tipo de cuarzo. La albite de calcio es un mineral del grupo de los silicatos, y tanto en el cemento como en la arcilla encontramos Silicio que pudo dar origen a su formación. Tampoco puede descartarse el aporte de la arena utilizada en la mezcla.

Si bien se desconoce el porcentaje de Calcita y Vaterita, sí se sabe que fueron los cristales más abundantes en el material de sellado, lo cual concuerda con lo esperado. Ambos cristales son polimorfismos del carbonato de calcio, es decir presentan la misma formulación química, pero difieren en sus propiedades cristalográficas. Esta formación está directamente relacionada con el aporte de las bacterias como se detalló en el capítulo 2, sin embargo no puede descartarse el aporte de la auto-reparación autógena del hormigón.

6.6.2 Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido o SEM (Sigla en inglés de Scanning Electron Microscope) es un instrumento capaz de ofrecer un variado rango de informaciones procedentes de la superficie de una muestra. El fundamento del SEM radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una columna en la que se ha hecho un vacío. En ella, el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas. El haz electrónico concentrado es desplazado sobre toda la superficie de la muestra produciéndose electrones secundarios que van

siendo captados por un colector de electrones que registrará la intensidad de los electrones emitidos por cada punto de la muestra. Esta señal es amplificada para producir las imágenes.

Para observar la morfología del material de sellado se usó el microscopio marca JEOL modelo JSM-IT300LV. La muestra se secó supercríticamente y se recubrió con oro, ya que se necesita que sea conductora. Se usó una tensión de aceleración de 15 kV.

Mediante el SEM, también fue posible realizar un análisis composicional EDX (Espectrometría de dispersión de energía de rayos X), la cual consiste en identificar los elementos presentes y establecer su concentración mediante la medición de la energía de los rayos X que se generan en una muestra sometida al bombardeo electrónico. Para esto el microscopio posee un detector EDX AZTec Oxford.

Las Figuras 6-33 y 6-34 corresponden a las imágenes obtenidas del SEM a una resolución de 850X y 1500X respectivamente. En las imágenes, se observan ciertas formaciones romboédricas que podrían corresponder al carbonato de calcio (ya sea vaterita o calcita), pero también se observa bastante material amorfo que no aportaría protección a la grieta dado que no presenta la dureza necesaria (tanto la calcita como la vaterita poseen una dureza de 3 en la escala de Mohs). Estos materiales amorfos no pueden ser identificados por el DRX, por lo que faltaría información para determinar con mayor precisión la calidad del material de sellado.

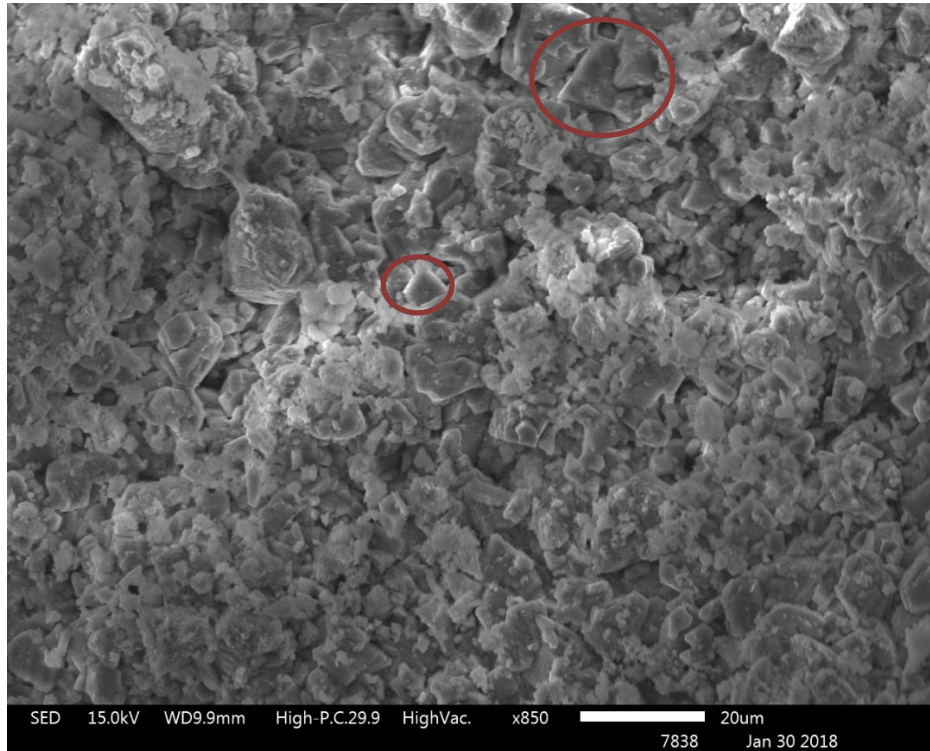


Figura 6 - 34: Imagen SEM material de sellado 850X.

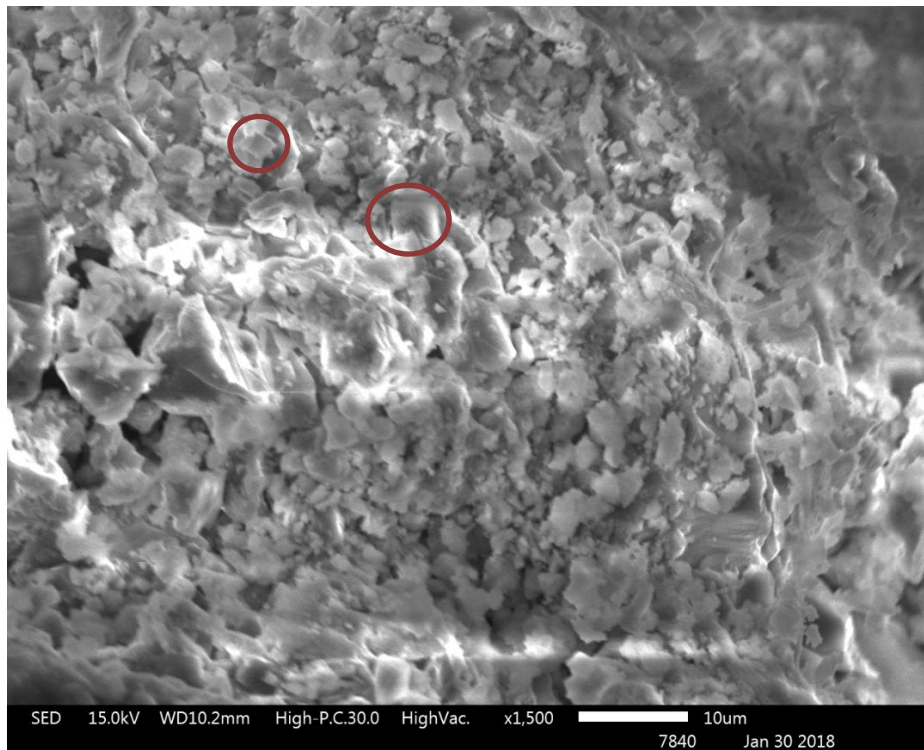


Figura 6 - 35: Imagen SEM material de sellado 1500X.

Los elementos registrados mediante el análisis EDX se presentan en la Tabla 6-14 y gráficamente en la Figura 6-35.

Tabla 6 - 14: DRX.

Elemento	Concentración Aparente	Razón	Wt%
C	4.03	0.04029	13.51
O	34.95	0.11759	54.76
Na	0.34	0.00144	0.32
Mg	1.48	0.00982	1.52
Al	1.21	0.00866	1.12
Si	3.58	0.02838	3.1
Ca	30.09	0.26883	25
Fe	0.66	0.00655	0.67
Total:			100

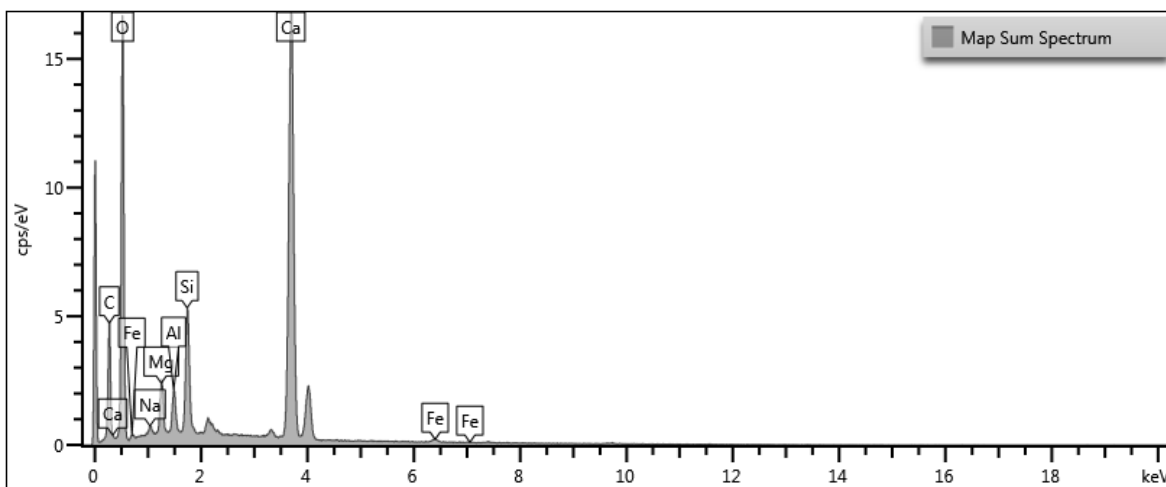


Figura 6- 1: DRX

Los resultados ponen de manifiesto la presencia de carbono, oxígeno y calcio en altas cantidades, lo que ratifica los resultados de la DRX sobre la aparición de cristales de CaCO₃.

Los resultados del DRX presentads en la sección 6.6.1 entregaron además la presencia de Albíta cálcica, cuya fórmula es (Na,Ca)(Si,Al)₄O₈. Los elementos que la componen también aparecen dentro del listado entregado por el microscopio. Este cristal también es denominado labradorita y

tiene una dureza de 6 a 6.5 en la escala de Mohs, lo que lo hace un cristal idóneo para el sellado, sin embargo no fue abundante. Se desconoce además las reacciones que llevaron a su formación.

Finalmente, el listado de elementos, muestra la presencia de Magnesio y Fierro, ambos elementos no fueron detectados por el DRX, por lo que no estarían conformando ningún cristal.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

Los materiales auto-reparables son capaces de remediar los daños sufridos por el paso del tiempo, las condiciones ambientales, el desgaste, o sollicitaciones externas; por lo que pueden traer ventajas económicas y ambientales por sobre los materiales convencionales. Dentro de este contexto, e inspirado en procesos que se pueden ver habitualmente en la naturaleza es que se ha ido desarrollando un hormigón capaz de sellarse sin intervención humana cuando presenta una fisura o microgrieta.

Una de las técnicas que se emplea para conseguir un hormigón auto-reparable, es incluir bacterias en la mezcla de hormigón capaces de precipitar carbonato de calcio y sellar grietas. Esta fue la técnica estudiada en esta investigación, cuyo propósito principal fue contribuir en la factibilidad de este método mediante el estudio de dos variables fundamentales en las obras de hormigón: el tipo de cemento empleado en la mezcla y la temperatura de exposición.

Es por esto, que el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la temperatura y del tipo de cemento utilizado en la matriz de hormigón en la capacidad de auto-reparación de la bacteria *bacillus pseudofirmus*.

Las conclusiones respecto al efecto de la temperatura fueron las siguientes:

- Para una temperatura de 4°C no hubo reparación en ninguno de los hormigones estudiados. La ausencia de precipitado significa que no hubo activación de las bacterias, ni auto-reparación autógena del hormigón. Se puede concluir que a los 4°C la bacteria *Bacillus Pseudofirmus* no puede sellar fisuras en el hormigón.
- Para una temperatura mayor a 30°C, se observó respuesta tanto en mezclas de control sin bacterias, como en mezclas con bacterias, siendo el máximo espesor sellado 0.147 mm para ambos casos. Por lo tanto, no se puede atribuir la auto-reparación exclusivamente a las bacterias.
- De todas las mezclas estudiadas, las que tuvieron mayor auto-reparación fueron las con bacterias y a una temperatura de 23°C, con un relleno máximo de grietas de 0.38 mm de ancho. Por otro lado, el sellado en probetas de control fue de 0.165 mm de ancho de grieta a la misma temperatura. Con esto, se puede concluir que a los 23°C sí hubo un efecto de las bacterias.

- Según lo observado durante el estudio del efecto de la temperatura, se observó una relación entre el espesor de agrietamiento inicial y el espesor de sellado de las mezclas, pues las fisuras de menor espesor inicial se rellenan con mayor facilidad que aquellas con un espesor mayor.
- Se puede concluir que la temperatura sí es un factor que influye en la auto-reparación del hormigón, ya sea la auto-reparación que ocurre de manera autógena, como aquella que ocurre mediante la acción de las bacterias.

Las conclusiones respecto al efecto del tipo de cemento en la mezcla fueron las siguientes:

- En ambos tipos de cemento, las probetas de control presentaron el menor porcentaje de auto-reparación, tanto en la evaluación de las áreas como de los espesores. Para las probetas de control con cemento portland, el máximo espesor sellado medido fue de 0.165 mm, y para el puzolánico fue de 0.174 mm. Al comparar el porcentaje del área sellada se observan mejores resultados para el cemento puzolánico, sin embargo, no fueron diferencias significativas.
- Para el caso de las probetas con bacterias, el máximo espesor sellado de grietas para el cemento portland fue de 0.38 mm, y de 0.18 mm para el cemento puzolánico. Se concluye que el cemento portland sería el más propicio para la actividad bacteriana como se planteó en la hipótesis.
- La tercera mezcla que se incluyó en el estudio del efecto del cemento, fue un hormigón sin bacterias, pero con arcilla expandida impregnada solo con el lactato de calcio. Para este caso los resultados del máximo espesor sellado para cemento portland y puzolánico fue 0.27 y 0.21 mm respectivamente. Esto supone, que el lactato de calcio puede actuar por sí solo para formar la precipitación.
- Se puede concluir que el cemento no es un factor que influye en la auto-reparación autógena del hormigón, pues las mezclas de control no mostraron grandes diferencias entre los tipos de cemento. Sin embargo, el tipo de cemento sí es un factor que incide en la auto-reparación por medio de bacterias. Los mejores resultados fueron para el cemento portland.

Otras conclusiones, no directamente relacionadas con el efecto de la temperatura y el tipo de cemento son:

- La mayor tasa de reparación del hormigón se obtiene luego de la primera y hasta la tercera semana desde el agrietamiento, posteriormente la tasa de sellado se detiene.
- Los resultados entregados por el análisis cromatográfico permiten concluir que el agua actúa como fuente de calcio, pues los cationes medidos antes de la auto-reparación disminuyeron considerablemente una vez finalizado el proceso.
- Se concluye que no hubo efecto de las bacterias y lactato de calcio en la resistencia a la compresión del hormigón en el mediano plazo. Sin embargo, en edades tempranas se observó mayores resistencias para las probetas con el lactato de calcio, por lo que el reactivo podría actuar como un acelerador del proceso de fraguado del hormigón.

7.2 RECOMENDACIONES

Considerando las conclusiones obtenidas en este estudio no se recomienda el uso de este tipo de agente de auto-reparación a bajas temperaturas. Se podría buscar un tipo de bacteria psicrófila, las cuales se desarrollan entre -5 y 30°C, que tendría más potencial a bajas temperaturas. Por otro lado, se podría repetir el experimento con temperaturas entre 4 y 23°C para encontrar así el punto en donde comience a precipitar carbonato de calcio.

Si bien, a los 23°C hubo auto-reparación en las probetas con bacterias, no se alcanzó el potencial observado en otras investigaciones (máximo espesor sellado 0.48 mm), esto se puede atribuir al método de impregnación de la bacteria en la arcilla expandida. Al dejar la arcilla impregnando con la solución biológica durante toda la noche parte de las bacterias pudieron activarse de manera temprana en vez de mantenerse inactivas hasta la aparición de la fisura. Esto se puede respaldar con la prueba del número más probable, en donde a los días de preparado el hormigón la cantidad de bacterias fue menor. Es por esto que se sugiere realizar la impregnación de manera inmediata mediante vacío como se ha visto en otras investigaciones, o considerar la utilización de otro tipo de encapsulación que podría permitir incluso la auto-reparación sin la incorporación de agua.

Por otro lado, luego de analizar la metodología de trabajo y los resultados de este estudio, se recomienda buscar un método de agrietamiento que permita una menor variabilidad en las fisuras y que evite la fractura total de las probetas. Al tener fisuras de tamaños tan diversos, resulta difícil establecer una relación consistente, pues aquellas con anchos iniciales menores tendrán más probabilidad de sellado (ya sea autógeno o por bacterias) que las de mayor tamaño.

Asimismo, para que el método sea realmente beneficioso respecto a los costos de su implementación, se recomienda estudiar y modificar ciertas técnicas, como por ejemplo los reactivos para su cultivo y esporulación, o la fuente de calcio utilizada. El lactato de calcio tiene un costo alto, que encarece bastante la técnica por lo que podría reemplazarse por otras marcas del mismo componente pero de la industria de la alimentación, o bien buscar otras sales cálcicas, además de estudiar en mayor detalle el efecto del lactato de calcio, u otras fuentes de calcio por sí solas (sin la incorporación de bacterias).

Finalmente, se sugiere estudiar otras dosificaciones para el hormigón y distintas concentraciones de bacterias para poder optimizar la mezcla.

8. REFERENCIAS

- Adhesives Technology Corporation, A. (2016). *The Concrete Repair Industry*.
- B. Janto, A. A.-A. (2011). Genome of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 reveals adaptations that support the ability to grow in an external pH range from 7.5 to 11.4. *Environmental microbiology*, 3289–309.
- Becker. (s.f.). *Cemento Pórtland Puzolánico, características y recomendaciones de uso*.
- Becker, E. (2000). CEMENTO PÓRTLAND - Características y Recomendaciones de Uso. *LOMA NEGRA C.I.A.S.A.*
- Becker, E. (2001). CEMENTO PÓRTLAND PUZOLÁNICO - Características y Recomendaciones. *LOMA NEGRA C.I.A.S.A.*
- Benyus, J. M. (1997). *Biomimicry: Innovation Inspired by Nature*.
- Blanco-Gutierrez, V., Demourgues, A., Jubera, V., & Gaudon, M. (2014). Eu(III)/Eu(II)-doped (Ca_{0.7}Sr_{0.3})CO₃ phosphors with. *Materials Chemistry C*, 9969–9977.
- BORSI. (2001). Árido ligero expandido a base de residuos: Aspectos técnicos y económicos. *Revista de la Bolsa Nacional de Residuos y Subproductos Industriales de Colombia*, 2.
- Cailleux, & Pollet. (2009). *Investigation on development of self-healing properties in protective coatings for concrete and repair mortars*. Chicago.
- Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G., & Perthuisot, J.-P. (1999). Ca-carbonates precipitation and limestone genesis. *Elsevier Sedimentary Geology*, 9–23.
- Chahala, Siddique, & Rajor. (2011). Influence of bacteria on the compressive strength, water absorption and rapid chloride permeability of fly ash concrete. *Construction and Building Materials*, 645-651.
- Chatterji. (2003). Desarrollo de la microestructura de materiales con cemento Portland y su relación con las características mecánicas. *Cemento-Hormigon*.
- De Muynck, W., De Belie, N., & Verstraete, W. (2010). Microbial carbonate precipitation in construction materials A review. *Ecological Engineering*, 118-136.
- Diaz, M. (2009). Mineralización de sales de calcio sobre polímeros modificados e híbridos organo-inorgánicos. Santiago: Universidad de Chile.

- Douglas, & Beveridge. (1998). Mineral formation by bacteria in natural microbial communities.
- EHE. (2008). *Instrucción del Hormigón Estructural EHE-08I*. Ed. Centro de Publicaciones de la Secretaría Técnica del Ministerio de Fomento.
- Elwell, D., & Scheel, H. J. (1975). *Crystals Grown from High-Temperature Solutions* (1 ed.). Zurich: Academic Press.
- Gartner, & Macphee. (2011). A physico-chemical basis for novel cementitious binders. *Elsevier*, 736–749.
- Hammes, F., & Verstraete, W. (2002). Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technolog*, 3-7.
- Huang, Ye, Qian, & Schlangen. (2016). Self-healing in cementitious materials: Materials, methods and service conditions. *Elsevier*, 499-511.
- Huanga, H., Yeb, G., Qian, C., & Schlangen, E. (2015). Self-healing in cementitious materials: Materials, methods and service conditions. *Materials and design*, 499-511.
- Jonkers, H., & Schlangen, E. (2008). Development of a bacteria-based self healing concrete. *Taylor Made Concrete Structures: New Solutions for our Society*.
- Jonkers, Thijssen, Muyzer, Copuroglu, & Schlangen. (2010). Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Elsevier*, 230-235.
- Khaliq, W., & Basit Ehsan, M. (2016). Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques. *Construction and Building Materials*(15), 349-357.
- Kile, D., Eberl, D., & Hoch, A. (2000). An assessment of calcite crystal growth mechanisms based on crystal size distributions. *Geochimica et Cosmochimica*, 64(17), 2937–2950.
- Klein, C., & Hurlbut, C. (1996). *Manual de Mineralogia, Tomo I* (4ta ed.). Barcelona: Reverté.
- Kunamineni, V., Murmu, M., & Deo V, S. (2017). Bacteria based self healing concrete: A review. *Construction and Building Materials*(152), 1008-1014.
- Lowenstam, H. A., & Weiner, S. (1981). Minerals formed by organism. *Science*(211), 1126-1131.
- Luo, M., & Qian, C. (2016). Influences of bacteria-based self-healing agents on cementitious materials hydration kinetics and compressive strength. *Construction and Building Materials*(121), 659-663.

- Luo, Qian, & Li. (2015). Factors affecting crack repairing capacity of bacteria-based self-healing concrete. *Elsevier*, 1-7.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., Stahl, D., & Brock, T. (2014). *Brock Biology of Microorganisms* (14 ed.). Pearson.
- Mann, S. (2001). *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. Oxford University Press.
- Marsell, R., & Einhorn, T. A. (2011). The biology of fracture healing. *Injury*, 42, 551–555.
- Mihashi, & Nishiwaki. (2012). Development of engineered self-healing and self-repairing concrete. 170-184.
- Narayanasamy, Alvarado, & Sanchez. (s.f.). *Potential of soil bacteria from the Comarca Lagunera, North-east México for bioconcrete development*.
- Nch 148 Of 168, N. (1998). *Cemento-Terminología, Clasificación y Especificaciones Generales*.
- Nielsen, P., Fritze, D., & Priest, F. (1995). Phenetic diversity of alkaliphilic Bacillus strains: proposal for nine new species. *Microbiology*, 141, 1745-1761.
- Páramo, L., Narváez, J., & Ortega, B. (2015). La Bioprecipitación de Carbonato de Calcio por la Biota Nativa como método de restauración. *Nexo*, 28(01), 25-40.
- Paul, Á., & Lopez, M. (2011). Assessing Lightweight Aggregate Efficiency for Maximizing Internal Curing Performance . *ACI Materials Journal* , 385-393.
- Potter, M. C., & Wiggert, C. (2003). *Mecánica de Fluidos* (3 ed.). S.A. Ediciones Paraninfo.
- Prescott. (1999). *Microbiología*. Mc Graw Hill.
- REACH Parlamento Europeo. (2015). *Reglamento (UE) 2015/830*.
- Reinhardt, & Jooss. (2003). Permeability and self-healing of cracked concrete as a function of temperature and crack width.
- Schultze-Lam, S., Fortin, S., Davis, B., & Beveridge, T. (1996). Mineralization of bacterial surfaces . *Chemical Geology*(132), 171-181 .
- Siddique, R., Nanda, V., Kunal, Kadri, E.-H., Khan, M. I., Singh, M., & Rajor, A. (2016). Influence of bacteria on compressive strength and permeation properties of concrete made with cement baghouse filter dust. *Construction and Building Materials*(106), 461–469.

- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). *Principios de Analisis Instrumental* (5ta ed.). Mc Graw Hill.
- Stuckrath, C. (2014). Quantification of chemical and biological calcium carbonate precipitation: Performance of self-healing in reinforced mortar containing chemical admixtures. *Elsevier*, 10-15.
- Stuckrath, C., Valenzuela, L., & Lopez, M. (2012). Remediación del hormigón mediante bacterias. *Journal I3 Investigación, Interdisciplina, Innovación*, 29-21.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Editorial Médica Panamericana S.A.
- Tziviloglou, E., Van Tittelboom, K., Palin, D., Wang, J., Sierra-Beltrán, M. G., Çagatay Erşan, Y., . . . De Belie, N. (2016). Bio-Based Self-Healing Concrete: From Research to Field Application. *Advances in Polymer Science*, 273.
- Tziviloglou, E., Wiktor, V., & Jonkers, H. M. (2013). Preparation and optimization of bio-based and light weight aggregate-based healing agent for application in concrete.
- Tziviloglou, Wiktor, & Schlangen, J. &. (2016). Performance requirements to ensure the efficiency of bacteria-based self-healing concrete.
- Tziviloglou, Wiktor, Jonkers, & Schlangen. (2016). Bacteria-based self-healing concrete to increase liquid tightness of cracks. *Elsevier*, 118-125.
- Ubeda, C. (2014). *Estudio comparativo de hormigones autosellantes*. Madrid.
- Vijay, K., Murmu, M., & Deo, S. V. (2017). Bacteria based self healing concrete. *Construction and Building Materials*(152), 1008-1014.
- Wang, J., De Belie, N., & Verstraete, W. (2012). Diatomaceous earth as a protective vehicle for bacteria applied. *J Ind Microbiol Biotechnol*(39), 567-577.
- Wang, J., Mignon, A., Snoeck, D., Wiktor, V., Van Vliergerghe, S., & Boon, N. (2015). Application of modified-alginate encapsulated carbonate producing bacteria in concrete: a promising strategy for crack self-healing. *Front Microbiol*(6), 1088.
- Wang, J., Van Tittelboom, K., De Belie, N., & Verstraete, W. (2012). Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete. *Construction and Building Materials*, 1(26), 532-540.

- Wang, Soens, & Verstraete. (2014). Self-Healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores. *elsevier*, 139-152.
- Wiktor, V., & Jonkers, H. (2011). Quantification of crack healing in novel bacteria based self-healing concrete. *Elsevier*, 763-770.
- Woomer, P. (1994). Most probable number counts. En *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties* (págs. 59-79). Madison, EUA.: SSSA Book Series, No 5.
- Yurkanis Bruice, P. (2007). *Fundamentos de Química Orgánica* (1 ed.). Santa Barbara: Pearson Education.
- Zhang, J., Mai, B., Cai, T., Luo, J., Wu, W., Liu, B., . . . Deng, X. (2017). Optimization of a Binary Concrete Crack Self-Healing System Containing Bacteria and Oxygen. *MDPI*, 1-11.

ANEXOS

A. TABLA DE ESTIMACIÓN POBLACIONAL DE BACTERIAS PARA MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (Woomer, 1994)

Núm. Respuestas Pos. por Nivel de Dilución	Población estimada*	Núm. Respuestas Pos. por Nivel de Dilución	Población estimada*
1-2-3-4-5-6		1-2-3-4-5-6	
1-0-0-0-0-0	1.9	5-5-4-2-0-0	2159
1-1-0-0-0-0	4	5-5-4-3-0-0	2716
2-0-0-0-0-0	4.4	5-5-5-0-0-0	2305
2-1-0-0-0-0	6.8	5-5-5-0-1-0	3126
3-0-0-0-0-0	7.7	5-5-5-1-0-0	3282
3-1-0-0-0-0	10	5-5-5-1-1-0	4532
3-2-0-0-0-0	13	5-5-5-2-0-0	4922
4-0-0-0-0-0	12	5-5-5-2-1-0	6918
4-1-0-0-0-0	16	5-5-5-3-0-0	7797
4-2-0-0-0-0	21	5-5-5-3-1-0	10702
4-3-0-0-0-0	27	5-5-5-3-2-0	13826
5-0-0-0-0-0	23	5-5-5-4-0-0	12753
5-0-1-0-0-0	31	5-5-5-4-1-0	16902
5-1-0-0-0-0	33	5-5-5-4-2-0	21589
5-1-1-0-0-0	45	5-5-5-4-3-0	27150
5-2-0-0-0-0	49	5-5-5-5-0-0	23054
5-2-1-0-0-0	69	5-5-5-5-0-1	31225
5-3-0-0-0-0	78	5-5-5-5-1-0	32720
5-3-1-0-0-0	107	5-5-5-5-1-1	45261
5-3-2-0-0-0	138	5-5-5-5-2-0	49224
5-4-0-0-0-0	127	5-5-5-5-2-1	69148
5-4-1-0-0-0	169	5-5-5-5-3-0	78127
5-4-2-0-0-0	216	5-5-5-5-3-1	107022
5-4-3-0-0-0	270	5-5-5-5-3-2	138269
5-5-0-0-0-0	230	5-5-5-5-4-0	127528
5-5-0-1-0-0	312	5-5-5-5-4-1	169028
5-5-1-0-0-0	327	5-5-5-5-4-2	215899
5-5-1-1-0-0	453	5-5-5-5-4-3	271557
5-5-2-0-0-0	488	5-5-5-5-4-4	334051
5-5-2-1-0-0	692	5-5-5-5-5-0	230546
5-5-3-0-0-0	780	5-5-5-5-5-1	328192
5-5-3-1-0-0	1070	5-5-5-5-5-2	492238
5-5-3-2-0-0	1383	5-5-5-5-5-3	781272
5-5-4-0-0-0	1275	5-5-5-5-5-4	1312535
5-5-4-1-0-0	1690		

* Esta es la densidad poblacional estimada asumiendo 1 ml de inóculo. Este valor debe ser ajustado por el factor de dilución y el volumen de inóculo (por ejemplo, si usted inoculó en cada placa un volumen de 10 µl, entonces el valor de la tabla debe ser corregido multiplicándolo por 100 [10 X 100 = 1,000 µl ó 1 ml]).

B. CALIDAD DEL AGUA AGUAS CORDILLERA S.A.

TIPO DE PARÁMETRO	PARÁMETRO	LÍMITE	UNIDADES	VALOR PROMEDIO	EVALUACIÓN
OBLIGATORIO	COLIFORMES TOTALES	Ausencia	NMP	Ausencia	Cumple
OBLIGATORIO	TURBIEDAD	2,0	NTU	0,8	Cumple
NO CRITICO	COBRE TOTAL	2	mg/L		Cumple
NO CRITICO	CROMO TOTAL	0,05	mg/L		Cumple
NO CRITICO	FLUORURO	1,5	mg/L	0,6	Cumple
CRITICO	HIERRO TOTAL	0,3	mg/L	0,1	Cumple
CRITICO	MANGANESO TOTAL	0,1	mg/L	0	Cumple
NO CRITICO	MAGNESIO	125	mg/L		Cumple
NO CRITICO	SELENIO	0,01	mg/L		Cumple
NO CRITICO	ZINC	3	mg/L		Cumple
CRITICO	ARSÉNICO	0.01	mg/L	0	Cumple
NO CRITICO	CADMIO	0,01	mg/L		Cumple
NO CRITICO	CIANURO	0,05	mg/L		Cumple
NO CRITICO	MERCURIO	0,001	mg/L		Cumple
NO CRITICO	NITRATOS	50	mg/L		Cumple
NO CRITICO	NITRITOS	3	mg/L		Cumple
NO CRITICO	RAZON NITRATOS + NITRITOS	1	Razón	0,1	Cumple
NO CRITICO	PLOMO	0,05	mg/L		Cumple
NO CRITICO	TETRACLOROETENO	40	ug/L		Cumple
NO CRITICO	BENCENO	10	ug/L		Cumple
NO CRITICO	TOLUENO	700	ug/L		Cumple
NO CRITICO	XILENOS	500	ug/L		Cumple
NO CRITICO	DDT + DDD + DDE	2	ug/L		Cumple
NO CRITICO	2,4 - D	30	ug/L		Cumple
NO CRITICO	LINDANO	2	ug/L		Cumple
NO CRITICO	METOXICLORO	20	ug/L		Cumple
NO CRITICO	PENTAFLOROFENOL	9	ug/L		Cumple
NO CRITICO	MONOCLORAMINAS	3	mg/L		Cumple
NO CRITICO	DIBROMOCLOROMETANO	0,1	mg/L		Cumple

NO CRITICO	BROMODICLOROMETANO	0,06	mg/L		Cumple
NO CRITICO	TRIBROMOMETANO	0,1	mg/L		Cumple
NO CRITICO	TRICLOROMETANO	0,2	mg/L		Cumple
NO CRITICO	TRIHALOMETANOS	1	Razón	0	Cumple
NO CRITICO	COLOR VERDADERO	20	U Pt/Co		Cumple
NO CRITICO	OLOR	Sin Olor		Sin Olor	Cumple
NO CRITICO	SABOR	Sin Sabor		Sin Sabor	Cumple
NO CRITICO	AMONIACO	1,5	mg/L		Cumple
NO CRITICO	CLORUROS	400	mg/L		Cumple
NO CRITICO	PH	6,5 - 8,5	Unidades		Cumple
NO CRITICO	SULFATOS	500	mg/L		Cumple
NO CRITICO	SÓLIDOS DISUELTOS TOTALES	1,500	mg/L		Cumple
NO CRITICO	COMPUESTOS FENÓLICOS	2	ug/L		Cumple
OBLIGATORIO	CLORO LIBRE RESIDUAL	0,2 - 2,0	mg/L	0,77	Cumple

La evaluación se realiza de acuerdo a todo lo que se establece en la Norma Chilena NCh409/1 Agua Potable - Requisitos, en función de los resultados de autocontrol realizados por las propias empresas concesionarias.

La Norma Chilena NCh409/1 Agua Potable establece como parámetros críticos "aquellos parámetros característicos de la fuente o del servicio, tóxicos u organolépticos (Tipo II o Tipo IV), que en ausencia o falla del proceso de tratamiento superan el límite máximo especificado en NCh409/1". Vale decir son parámetros que, dadas las características locales del servicio, deben ser controlados con una mayor frecuencia.

La frecuencia mínima de control de los parámetros No Críticos es semestral en aquellos servicios que presenten fuentes de abastecimiento de tipo superficial o mixtas y anual en aquellos servicios que presenten sólo fuentes de abastecimiento subterráneas.

*La Autoridad Sanitaria, de acuerdo a lo que se señala en la propia Norma Chilena NCh409/1, ha autorizado un plazo excepcional para dar cumplimiento al límite de 0,01 mg/L de arsénico, estableciendo para ello un límite intermedio de 0,03 mg/L.

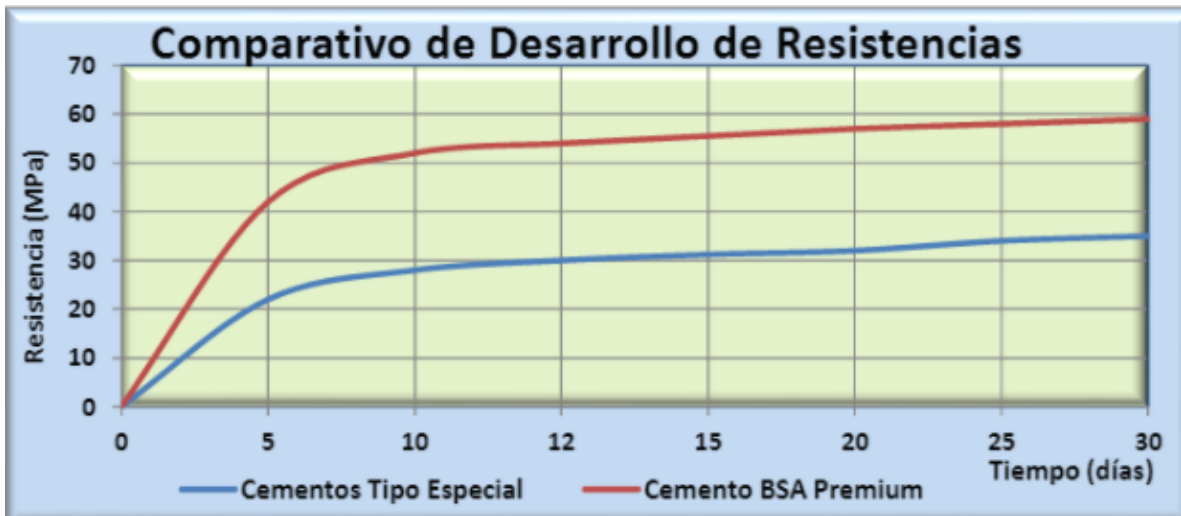
C. INFORMACIÓN TÉCNICA CEMENTOS BSA

1. BSA ESPECIAL

Indicador	BSA Especial	NCh 148 Of. 68
Fraguado inicial (minutos)	150	Mayor a 60
Fraguado final (minutos)	250	Menor a 720
Superficie específica - Blaine (cm ² /gr)	4000	-
Peso Específico (kg/m ³)	2800	-
Pérdida por Calcinación (%)	3,0	Menor a 5,0
Residuo Insoluble (%)	35	Menor a 50
Contenido de SO ₃	1,8	Menor a 4,0
Resistencia a compresión (kgf/cm ²)		
7 días	240	Mayor a 180
28 días	370	Mayor a 250
Resistencia a flexotracción (kgf/cm ²)		
7 días	45	Mayor a 35
28 días	55	Mayor a 45

2. BSA PREMIUM

Indicador	BSA Premium	NCh 148 Of. 68
Fraguado inicial (minutos)	100	Mayor a 45
Fraguado final (minutos)	240	Menor a 600
Superficie específica - Blaine (cm ² /gr)	3300	-
Peso Específico (kg/m ³)	3,10	-
Pérdida por Calcinación (%)	2,50	Menor a 3,00
Residuo Insoluble (%)	1,00	Menor a 1,50
Contenido de SO ₃	2,0	Menor a 4,0
Contenido de MgO (%)	3,5	Menor a 5,0
Resistencia a compresión (kgf/cm ²)		
1 día	180	
3 días	330	
7 días	420	Mayor a 250
28 días	540	Mayor a 350
Resistencia a flexotracción (kgf/cm ²)		
1 día	30	
3 días	50	
7 días	70	Mayor a 45
28 días	80	Mayor a 55



D. DATOS OBTENIDOS MEDIANTE EL SOFTWARE *IMAGEJ*

1. RESULTADOS DE LA AUTO-REPARACIÓN SEGÚN EL PORCENTAJE DE ÁREA SELLADA PARA DISTINTAS TEMPERATURAS

T	Mezcla	Día	Área no sellada [mm ²]			% Auto-reparación			Promedio %Auto-reparación	Desv %Auto-reparación
4°C	Bacteria	0	5.01	3.10	5.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		7	5.01	3.10	5.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		14	5.01	3.10	5.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		21	5.01	3.10	5.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		35	5.01	3.10	5.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		63	5.01	3.10	5.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Control	0	8.94	5.14	7.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		7	8.94	5.14	7.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		14	8.94	5.14	7.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		21	8.94	5.14	7.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		35	8.94	5.14	7.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		63	8.94	5.14	7.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
30°C	Bacteria	0	7.27	9.62	10.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		7	6.75	9.62	10.48	7.11	0.02	0.18	2.44	4.05
		14	5.45	7.80	7.51	25.04	18.91	28.51	24.16	4.86
		21	5.43	6.46	7.49	25.22	32.84	28.70	28.92	3.82
		35	5.27	6.34	7.34	27.51	34.13	30.08	30.57	3.34
		63	4.69	6.17	7.34	35.48	35.92	30.08	33.83	3.25
	Control	0	4.04	2.87	5.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		7	3.03	2.52	4.22	24.88	12.06	26.01	20.98	7.75
		14	3.03	1.91	3.57	24.88	33.59	37.42	31.96	6.43
		21	2.88	1.72	3.29	28.77	40.00	42.44	37.07	7.29
		35	2.58	1.71	3.07	36.12	40.45	46.21	40.93	5.06
		63	2.22	1.64	3.05	45.09	42.93	46.59	44.87	1.84
23°C	Bacteria	0	2.95	9.87	9.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		7	2.82	7.38	9.01	4.21	25.24	0.03	9.83	13.51
		14	0.95	6.40	6.05	67.67	35.13	32.90	45.24	19.46
		21	0.69	4.47	4.96	76.67	54.66	45.02	58.79	16.22
		35	0.68	4.46	4.65	77.01	54.84	48.45	60.10	14.99
		63	0.52	4.45	4.59	82.48	54.86	49.05	62.13	17.86
	Control	0	7.29	7.34	9.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		7	7.29	7.32	8.97	0.00	0.25	1.17	0.47	0.62
		14	6.44	6.02	8.32	11.66	18.00	8.32	12.66	4.92

		21	6.41	6.01	8.32	12.16	18.16	8.30	12.87	4.97
		35	6.20	5.24	8.22	14.93	28.61	9.38	17.64	9.90
		63	5.44	5.08	8.12	25.41	30.74	10.52	22.22	10.48

2. RESULTADOS DE LA AUTO-REPARACIÓN SEGÚN EL PORCENTAJE DE ÁREA SELLADA PARA DIFERENTES TIPOS DE CEMENTO

C	Mezcla	Día	Área no sellada [mm2]			% Auto-reparación			Promedio	Desv
Portland	Bacteria	0	2.95	9.87	9.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		7	2.82	7.38	9.01	4.21	25.24	0.03	9.83	13.51
		14	0.95	6.40	6.05	67.67	35.13	32.90	45.24	19.46
		21	0.69	4.47	4.96	76.67	54.66	45.02	58.79	16.22
		35	0.68	4.46	4.65	77.01	54.84	48.45	60.10	14.99
		63	0.52	4.45	4.59	82.48	54.86	49.05	62.13	17.86
	Lactato	0	9.93	3.54	-	0.00	0.00	-	0.00	0.00
		7	9.66	3.06	-	2.66	13.69	-	8.17	7.80
		14	5.83	2.69	-	41.28	24.13	-	32.70	12.13
		21	5.82	2.24	-	41.43	36.94	-	39.18	3.18
		35	5.15	1.76	-	48.17	50.23	-	49.20	1.46
		63	4.85	1.56	-	51.19	55.93	-	53.56	3.35
	Control	0	7.29	7.34	9.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		7	7.29	7.32	8.97	0.00	0.25	1.17	0.47	0.62
		14	6.44	6.02	8.32	11.66	18.00	8.32	12.66	4.92
		21	6.41	6.01	8.32	12.16	18.16	8.30	12.87	4.97
		35	6.20	5.24	8.22	14.93	28.61	9.38	17.64	9.90
		63	5.44	5.08	8.12	25.41	30.74	10.52	22.22	10.48
Puzolánico	Bacteria	0	5.30	4.22	3.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		7	4.59	2.99	2.89	13.31	29.07	23.87	22.08	8.03
		14	3.41	1.79	1.73	35.72	57.59	54.34	49.22	11.80
		21	2.59	0.98	0.93	51.07	76.81	75.52	67.80	14.50
		35	2.50	0.74	0.81	52.75	82.42	78.73	71.30	16.17
		63	1.89	0.74	0.73	64.41	82.52	80.71	75.88	9.97
	Lactato	0	6.17	3.85	2.81	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		7	5.32	3.07	2.31	13.77	20.17	17.75	17.23	3.23
		14	3.57	1.38	0.76	42.11	64.09	72.76	59.65	15.80
		21	3.19	1.13	0.63	48.30	70.75	77.37	65.48	15.24
		35	2.48	0.78	0.38	59.76	79.63	86.42	75.27	13.85
		63	2.47	0.79	0.37	59.95	79.50	86.77	75.41	13.87
	Control	0	4.64	5.12	4.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		7	3.88	4.90	4.70	16.41	4.22	0.00	6.88	8.52
		14	3.53	4.59	4.34	23.98	10.26	7.75	14.00	8.73
		21	3.15	4.37	4.12	32.20	14.57	12.35	19.71	10.88
		35	2.70	4.08	3.70	41.97	20.21	21.28	27.82	12.26
		63	2.69	4.05	3.17	42.01	20.83	32.64	31.83	10.61

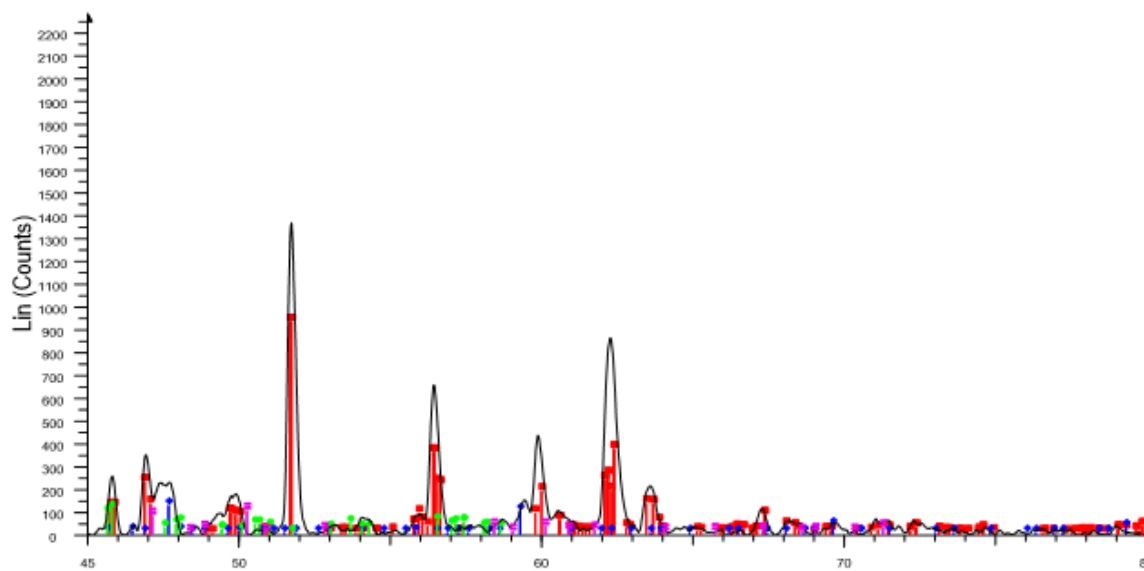
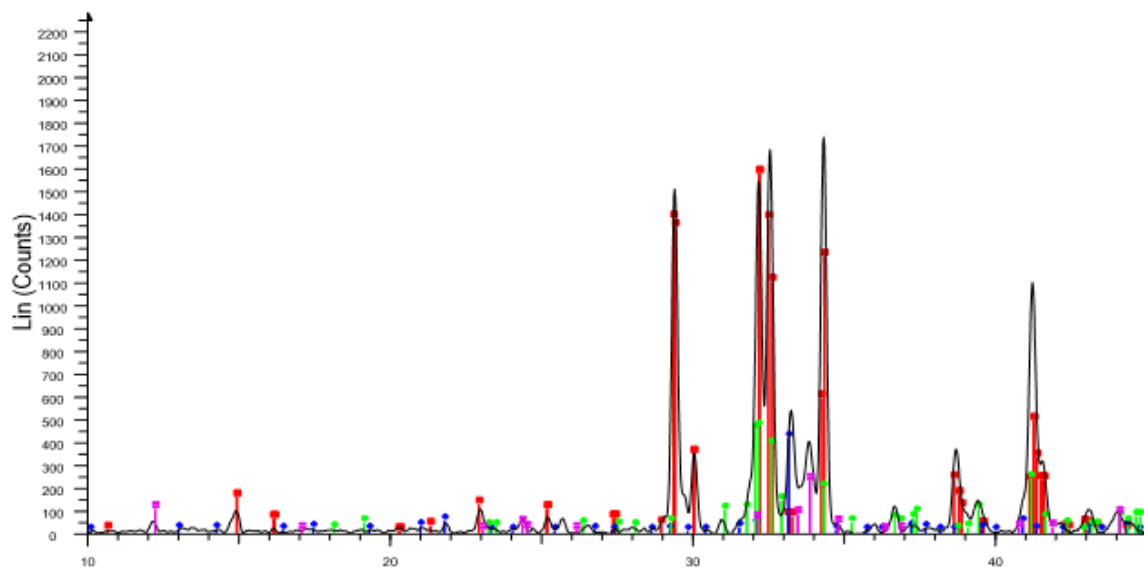
3. RESULTADOS DE LA AUTO-REPARACIÓN SEGÚN ESPESORES FINALES PARA DIFERENTES TEMERATURAS Y TIPOS DE CEMENTO

Mezcla		Espesor Inicial			Espesor a los 63 días			% Auto-reparación		
PT30	B	0.34	0.35	0.36	0.34	0.35	0.36	0	0	0
		0.33	0.26	0.30	0.33	0.26	0.30	0	0	0
		0.167	0.22	0.24	0.11	0.22	0.24	36.5	0	0
		0.179	0.17	0.23	0.07	0.17	0.11	60.3	0	51.9
		0.144	0.14	0.13	0.00	0.14	0.00	100	0	100
		0.077	0.08	0.09	0.00	0.00	0.00	100	100	100
		0.067	0.067	0.07	0.00	0.00	0.00	100	100	100
	C	0.15	0.22	0.22	0.15	0.22	0.22	0	0.0	0
		0.09	0.17	0.22	0.09	0.09	0.22	0	46.5	0
		0.11	0.18	0.15	0.11	0.10	0.14	0	45.3	8.1
		0.09	0.13	0.15	0.00	0.07	0.00	100	43.9	100
		0.08	0.09	0.08	0.00	0.05	0.00	100	43.0	100
		0.08	0.06	0.08	0.00	0.00	0.00	100	100	100
		-	-	0.07	-	-	0.00	-	-	100
PT23	B	0.16	0.34	0.44	0.12	0.21	0.35	25.6	38.9	20.1
		0.16	0.34	0.39	0.08	0.25	0.39	49.1	26.5	0.0
		0.16	0.34	0.26	0.00	0.29	0.22	100	12.8	15.4
		0.12	0.29	0.38	0.00	0.08	0.00	100	72.1	100
		0.08	0.13	0.08	0.00	0.00	0.00	100	100	100
		0.04	0.13	0.09	0.00	0.00	0.00	100	100	100
		-	0.17	-	-	0.00	-	-	100	-
	L	0.36	0.15	-	0.27	0.09	-	25.0	37.4	-
		0.32	0.14	-	0.27	0.05	-	14.2	66.9	-
		0.32	0.13	-	0.19	0.00	-	40.6	100	-
		0.27	0.14	-	0.00	0.00	-	100	100	-
		0.18	0.09	-	0.00	0.00	-	100	100	-
		0.18	0.09	-	0.00	0.00	-	100	100	-
		0.11	-	-	0.00	-	-	100	-	-
	C	0.40	0.29	0.50	0.27	0.29	0.50	33.4	0.0	0.0
		0.31	0.30	0.32	0.26	0.30	0.32	15.1	0.0	0.0
		0.27	0.21	0.36	0.22	0.21	0.36	16.2	0.5	0.0
		0.18	0.21	0.23	0.13	0.04	0.23	25.6	79.6	0.0
		0.13	0.17	0.22	0.00	0.00	0.22	100	100	0.0
		0.09	0.12	0.18	0.00	0.00	0.18	100	100	0.0
		-	-	-	-	-	-	-	-	-
PZ23	B	0.19	0.23	0.23	0.09	0.13	0.13	56.0	42.3	44.7

		0.19	0.18	0.18	0.12	0.00	0.00	36.8	100	100
		0.12	0.18	0.18	0.11	0.00	0.00	4.3	100	100
		0.12	0.14	0.09	0.00	0.00	0.00	100	100	100
		0.16	0.04	0.09	0.00	0.00	0.00	100	100	100
		0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100	-	-
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-	-	-
	L	0.30	0.28	0.18	0.17	0.12	0.14	42.8	58.0	25.8
	L	0.21	0.24	0.14	0.18	0.08	0	18.2	66.5	100
	L	0.26	0.16	0.05	0.13	0	0	49.4	100	100
	L	0.21	0.08	0.09	0	0	0	100	100	100
	L	0.17	0.04	0	0	0	0	100	100	-
	L	0.13	0	0	0	0	0	100	-	-
	L	0.09	0	0	0	0	0	100	-	-
	C	0.32	0.31	0.31	0.32	0.31	0.31	0.0	0.0	0
	C	0.18	0.27	0.22	0.18	0.26	0.22	0.0	3.0	0.5
	C	0.14	0.19	0.09	0.14	0.17	0.09	0.0	8.6	0
	C	0.14	0.14	0.17	0.09	0.09	0	33.6	33.1	100
	C	0.13	0	0.09	0.09	0	0	34.1	-	100
	C	0.04	0	0.04	0	0	0	100	-	100
	C	0	0	0.04	0	0	0	-	-	100

E. PATRONES DE CRISTALOGRAFÍA OBTENIDOS MEDIANTE ANÁLISIS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

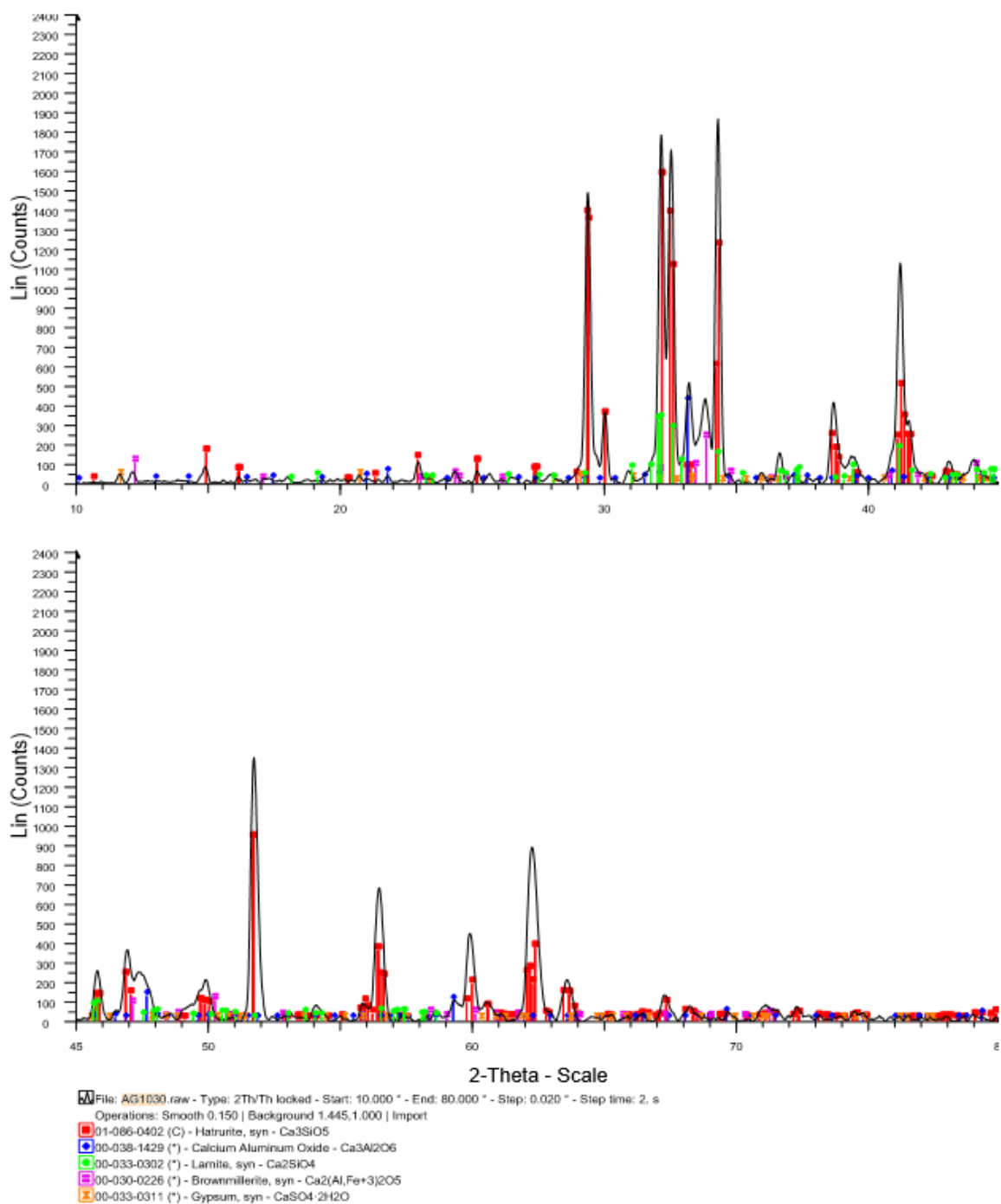
1. PATRÓN DE DIFRACCIÓN CEMENTO PORTLAND



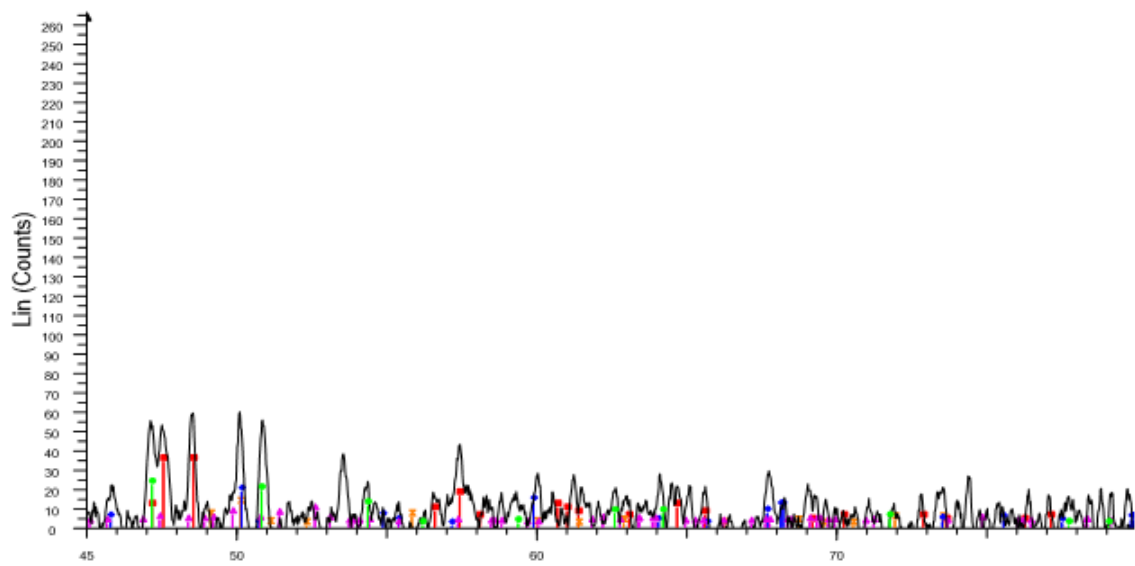
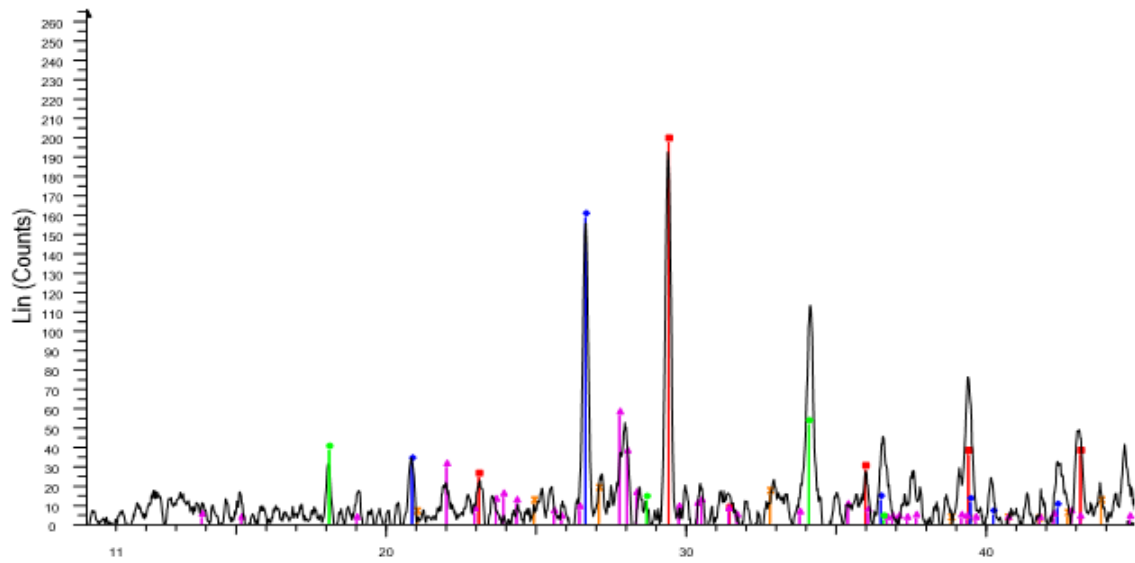
File: AG1020.raw - Type: 2Th/Th locked - Start: 10.000 ° - End: 80.000 ° - Step: 0.020 ° - Step time: 2. s
Operations: Smooth 0.150 | Background 1.445,1.000 | Import

- 01-086-0402 (C) - Heltrurite, syn - Ca_3SiO_5
- 00-038-1429 (*) - Calcium Aluminum Oxide - $\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$
- 00-033-0302 (*) - Larnite, syn - Ca_2SiO_4
- 00-030-0226 (*) - Brownmillerite, syn - $\text{Ca}_2(\text{Al,Fe+3})_2\text{O}_5$

2. PATRÓN DE DIFRACCIÓN CEMENTO PUZOLÁNICO



3. PATRÓN DE DIFRACCIÓN MATERIAL DE SELLADO EN LAS GRIETAS



File: AG1000.raw - Type: 2Th/Th locked - Start: 10.000 ° - End: 80.000 ° - Step: 0.020 ° - Step time: 3. s
 Operations: Smooth 0.150 | Background 6.310,1.000 | Import
 00-005-0586 (*) - Calcite, syn - CaCO₃
 00-033-0268 (I) - Vaterite - CaCO₃
 01-085-0457 (A) - Quartz low - alpha-SiO₂
 00-020-0548 (D) - Albite, calcian, ordered - (Na,Ca)(Si₃Al)4O₈
 00-004-0733 (I) - Portlandite, syn - Ca(OH)₂