
Ubicación e identificación de microorganismos capaces de autoreparar fisuras en mezclas de concreto

Location and identification of microorganisms with the capacity to self-healing cracks in concrete mixes

Orlando Gabriel Da Silva De Sousa ¹

Resumen:

El concreto es el material de construcción más utilizado en el mundo, pero es propenso a las grietas, exponiendo así a las bacterias que habitan en él principalmente a elementos como el agua. Se mezcla el concreto tradicional con cepas de la bacteria del género *Bacillus* que en su forma esporulada pueden habitar incluso en ambientes tan hostiles como cráteres de volcanes activos. La humedad que penetra las fisuras activa a los microorganismos que comienzan a alimentarse del lactato de calcio presentes en la mezcla, y como producto final de su digestión secretan piedra caliza, autoreparando dichas fisuras. La investigación cuenta con un diseño observacional bajo una tipología documental de campo, inicialmente se recolectaron muestras significativas de suelo, en los terrenos de la empresa Venezolana de Cementos S.A.C.A., donde se tomaron un total de ocho (8) muestras de forma aleatoria en gran parte del cerro gordo desde la cota 620 hasta la cota 790, de suelo y roca en estado natural sobre la superficie del yacimiento perteneciente a la formación geológica Carorita, las cuales, poseen un gran porcentaje de carbonato de calcio, sílice y alúmina según datos aportados por la sala de ingeniería de la empresa. Los resultados de los análisis realizados indican que las bacterias presumiblemente tienen la capacidad de adaptarse al medio, multiplicarse y potencialmente, en presencia de lactato de calcio, pudieran liberar como producto de su metabolismo, carbonato de calcio, material que serviría para auto reparar fisuras.

Palabras clave: Bacterias, concreto, autorreparación, fisuras.

Abstract:

Concrete is the most widely used construction material in the world, but it is prone to cracking, thus exposing the bacteria that inhabit it mainly to elements such as water. Traditional concrete is mixed with strains of bacteria of the *Bacillus* genus, which in their

¹ Ingeniero Civil (UCLA) / Ingeniero Mecánico (UNEXPO). Docente Universitario UCLA / UNEXPO.
Autor de correspondencia: orlandogabrieldasilva@gmail.com

sporulated form can even inhabit environments as hostile as craters of active volcanoes. The humidity that penetrates the fissures activates the microorganisms that begin to feed on the calcium lactate present in the mixture, and as a final product of their digestion they secrete limestone, self-repairing said fissures. The research has an observational design under a documentary field typology, initially significant soil samples were collected on the land of the company Venezolana de Cementos S.A.C.A. A total of eight (8) samples were taken randomly in a large part of Cerro Gordo from elevation 620 to elevation 790, of soil and rock in a natural state on the surface of the deposit belonging to the Carorita geological formation, which have a large percentage of calcium carbonate, silica and alumina according to data provided by the company's engineering room. The results of the analyzes carried out indicate that the bacteria presumably have the ability to adapt to the environment, multiply and potentially, in the presence of calcium lactate, could release calcium carbonate as a product of their metabolism, a material that would serve to self-repair fissures.

Keywords: Bacteria, concrete, self-healing, fissures.

Introducción

Entre los primeros hallazgos obtenidos por los científicos está que existen varios gases de tipo invernadero responsables del calentamiento que el sector de la construcción emite en una variedad de formas. La mayoría provienen de vehículos, fábricas, construcción, y producción de electricidad. Otra forma de contribuir con el calentamiento global o incremento de la temperatura ambiental es mediante la emisión de Dióxido de Carbono, el cual se estima que 5% de éste proviene de la producción de cemento (Chatham House, 2018). El concreto es un material aglomerante, que a medida que pasan los años de servicio presenta diversas fallas que van desde fisuras en las paredes de una edificación, hasta las que puedan comprometer la resistencia del material, afectando la integridad de la superestructura (Gutiérrez, 2021).

Estas pueden derivar desde una sencilla molestia para el usuario, al colapso parcial o total de la estructura, pudiendo resultar en heridas, lesiones e incluso la muerte de seres humanos. Actualmente, no se evidencia la importancia que tiene el empleo de biomateriales en la ingeniería civil, limitándose exclusivamente a producir grandes cantidades de concreto sin importar las consecuencias futuras sobre el medio ambiente, y por lo tanto en el ser humano. La microbiología aplicada, mediante un proceso natural que se conoce como biomineralización, utilizado para evitar el desprendimiento, la pulverización y la descamación de las fachadas de piedra calcárea ocasionados por la contaminación y la exposición natural al clima; pudiera contribuir a encontrar una posible solución.

El Carbonato de Calcio de origen bacteriano se aplica como aditivo biológico para mejorar las propiedades físico-mecánicas (tamaño del poro, resistencia y durabilidad) y conductividad térmica del concreto armado, sin causar efectos secundarios, ni coloración, formación de sales residuales o interferencia con el intercambio gaseoso del material con la atmósfera. Igualmente, la aparición de estas fisuras, en muchas ocasiones obliga a que los ingenieros exijan mayores cantidades de acero reforzado en sus cálculos, sobre diseñando la estructura, lo que incurre en un incremento en el peso de la estructura y el consecuente aumento en los costos finales de producción (Kadapure y Deshannavar, 2021).

Existe además el caso de detección tardía de la falla que por corrosión deteriora el material por una reacción química de tipo Óxido-Reducción, disminuyendo el área de la sección del acero (González, 2020), por lo tanto, crea una disminución de la capacidad portante del miembro que se está considerando, que genera consecuencias no solamente en el ámbito económico, sino también en la seguridad y bienestar del ser humano. Del mismo modo, la resistencia y durabilidad de los elementos estructurales en concreto armado que presentan fisuras ocasionadas por factores ambientales, mal curado, retracción, dosificación incorrecta, entre otros; lo que permite la entrada de humedad en éste y al llegar al acero de refuerzo se corroe, acelerando la aparición de

este tipo de daño.

Las grietas en el concreto, si bien, disminuyen proporcionalmente en la medida en que la obra sea correctamente ejecutada, difícilmente pueden ser eliminadas totalmente. Es por eso que se recurre al estudio patológico correspondiente, y este determinará la terapia más adecuada para el problema (reparación, restauración, refuerzo) o la demolición parcial o total del elemento sometido a cualquier proceso de corrosión, sin embargo estas soluciones suelen ser costosas. El agrietamiento es una de las principales causas de deterioro del hormigón, lo que permite la entrada de productos químicos y puede provocar la pérdida de las propiedades físico-mecánicas y de durabilidad de las estructuras de hormigón.

Para proteger, reparar y rehabilitar estructuras de hormigón, se ha practicado comúnmente la aplicación de diferentes agentes de recubrimiento y selladores de superficie, agentes aglutinantes, así como adhesivos (Sotomayor ,2020). Aunque tales técnicas han sido aplicables en su mayoría, debido a su diferencia de mecanismo inherente, los principales desafíos, como la delaminación y la falta de rentabilidad, han resultado en la búsqueda de métodos alternativos de sellado de grietas o autocuración. Uno de los nuevos mecanismos de autorreparación es el uso de la precipitación de calcita inducida por bacterias en mezclas de hormigón para curar las grietas del hormigón.

En esta técnica, la mineralización bacteriana (biomineralización) se realiza mediante la descomposición de la urea y el calcio para producir carbonato de calcio (CaCO_3), que puede rellenar grietas (González et al., 2018). Para revisar los mecanismos que gobiernan esta precipitación, este artículo tiene como objetivo presentar un análisis en profundidad de la biomineralización, la precipitación de CaCO_3 , las propiedades físico-mecánicas, de durabilidad y microestructurales del concreto bacteriano. Para ello, se han revisado artículos de investigación y se recopilan, proporcionan y analizan sus datos, incluidos los tipos y dosis de bacterias, las proporciones de la mezcla, así como el resultado de las pruebas mecánicas y de durabilidad.

Según esta revisión, se encuentra que la biomineralización depende principalmente de factores como el método de aplicación y la preservación constante de las bacterias vivas. Además, se encuentra que el impacto ambiental del concreto bacteriano está directamente relacionado con el contenido de urea en la mezcla de concreto. En las últimas décadas, las principales técnicas de reparación, como el uso de curación autógena de partículas de cemento sin reaccionar (especialmente en estructuras de concreto de ultra alto desempeño) y la adición de resinas poliméricas (por ejemplo, epoxi, poliéster, y viniléster), adhesivos, productos químicos impermeabilizantes y agentes aglutinantes alternativos (p. ej., materiales activados con álcali) (Ghosh, 2008).

Sin embargo, en numerosos casos, la falta de rentabilidad, las altas implicaciones ambientales, la falta de una zona de transición interfacial (ITZ) coherente y homogénea, los problemas de delaminación (especialmente para materiales basados en polímeros) y los desafíos para aplicaciones reales *in situ* (p. ej., manipulación de activador líquido para

materiales activados con álcali) han creado un dilema para elegir la técnica de reparación más adecuada. Aunque recientemente se han realizado algunos estudios de revisión sobre la producción y aplicación de hormigón bacteriano, por ejemplo, Rauf (2020) y Ehrlich (2019), la mayoría de ellos se han centrado principalmente en el efecto directo de la inclusión bacteriana en las propiedades mecánicas del hormigón.

Además, ignoraron por completo las propiedades microbiológicas y de durabilidad y la caracterización del concreto bacteriano, y simplemente informaron las propiedades mecánicas mejoradas como resultado de la incorporación de cepas bacterianas. Martirena (2019), por ejemplo, revisó el mecanismo de autocuración bioinfluenciado en el hormigón y se centró principalmente en evaluar las pruebas realizadas y descubrir lagunas en la investigación en esta área, pero no pudo proporcionar un análisis en profundidad de las propiedades del hormigón. (Gupta 2007) revisó y destacó cuatro aspectos clave que determinan la eficacia de las propiedades de autorreparación bacterianas, incluida la encapsulación, la supervivencia de las cápsulas durante el mezclado del concreto, el efecto de la adición de bioagentes en las propiedades del concreto y la capacidad de sellado.

No obstante, en este estudio de revisión no se proporcionaron la durabilidad mecánica ni las propiedades microestructurales del hormigón que contiene agentes bacterianos. La presente investigación se desarrolla en los laboratorios de microbiología del decanato de Ciencias de la Salud de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, ubicada en el centro de la ciudad de Barquisimeto, estado Lara, Venezuela. Luego de estudiar las posibles zonas en donde se presume la presencia de microorganismos capaces de producir un material similar a la calcita (material rocoso de alta resistencia), se determinó estudiar suelos pertenecientes a tres lugares claves como lo son: las minas de material rocoso para la fabricación de cemento ubicada al norte de la ciudad de Barquisimeto, en la intercomunal Barquisimeto-Duaca, terrenos pertenecientes a la empresa venezolana de cementos SACA.

Se seleccionó una calera de cal ubicada en la población de Yaritagua, estado Yaracuy, perteneciente a Maxical C.A., así como las arenas usadas para trabajos de albañilería que se extraen en la cuenca del Río Turbio, en la intercomunal Barquisimeto-Acarigua las cuales son comercializadas por la arenera Río Turbio CA. En ese sentido, el presente artículo tiene el propósito de determinar la presencia de microorganismos autorreparadores en el concreto. Este estudio de investigación primero proporciona un análisis en profundidad del fondo microbiológico del concreto bacteriano, para luego enfocarse en los tipos y la cantidad de cada variable de la mezcla, su proporción y los respectivos resultados sobre las propiedades físico-mecánicas y de durabilidad. Al hacerlo, se evaluaron estudios de investigación y se recopilaron y proporcionaron sus datos de diseño de mezcla, así como los resultados de las pruebas.

Metodología

La investigación cuenta con un diseño observacional bajo una tipología documental de campo, donde inicialmente se recolectaron muestras significativas de suelo en cada uno de los lugares escogidos, en el caso de los terrenos de la empresa Venezolana de Cementos SACA. se tomaron un total de ocho (8) muestras de forma aleatoria y en gran parte de la extensión del cerro gordo desde la cota 620 hasta la cota 790, de suelo y roca en estado natural sobre la superficie del yacimiento perteneciente a la formación geológica Carorita. Estas muestras poseen un gran porcentaje de carbonato de calcio, sílice y alúmina según datos aportados por la sala de ingeniería de la empresa. En el caso de la calera de cal se tomó una (1) muestra representativa de la extracción en el yacimiento, esta presenta una gran pureza en carbonato de calcio. Por último, se tomó una (1) muestra de las arenas extraídas en la cuenca del río Turbio para su análisis.

Figura 1

Toma de muestra en venezolana de cementos S.A.C.A.



Fuente: Fotografía tomada por el autor (2022).

Las muestras recolectadas para ser estudiadas microbiológicamente se recogieron en frascos de vidrio de fácil esterilización, boca ancha y de capacidad de 400gr, cuidadosamente lavados y aclarados, debidamente tapados y rotulados según el sector donde se tomó. Los frascos utilizados para la toma de muestras se mantuvieron con las tapas cerradas y se retiró hasta el momento de tomar las muestras para evitar contaminación en la misma. Al momento de encontrar el sitio apropiado para la toma de la muestra con la ayuda de una piqueta se desprendió granos de la superficie, se abrió el frasco y tomó la muestra, en este caso perturbada uno, de aproximadamente 350gr

con una espátula dejando un espacio de aire libre dentro de la botella de 2,5cm para facilitar la mezcla por agitación antes de proceder al estudio, luego se selló herméticamente para mantener la humedad presente en el suelo. Por último fueron rotuladas para su identificación según el sector donde se recolecto, cota y número de muestra.

Las muestras fueron almacenadas y transportadas a temperatura ambiente, evitando su exposición directa a la luz solar. Para este tipo de muestra no es necesario su análisis y estudio en el laboratorio de forma inmediata, se puede almacenar un tiempo sin que está presente distorsiones o cambios para el momento de su estudio. El análisis Microbiológico permitirá conocer a partir de las muestras tomadas en la cementera, la calera y la arenera; observar y analizar la presencia o ausencia de microorganismos (para nuestro caso bacterias), para luego aislarlas con el uso de cultivos en agares nutritivos o caldos enriquecidos, para posteriormente aplicar pruebas microbiológicas para describirlas macroscópicamente, microscópicamente y determinar su capacidad de auto reparar fisuras.

Preparación de las bases para medio de cultivo.

Medio Sólido: Para el pre-enriquecimiento se utilizó como primer paso para verificar la presencia o no microorganismos en las muestras tomadas, medios de Agar Sangre, por ser un medio rico en nutrientes, siendo adecuado para el cultivo de los diversos microorganismos exigentes. A continuación, se muestra los materiales y procedimiento empleados para su preparación:

Agar Sangre (*Bacto Blood Agar Base*): Es un medio de infusión al cual se le añade sangre para aislar y cultivar organismos fastidiosos. El pH, ligeramente ácido, de la base favorece reacciones hemolíticas precisas.

Materiales: Mechero, recipiente, autoclave, varilla mezclada, placa Petri o tubo de ensayo.

Procedimiento:

Se Suspende 40gr de Bacto Agar en 1 litro de agua destilada o desionizada y se calienta hasta la ebullición para que se disuelva completamente.

Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 15 lb de presión (121°C), se enfrió a 45-50°C.

Luego se añadió asépticamente un 5% de sangre estéril, desfibrada, a temperatura ambiente y se mezcló homogéneamente.

Se dispensó en placas Petri o Tubos.

Por último, se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Figura 2
Muestra 1 en Agar Sangre



Fuente: Fotografía tomada por el autor (2022).

Caldo de cultivo de Pre-enriquecimiento.

Caldo Soya Tripticasa: Como era objeto de interés estudiar en que medio se desarrollaban mejor las bacterias presentes en las muestras, se realizó un pre-enriquecimiento en algunas de las muestras que resultaron de interés con caldo soya Tricticasa, por ser un medio con muchos nutrientes, siendo adecuado para el cultivo de los diversos microorganismos. A continuación se muestran los materiales y procedimientos empleados para su preparación:

Materiales: Mechero, recipiente, autoclave, varilla mezclada, tubo de ensayo.

Figura 3.

Agar+ Tierra Muestras (imagen izquierda) y Caldo Soya Tricticasa (imagen derecha)



Fuente: Fotografía tomada por el autor (2022).

Procedimiento:

Se disolvió la cantidad apropiada de medio deshidratado en 1 litro de agua destilada o desionizada, calentando ligeramente para disolver por completo.

Se dispensó en tubos de ensayo.

Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 15lb de presión/pul² y (121°C), se enfrió a 45-50°C.

Cultivo primario no selectivo de las bacterias presentes en las muestras.

Las nueve (9) muestras tomadas identificadas anteriormente, las prepararon para ser sembradas en los medios de cultivos enriquecidos, en este caso, no selectivo para observar la presencia de los diversos microorganismos presentes en la esta, utilizando en método de siembra en superficie.

Método de siembra en superficie.

Materiales: Aplicador de madera, agar sangre, placa de muestra, asa bacteriológica, microscopio.

Procedimiento:

Este método se caracteriza porque durante la incubación las colonias crecen en la superficie del agar. Para comenzar el proceso de aislamiento de las bacterias que se presume están contenidas dentro de las muestras tomadas en los envases sellados herméticamente, se procedió a mezclar de forma individual, independiente y alrededor de toda la muestra con el uso de un aplicador de madera, luego se punzó en distintos puntos de la misma para tomar una muestra representativa de cada envase.

Seguidamente, se procedió a sembrar directamente la muestra tomada por estriado y agotamiento en agar sangre por ser un medio sólido con muchos nutrientes favorables para el desarrollo de las bacterias, se incubaron por un periodo de 24 horas en una incubadora a 37 °C de temperatura o hasta observar la presencia de colonias bacterianas, esto se hace con el objetivo de encontrar colonias de bacterias viables, aquella que es capaz de dividirse para dar lugar a la descendencia, y por tanto capaz de generar colonias en la superficie del medio de cultivo, posterior al tiempo de cultivo con ayuda de la asa bacteriológica se tomó una pequeña muestra de cada una de las colonias de bacterias que fueron visibles a simple vista en el medio de agar sangre. El procedimiento se describe en forma general:

- Se utilizaron placas previamente preparadas y mantenidas a 37°C, que contienen el medio de cultivo solidificado (unos 20 ml/placa).
- Se depositó en la superficie del agar 0,1 ml de la muestra o de cada dilución.
- Seguidamente, se procedió a extender dicha muestra sobre toda la superficie de las placas, usando un asa bacteriológica estéril.

- Se esperó 2 o 3 minutos a que se secase el inóculo.
- Se invirtieron las placas y se llevaron a incubar a 35 +/- 2°C durante 24 horas.

Cultivo selectivo de las bacterias presentes en las muestras

Una vez que observaron que las colonias han crecido por incubación, era necesario su confirmación y aislamiento selectivo, esto se realiza con técnicas de transferencias, para estudiar una especie o forma de interés para el estudio en específico. En las muestras provenientes de los medios líquidos de caldo soya tripticasa, el inóculo se tomó agitando suavemente el asa dentro del mismo, quedando la muestra adherida por tensión superficial en el extremo del filamento del asa de siembra. Si el medio era sólido (caso agar sangre) y se encontraba en la superficie de la muestra a sembrar (placa Petri), se tomó una pequeña porción de cultivo mediante un ligero roce con el asa de siembra.

Si la muestra se encuentra en la profundidad del agar (tubo con agar en pico de flauta), se hunde el filamento dentro del medio hasta tomar una pequeña porción de la misma. Por último, se flamea la boca del tubo antes de taparlo y se coloca en el soporte necesario.

Procedimiento de Transferencia

Para medio líquido:

- Se tomaron los dos tubos, el que contiene el medio de cultivo sin sembrar y el que contiene los microorganismos a transferir, se toman con una mano, con las bocas colocadas a la misma altura.
- Se sostienen con los dedos índice, medio y anular apoyándolos en el dedo meñique, y se los sujeta con el dedo pulgar muy cerca de la base para permitir la visualización de toda la superficie del cultivo.
- Con el dedo pulgar e índice (como un lápiz) de la otra mano, se toma la pipeta estéril, la aguja o asa (lupa) y se esteriliza en el mechero.
- Se destaparon los tubos con los dedos libres de la mano que sujeta el asa, de la siguiente manera: el tapón del tubo más alejado del operador (que es el que contiene la muestra) entre el dedo meñique y la palma de la mano; el tapón del tubo más cercano al operador (que contiene el medio de cultivo estéril) entre el meñique y el anular.
- Se flamearon las bocas de los tubos, se tomó el inóculo; se sembró; se flamearon nuevamente las bocas de los mismos y se taparon respetando las procedencias de los tapones y se quemó el asa.

En el caso que el inóculo proceda de un medio líquido, antes de realizar la transferencia se debió agitar el tubo para poner en suspensión a los microorganismos que pudieran estar depositados. Si la siembra se realizó en medio líquido, se agitó el tubo sembrado para distribuir homogéneamente el inóculo. Para realizar la agitación se

tomó el tubo cerca del extremo superior con los dedos índice y pulgar y se golpeó suavemente la base del mismo sobre el dedo índice de la otra mano con una amplitud de 5cm. Otra forma consistió en hacer rotar los tubos entre las palmas de las manos.

Para medio sólido:

Cuando el medio de cultivo a sembrar era sólido, según fuera el caso, se sembró en superficie, en profundidad o en profundidad y superficie.

En superficie:

Por estría: se introdujo el asa en anillo o aguja en el tubo de agar inclinado hasta el fondo diluyendo el inóculo en el agua de condensación que se acumula en esa parte, luego se movió el asa suavemente sobre la superficie del agar con un movimiento en zigzag ascendiendo desde el fondo hasta la parte superior del medio.

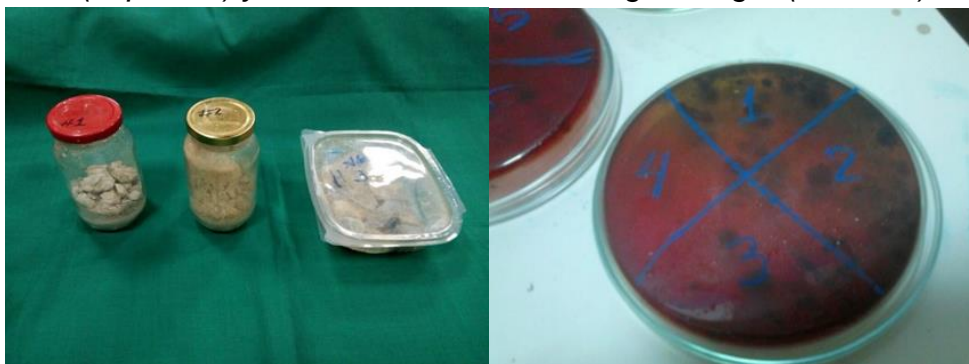
Por trazo: se introdujo el asa en anillo o aguja en el tubo de agar inclinado y se trazó una línea de siembra desde la base del pico de flauta hasta el extremo superior, sin ejercer presión para que no se rompa el medio.

Técnica de transferencia en placa Petri en superficie:

Por estría central: Se levantó la tapa lo suficiente como para permitir la introducción del asa con la carga de microorganismos, iniciándose la estría en el borde del medio más alejado del operador y se la extiende hasta llegar al centro de la placa, luego se gira ésta 180° y se continúa realizando otra estría de la misma manera. Esta división evita el obstáculo del borde de la placa.

Figura 4

Muestras (Izquierda) y Siembra de bacteria en agar sangre (Derecha)



Fuente: Fotografía tomada por el autor (2022).

Por estría en cuadrantes: Se dividió la placa en cuatro sectores y se sembró en estría cada uno de ellos, partiendo del borde de la placa hacia el centro. El cuadrante sembrado debió ser el más alejado del operador y el inóculo en cada caso puede ser el mismo (la

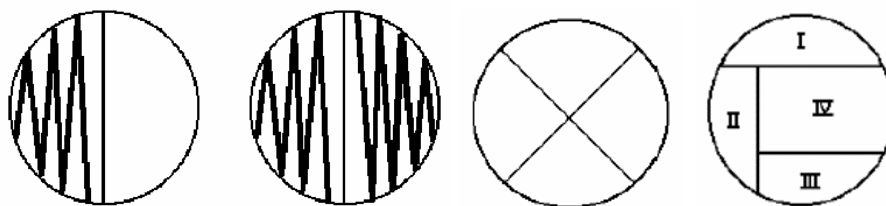
misma especie) o distinto (diferente especie) para cada cuadrante.

Aislamiento de cepa por agotamiento en superficie en una placa

- El objeto es obtener cultivos en estado puro, operación imprescindible y previa al estudio e identificación de una especie bacteriana.
- Se pueden realizar aislamientos por métodos generales y por métodos especiales.
- Se preparó una placa Petri con el medio de cultivo a la que se le elimina el exceso de humedad, dejando la placa invertida 24h a temperatura ambiente.
- Se marcó la parte exterior de la contratapa de acuerdo al esquema. Se cargó con el asa la muestra, y se depositó el inóculo en un punto de la superficie del sector (I) cercano al borde, y se extendió en el mismo con estrías próximas y paralelas. Seguidamente se quemó el asa y se dejó enfriar.
- Se giró la placa 90 °, se pasó el asa una vez sobre la última estría de la región ya inoculada y se arrastró al sector (II) efectuando sobre él la siembra sin superponer las estrías con las realizadas antes.
- Se quemó nuevamente el asa y de la misma manera se estrío el sector (III). Luego de quemar el asa, en el sector (IV) se realizaron estrías con el material que se arrastró de (III), más amplias y que terminan en el centro de la placa.

Figura 5

Transferencia por estría central (Izquierda), Transferencia por estría en cuadrantes (Centro) y Cuadrantes de aislamiento por agotamiento (Derecha)



Fuente: Elaboración propia de los autores (2022).

Caracterización de las bacterias.

Descripción Macroscópica: Se describieron todas características físicas de las colonias observables a simple vista sin el uso de un microscopio; estas son: la morfología

de la colonia, forma, tamaño, elevación, color, borde, apariencia, aspecto y acompañada de registros fotográficos.

Descripción Microscópica: Para esta descripción mediante el uso del microscopio, se aplicó la coloración de Gram para determinar tipo de pared y la morfología de las células bacterianas, así como el tipo de disposición de las bacterias, mediante observación microscópica con el objetivo de 100X con aceite de inmersión.

Características y pruebas bioquímicas

Tinción de Gram

Se utilizó tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacterias Gram positivas a las que se visualizan de color violeta, y bacterias Gram negativas a las que se visualizan de color rosa, rojo o grosella. Se comprobó la pureza de la colonia aislada realizando una tinción o coloración de Gram. Para ello se pica la colonia y se la identifica con una marca en el fondo de la placa con un número identificador. Se hizo un extendido en una lámina porta objeto con parte de la colonia y si todas las células observadas coincidían morfológicamente, se repicaba el resto de la colonia en una capsula con agar en estría para obtener un cultivo puro.

A veces la igualdad morfológica en la coloración de Gram puede ser engañosa por existir bacterias de diferentes especies (pero iguales morfológicamente) presentes dentro de la colonia seleccionada, pero en muy bajo número debido a su imposibilidad de desarrollar.

Materiales: Microscopio, Mechero, Aguja bacteriológica, Lámina de vidrio porta objeto, Violeta de genciana, Lugol, Alcohol acetona, Safranina.

Procedimiento:

- Se esterilizo el asa bacteriológica, la cual será utilizada para recoger las bacterias, empleando el mechero.
- Se recogió una muestra del cultivo y se colocó sobre la lámina de vidrio porta objeto.
- Se fijó la muestra por calor pasándola rápidamente por el mechero cortando la llama de arriba abajo tres (3) veces.
- Se aplicó el colorante primario, Violeta de Genciana, sobre la muestra y se esperó 1 minuto.
- Se enjuagó con agua de chorro.
- Se colocó lugol que actúa como mordiente y se esperó 1 minuto.
- Se hizo la decoloración con el uso de alcohol acetona, agregando hasta dejar de emitir color violeta.
- Se enjuago con agua nuevamente.

- Por último, se agregó a safranina, colorante de contraste y se esperó a 1 minuto.
- Se lavó con agua y se dejó secar
- Se observó en el microscopio a 100X con aceite de inmersión para determinar morfológicamente si son Gram positivas o Gram negativas, además de buscar la presencia o no de esporas.

Figura 6

Toma inóculo para coloración de Gram



Fuente: Elaboración propia de los autores (2022).

Posición de la Espora

Luego de realizada la coloración de Gram, con el uso de un microscopio se pudo observar que la posición de la espora es central.

Oxidasa

Es una prueba para determinar si las bacterias producen las citocromos c oxidasa, se utilizó a papel de filtro impregnado con el reactivo n-tetrametil -p- fenilendiamina, el reactivo pasó a un color purpura al ser oxidado y transparente al ser reducido.

Procedimiento:

Al papel de filtro impregnado con el reactivo n-tetrametil -p- fenilendiamina, se le transfirió una porción del crecimiento bacteriano y se observó a el filtro de papel por unos minutos, si presenta color purpura el resultado es positivo y si no presenta color la prueba es negativa.

Catalasa

La catalasa es una enzima que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias facultativas que contienen citocromo c (a excepción del género *Streptococcus*). Dicha enzima descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua, las bacterias

que carecen del sistema citocromo no producen catalasa por lo cual no descomponen el peróxido de hidrógeno siendo tóxico para la bacteria, tal es el caso de ciertos organismos anaerobios (*Clostridium*). La producción de catalasa se usa para diferenciar cocos Gram positivos de los géneros *Streptococcus* (catalasa negativa) del *Staphylococcus* (catalasa positiva).

Procedimiento:

Se incubo un tubo con caldo tripticasa con una o varias asadas de un crecimiento bacteriano, se incubo por 24 horas a 37°C. Finalizada la incubación, se agregó a cada tubo cinco gotas de solución de agua oxigenada (peróxido de hidrógeno). La reacción positiva se manifiesta por el desprendimiento de burbujas de gas (oxígeno desprendido del H₂O₂.) En lugar del caldo puede e usarse también agar nutritivo.

Fermentación de la glucosa (Interpretación del Kligler)

Es el medio diferencial en tubo más útil en el estudio de bacilos GRAM negativos intestinales (enterobacterias) permitiendo su diferenciación, sobre la base de la habilidad de fermentar la glucosa o lactosa y la capacidad para producir hidrógeno sulfurado (H₂S) y gas. Este medio contiene en su preparación: rojo fenol como indicador de la producción de ácido y sulfato ferroso para detectar la producción de hidrógeno sulfurado.

Procedimiento:

Un cambio amarillo en el fondo (taco) del tubo indica fermentación de la glucosa y si se observa en el bisel, revela fermentación de la lactosa. La producción de gas en la fermentación se observa por presencia de burbujas entre el medio y la pared del tubo, la producción de H₂S se demuestra con un ennegrecimiento del medio.

Movilidad

Para detectar la presencia o ausencia de flagelos, se usó un medio semisólido (contiene agar en una proporción de 0,3 %). Se siembra por punción única con la aguja, sin tocar el fondo. La movilidad se manifiesta macroscópicamente, por una zona difusa de crecimiento diseminada a lo largo de la línea de inoculación.

Utilización del Citrato

Esta prueba sirve para determinar si una bacteria es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para sus procesos metabólicos. Para ello se utiliza el citrato de

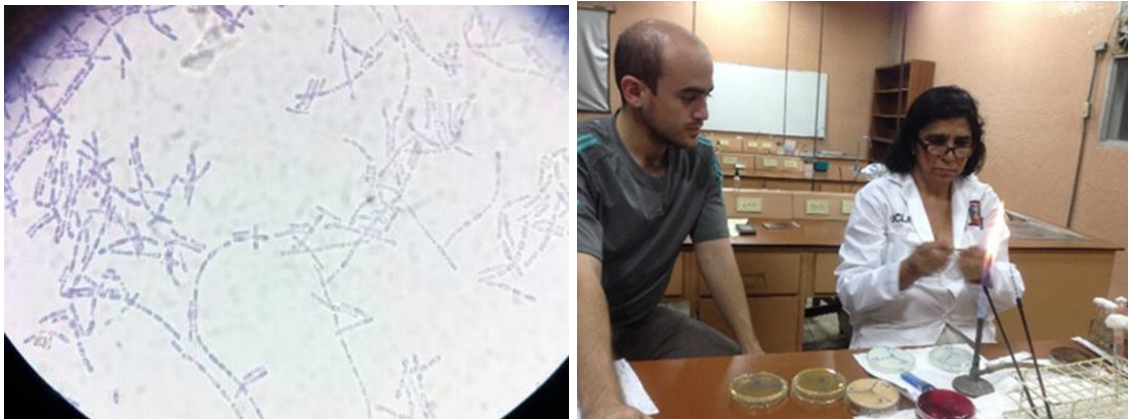
Simmons, medio que contiene citrato de sodio como única fuente de carbono, Las bacterias que utilizan el citrato, lo pueden desdoblar mediante una enzima, citratasa o citrato desmolasa; dichas bacterias capaces de desdoblar el citrato también pueden utilizar las sales de amonio presentes en el medio como fuente única de nitrógeno, produciendo alcalinidad, lo cual es evidencia por el cambio de color del indicador de azul de bromotimol (verde en neutro, azul en alcalino).

Procedimiento:

Se sembró un tubo con agar citrato de Simmons, (verde) usando un inóculo ligero. Se Incubo a 37°C por 24 horas. Si la bacteria metaboliza el citrato alcaliniza al medio: (color azul, citrato positivo), mientras aquellas que ni lo metabolizan no crecen en el medio el cual permanece con su color original, verde (citrato negativo).

Figura 7.

Vista microscópica de la forma esporulada de la bacteria (Izquierda). Extendido muestra para observación (Derecha).



Fuente: Fotografía tomada por el autor (2022).

Criterios para la dosificación de la solución adicionada con bacterias a ser colocada en las fisuras del concreto.

Se proponen dos formas de dosificación de las bacterias en la mezcla de concreto y sus respectivos criterios de ejecución, las cuales son:

1.-Preparación de una solución gelatinosa adicionada con bacterias:

Se realiza el cultivo de la bacteria y se coloca en un medio semilíquido con contextura gelatinosa, cuya finalidad es ser colocada en la superficie de las fisuras del concreto, de manera que esta se mantenga por un tiempo y las bacterias puedan realizar su trabajo. Se debe elegir un medio que sea apto, de acuerdo a las necesidades y disponibilidad, que permita el adecuado desarrollo de los microorganismos. Debe ser un medio libre de

contaminantes y se debe tener cuidado a la hora de la realización del cultivo de no contaminar la muestra.

Para realizar una solución adicionada con bacterias se puede seguir el siguiente procedimiento: Se agrega aproximadamente 12,5g de caldo nutritivo a un frasco de 500ml que contiene agua destilada. Luego se cubre con un tapón de algodón grueso y se hace hermético con papel y goma. Luego se esteriliza con una olla durante aproximadamente 10-20 minutos. Ahora la solución está libre de contaminantes y la solución es de color naranja claro antes de la adición de la bacteria. Posteriormente se abren los matraces y se agrega exactamente 1 ml de la bacteria al matraz esterilizado y se mantiene en un agitador a una velocidad de 150-200 rpm durante la noche. Después de 24 horas, se encontró la solución bacteriana. Para la realización del caldo nutritivo debe procurar recrear las condiciones naturales que suceden sobre el concreto, en donde sus condiciones sean lo más similares que se pueda, al igual que las soluciones con pH y demás factores.

2.-Introducción de capsulas en la mezcla de concreto adicionadas con microorganismos:

Uno de los problemas principales de las fisuras es que no se sabe cuándo y dónde aparecerán, a diferencia del modelo anterior, en este modelo no se necesita revisar constantemente.

Figura 8

Preparado y siembra de inóculos en probetas



Fuente: Fotografía tomada por el autor (2022).

Seguidamente, en se procede a la búsqueda de capsulas de acetato las cuales suelen conseguirse vacías, y se utilizarán para almacenar la bacteria, la cual estará encapsulada

con el alimento hasta que esta se rompa por acción de la humedad del ambiente al penetrar por la fisura, esta humedad hace que se active la bacteria y pase de su forma esporulada a su forma vegetativa para que luego empiece el proceso de reparación de la fisura. El alimento de las bacterias depende de que especie de *Bacillus* sea, por lo que previamente se debe realizar un estudio de identificación de la especie *Bacillus*.

Resultados

Al realizar la primera siembra en el medio sólido agar sangre por el método estría en cuadrantes en placas de Petri, estas divididas en cuatro cuadrantes, proveniente de inóculos tomados con la ayuda de un aplicador de madera directamente de las nueve (9) muestras tomadas. Posterior a la incubación se observaron diversidad de colonias presentes en estas. Seguidamente, se tomó muestra de cada colonia para elaborar extendidos, fijar y aplicar la coloración de Gram para determinar la morfología de los microorganismos presentes. Se observaron microscópicamente la presencia de diversas formas bacterianas, de tipo Gram positivo y Gram negativo, muchas de estas, presumiblemente por defecaciones de animales y otras bacterias ambientales.

Por otro lado, solo en las muestras 1, 2 y 9 se observó el crecimiento de colonias similares a las del género *Bacillus* por sus características macroscópicas y microscópicas (con presencia de esporas), igualmente se observaron formas esporuladas de estas, las cuales son de gran interés para nuestro estudio, debido a que las esporas de las bacterias entran en contacto directamente con el agua y los nutrientes lo cual provoca que se active la bacteria que comienza a alimentarse de lactato de calcio convirtiéndose en caliza que se solidifica en la superficie de la fisura sellándola. (Fayerwayer, 2015) Las esporas de *Bacillus cohnii* son capaces de permanecer vivas en el hormigón hasta doscientos años y, en teoría, pueden prolongar la vida útil de la estructura durante el mismo periodo.

Esto es casi cuatro (4) veces más que los 50-70 años de vida útil del hormigón convencional. Una vez encontrada y aislada la bacteria *Bacillus* en su forma esporulada como se observa en la figura 7, era necesario ver su comportamiento y aporte de las mismas en la reparación de fisuras. Para ello tomaron tres probetas estándar de 150 x 300 mm de concreto con resistencia $f'c$ 250 kg/cm²; a estas se les hicieron de forma mecánica-manual con la ayuda de una segueta dos surcos en su superficie semejante a una fisura de 2 mm de anchura por 6 cm de largo. Se hicieron los ensayos en estado seco en dos de ellas y una en estado húmedo-saturado, donde se aplicó un mililitro (1 ml) de las bacterias cultivadas en caldo soya triticosa de la muestra 2 y 3.

En una de las fisuras con solo la solución Ringer Lactato y otra con agar adicionado con ringer lactato; las secas se dejaron en incubadora a 37 °C y se observaron microscópicamente en 24 y 48 horas. Durante ese tiempo se humedecía con ringer lactato; la húmeda saturada en agua, se dejó sumergida 24h y al día siguiente se le aplicó

la espora humedeciendo la fisura con ringer de la muestra 1 y con agar muestra 2, se dejó a temperatura ambiente. Para las observaciones, se sacaron las probetas de la incubadora, se inoculó en solución fisiológica con un aplicador estéril solo para humedecer frotando la superficie en dos direcciones a la izquierda y la derecha, para luego sembrarlo en un caldo de soya triticosa, con otro hisopo se froto alrededor del surco.

Se hizo un frotis con las muestra para hacerle un extendido y aplicarles la tinción de Gram, esto se hizo con la intención de poder observar la existencia de bacterias viables y resistentes a ese ambiente; satisfactoriamente se determinó que si son viables por que crecieron en el caldo nutritivo soya. Posteriormente se sembraron nuevamente en medios de cultivos disponibles para ver si se reproducían, al observar las muestra a las 24 horas se visualizó crecimiento de las colonias en los cultivos. Se recomienda enfocarse en los porcentajes más altos y a partir de estos buscar una concentración optima de bacterias para llegar a la más alta resistencia alcanzada a partir de la inclusión de bacterias *Bacillus*.

Para encapsulación, las investigaciones futuras deben enfocarse en métodos para evaluar la supervivencia de las esporas después de la incorporación a materiales cementosos, y optimizar la cantidad y el tamaño de las cápsulas para lograr la autocuración deseada sin una significativa reducción de la resistencia física (Fahimizadeh et al., 2020).

Discusión

La capacidad de autocuración del hormigón se ha mejorado mediante la incorporación de bacterias, (Erlich 1996) pudiendo inducir la precipitación de carbonato de calcio a través de su actividad metabólica. Acumulándose en los precipitados, formando un sello eficaz contra la entrada de agua relacionada con las grietas. Henk M. Jonkers y Erik Schlangen presentaron su investigación en la Primera Conferencia Internacional sobre Materiales de Autocuración celebrada en abril de 2007 en los Países Bajos, utilizando con éxito las bacterias formadoras de esporas alcalifílicas como un agente de autocuración en hormigón. Siendo los primeros en incorporar bacterias dentro de la pasta de cemento para el desarrollo de hormigón autocurativo. concluyendo que las bacterias agregadas directamente a la pasta solo permanecieron viables durante 4 meses.

Estudios posteriores vieron como Jonkers (2011) usaba partículas de arcilla expandida y Van Tittelboom (2011) usaba tubos de vidrio, para proteger las bacterias dentro del concreto. Desde entonces, creándose otras estrategias para proteger las bacterias (Wang et al. 2012).

Haciéndose mención a las aplicaciones de autorreparación basadas en microcápsulas extendidas a materiales de recubrimiento de base biológica, el proceso fue exitoso. Asi como, los recubrimientos basados en aceite de neem, con otro carácter de base

biológica, debido a que utiliza aceite vegetal como material central (Chaudhari et al. 2013).

Los materiales incorporados con bacterias son capaces de sellar grietas mediante la producción de cristales de CaCO_3 , que pueden bloquear las micro fisuras y los microporos del hormigón (Samani y Berenjian, 2016). El CaCO_3 puede precipitarse mediante un proceso de mineralización inducido biológicamente en presencia de una fuente de calcio.

En este proceso, los microorganismos producen carbonato extracelularmente a través de varias vías metabólicas, incluida la metanogénesis no metilo trófica, la fotosíntesis oxigénica y anoxigénica, la utilización de ácidos orgánicos. El proceso de curación de grietas del concreto bacteriano depende de la disponibilidad de nutrición y supervivencia de las bacterias (Paravano et al, 2019).

El uso de selladores microbianos a través de la precipitación mineral dentro del concreto es una técnica prometedora para disminuir los poros internos y también actúa como un tratamiento de protección superficial alternativo (o técnica de recubrimiento) que se puede aplicar a la superficie del concreto (Sotomayor, 2020). Los tratamientos de grietas dentro del concreto generalmente se llevan a cabo en forma de tratamientos activos y pasivos.

El hormigón bacteriano, que se refiere al uso de bacterias como suplemento curativo o material de sustitución parcial del agente aglutinante (por ejemplo, cemento Portland), es un método novedoso con usos potenciales en ciertas secciones estructurales (Galán y García, 2011). No obstante, a pesar de sus importantes beneficios, este material tiene un costo de producción variable e implicaciones ambientales (Samani y Berenjian, 2016).

Conclusiones

Mediante análisis microbiológicos se logró detectar la presencia de bacterias en las muestras de suelo recogidas de la mina de calcita perteneciente a la empresa Venezolana de Cementos SACA. y en la muestra obtenida de la Calera. Determinando que las bacterias aisladas de las muestras de suelo son bacilos, Gram positivos, capaces de producir esporas, pertenecientes a género *Bacillus*, tal como en los antecedentes que inspiraron este trabajo. Pendiente la identificación de especie, al obtener los recursos necesarios. La elaboración de medios de cultivo permite el crecimiento de las bacterias del género *Bacillus*, diferente al medio de agar sangre, el cual se usa normalmente para el aislamiento de especies de interés médico.

Los resultados de los análisis realizados a partir de muestras de suelo indican que las bacterias presumiblemente tienen la capacidad de adaptarse al medio, multiplicarse potencialmente, en presencia de lactato de calcio, pudieran liberar como producto de su metabolismo, carbonato de calcio, material que serviría para auto reparar fisuras. Esto se debe principalmente a que estas bacterias del género *Bacillus* se encuentran en su

forma esporulada en minas de calcita, de donde se extrae la materia prima para la elaboración del cemento y de la cal. A nivel de pregrado no será posible lograr todos los objetivos planteados, por limitaciones de tiempo y carencia de recursos indispensables para conocer con certeza el material que producen las bacterias halladas; lo que permitiría conocer si tienen la capacidad o no de auto reparar fisuras, a través de pruebas de ensayo y error reiterativas, hasta obtener un resultado aceptable.

Durante la investigación se planteó dos modelos de dosificación de las bacterias para su adicción a las mezclas de concreto en capsulas disolubles de acetato o en obras existentes empleando una solución gelatinosa; por lo que se sientan las bases y criterios para continuar con la investigación. Hasta donde conocemos, este documento es el primer reporte sobre bacterias y su aporte a la auto reparación de fisuras en Venezuela y corresponde a un aporte básico para los programas de investigación tanto regional como nacional.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Isabel Álvarez por haber facilitado tanto sus conocimientos como los equipos e instrumentos necesarios para la realización de las labores de laboratorio. Al Ing. Juan Espinoza (QEPD) por su interés en la investigación, y su ayuda en el ensayo de las probetas de concreto realizadas en el estudio.

Referencias

- Gutiérrez L (2021). *La importancia de contar con prefabricados de cemento a la hora de construir*. Metroblock Fábrica de bloques metropolitana <https://n9.cl/qo7od>
- Kadapure, S. A., & Deshannavar, U. B. (2021). *Bio-smart material in self-healing of concrete*. Mater. Today: Proc. Vol. 49, Part 5, 1498-1503. Doi: 10.1016/j.matpr.2021.07.245
- Fahimizadeh, M., Diane Abeyratne, A., Mae, L. S., Singh, R. K. R., & Pasbakhsh, P. (2020). *Biological Self-Healing of Cement Paste and Mortar by Non-Ureolytic Bacteria Encapsulated in Alginate Hydrogel Capsules*. *Materials*, 13(17), 3711. <https://doi.org/10.3390/ma13173711>
- González Taday, C. (2020). *El estudio y resolución de ecuaciones químicas por el método de óxido-reducción en la enseñanza de la química en la Unidad Educativa María Angélica Carrillo de Mata Martínez, año 2019 -2020*. Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Licenciado en Ciencias de la Educación. Mención Ciencias Naturales y del Ambiente, Biología y Química. Carrera de Ciencias Naturales y del Ambiente, Biología y Química. Quito: UCE. 112 p.
- Rauf, M. (2020). *Comparative performance of different bacteria immobilized in natural fibers for self-healing in concrete Construct*. Build. Mater.

- Sotomayor C., (2020), *Entendiendo a las fisuras y grietas en las estructuras de concreto*. Artículo técnico N°6, Perú.
- Ehrlich, H. (2019). *Geomicrobiology: its significance for geology*. Earth Sci. Rev.
- Gupta, S (2019). *Autonomous healing in concrete by bio-based healing agents – a review* Construct. Build. Mater.
- Martirena, F. (2019). *Microorganism-based bioplasticizer for cementitious materials* Biopolym. Biotech Admixtures Eco-Efficient Constr. Mater.
- Paravano, A, González, D, Ocampo, F, Guillarducci, A, Grether, R. (2019) *Incorporación de masa biológica a pasta de cemento*. Jornada de jóvenes investigadores en tecnología del cemento y del hormigón.
- González, A., Parraguez-Macaya, A. C., Corvalan, L., Corréa, N., & Stuckrath, C., (2018). *Hormigón autorreparable con bacterias para la infraestructura vial*. Investigación de posgrado. 13° congreso Internacional PROVIAL. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/328135440>
Titulo_HORMIGON_AUTORREPARABLE_CON_BACTERIAS_PARA_LA_INFRAESTRUCTURA_VIAL_Autores
- Samani, A.K., Berenjian, A. *Bioconcrete: next generation of self-healing concrete*. Appl.Microbiol. Biotechnol. (2016). 100,2591-2602.
- Galán García, I. (2011). *Carbonatación del hormigón: combinación de CO2 con las fases hidratadas del cemento y frente de cambio de pH*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Químicas.
- Jonkers H (2011). *Bacteria-based self-healing concrete* (PDF). HERON. 56 (1/2).
- Chaudhari, A. B., Tatiya, P. D., Hedao, R. K., Kulkarni, R. D., & Gite, V. V. (2013). *Polyurethane prepared from neem oil polyesteramides for self-healing anticorrosive coatings*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 52(30), 10189–97.
- 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. 26 (1): 532–40. doi:10.1016/j.conbuildmat.2011.06.054.
- Van Tittelboom K, De Belie N, Van Loo D, Jacobs P (2011). *Self-healing efficiency of cementitious materials containing tubular capsules filled with healing agent*. Cement and Concrete Composites. 33 (4): 497–505. doi:10.1016/j.cemconcomp.2011.01.004.
- Jonkers HM, Schlangen E (2007). AJM Schmetz, van der Zwaag (eds.). *Crack repair by concrete immobilized bacteria*. Proceedings of the First International Conference on Self Healing Materials. Springer: 1–7. ISBN 9781402062490.
- Jonkers H (2007). *Self healing concrete: a biological approach*. In van der Zwaag S (ed.). Self Healing Materials: An alternative approach to 20 centuries of materials science. Dordrecht: Springer. pp. 195–204.
- Ghosh SK (2008). *Self-Healing Materials: Fundamentals, Design Strategies, and Applications* (1st ed.). Weinheim: Wiley-VCH. p. 145. ISBN 978-3-527-31829-2.

Ehrlich NL (1996). *How microbes influence mineral growth and dissolution*. Chemical Geology. 1–4 (132): 5–9. Bibcode:1996ChGeo.132....5E. doi:10.1016/S0009-2541(96)00035-6.