

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author

Interacciones microorganismo-hormigón: métodos de evaluación y posibles soluciones

tesis doctoral realizada por:
José María Vaquero Martínez

dirigida por:
Antonio Aguado de Cea
Ignacio Segura Pérez

Barcelona, febrero de 2013

Universitat Politècnica de Catalunya
Departament d'Enginyeria de la Construcció

TESIS DOCTORAL



Acta de qualificació de tesi doctoral

Curs acadèmic:

Nom i cognoms

DNI / NIE / Passaport

Programa de doctorat

Unitat estructural responsable del programa

Resolució del Tribunal

Reunit el Tribunal designat a l'efecte, el doctorand / la doctoranda exposa el tema de la seva tesi doctoral titulada

Acabada la lectura i després de donar resposta a les qüestions formulades pels membres titulars del tribunal, aquest atorga la qualificació:

APTA/E NO APTA/E

(Nom, cognoms i signatura)		(Nom, cognoms i signatura)	
President/a		Secretari/ària	
(Nom, cognoms i signatura)	(Nom, cognoms i signatura)	(Nom, cognoms i signatura)	
Vocal	Vocal	Vocal	

_____, _____ d'/de _____ de _____

El resultat de l'escrutini dels vots emesos pels membres titulars del tribunal, efectuat per l'Escola de Doctorat, a instància de la Comissió de Doctorat de la UPC, atorga la MENCIÓ CUM LAUDE:

SI NO

(Nom, cognoms i signatura)		(Nom, cognoms i signatura)	
Presidenta de la Comissió de Doctorat		Secretària de la Comissió de Doctorat	

Barcelona, _____ d'/de _____ de _____

*Dedico este trabajo a mis padres,
por ser mi ejemplo a seguir.*

Y para Chema. ¡Ánimo!

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, dar las gracias a Antonio Aguado e Ignacio Segura, por la tutoría de esta tesis. A Antonio por guiarme y mostrarme un verdadero criterio científico a la hora de desarrollar un trabajo. A Nacho, porque ser el catalizador del desarrollo de esta tesis y por su gran paciencia conmigo.

Me gustaría agradecer, de forma muy especial a Francesc por haber creído en esta idea tanto o más que yo, por su ayuda incondicional y por ser mucho más que un compañero de trabajo.

Agradecimientos M. Àngels Calvo y a su equipo de la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona, por la sorprendente predisposición mostrada a colaborar con este proyecto desde el primer día que contactamos y por ayudarme a desarrollar una parte de la investigación que sin ella no hubiera sido posible.

Mostrar mi agradecimiento a todo el personal de BASF Construction Chemicals España, y en especial a todos los que han intervenido de alguna manera en este trabajo: Diana, Montse, Esther, Andrés, Guillem, Albert....

Mis agradecimientos para Marta Urizal y Jordi del Valle de THOR Especialidades S.A. por colaborar con esta tesis de forma desinteresada.

Dar las gracias al personal del club de Vela de Barcelona, por dejarme disponer de sus instalaciones en el Puerto de Barcelona.

Gracias a todos los amigos, que han aguantado mis interminables explicaciones sobre este trabajo, en especial a Antonio por su ayuda con la presentación.

A nivel personal agradecer a toda mi familia, mis padres, mis hermanas, sus respectivos y a mis queridísimas sobrinas, que siempre están ahí, apoyándome en todo.

El último y más importante agradecimiento para Vanessa, por su casi infinita paciencia, por pasar tantos fines de semana conmigo encerrada en casa durante muchos meses, por las miles de veces que me ha dicho: '¡Animo, que ya queda menos!' y por su capacidad de levantarme el ánimo en cualquier situación.

RESUMEN

La interacción microorganismo–hormigón es un proceso que, debido a la naturaleza porosa del hormigón, lo hace susceptible de ser colonizado por los microorganismos presentes en prácticamente todos los hábitats. Esta interacción puede provocar cambios indeseables en el hormigón o hacer que éste sea un foco de contaminación microbiológica, si bien, en algunos casos, la presencia de microorganismos puede ser beneficiosa.

La presente tesis doctoral se focaliza en las interacciones negativas y tiene como objetivos principales, en primer lugar, realizar una selección de sustancias químicas y valorar su efectividad frente a microorganismos patógenos para el ser humano y/o su actividad (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*,) o frente al crecimiento de microorganismos que pueden provocar el biodeterioro del hormigón (*Scenedesmus vacuolatus*, *Stichococcus bacillaris* y *Thiobacillus thiooxidans*). En segundo lugar, desarrollar una metodología global (ensayos en laboratorio y ensayos de campo) que permita evaluar la efectividad de diferentes agentes químicos frente a diferentes factores a lo largo del tiempo.

A nivel de laboratorio se realizan tres campañas de ensayos, en las que se evalúan las prestaciones antimicrobianas de 15 formulados diferentes (10 monocomponente y 5 multicomponente) que contienen 10 principios activos distintos. En la 1ª campaña de ensayos se valora la eficacia de los formulados monocomponente, poniéndose de manifiesto que ninguno de ellos alcanza los objetivos requeridos y, por tanto, se descartan debido a las siguientes razones: perjudicar las prestaciones fundamentales del hormigón (desarrollo de resistencias, densidad y consistencia), lixiviación del principio activo y, no alcanzar los niveles de actividad antimicrobiana aceptables.

En la 2ª campaña se emplearon formulados multicomponente, obteniendo excelentes resultados con el formulado PL-UV H+M-2B, el cual presentó una efectividad antimicrobiana duradera en el tiempo sin comprometer el resto de prestaciones. Estas fueron confirmadas en condiciones reales de uso en la fase experimental de campo (puerto de Barcelona) retrasando la aparición de algas sobre la superficie de hormigón hasta en 16 semanas. Por último, en la 3ª campaña se evalúa la efectividad del formulado BXT/ I frente el ataque ácido sulfúrico biogénico producido por el metabolismo del *Thiobacillus thiooxidans*. En primera instancia se realizan los ensayos por impregnación mediante los cuales se demuestra, de forma cualitativa, que el formulado BXT / I inhibe el desarrollo del *Thiobacillus thiooxidans*. Posteriormente se lleva a cabo un ensayo en el que simula la acción del ácido sulfúrico biogénico siguiendo el método descrito por Vincke (1999), demostrándose que el empleo del formulado BXT/I reduce en más de un 30% la pérdida de masa de hormigón debida al metabolismo del *Thiobacillus thiooxidans*, considerándose, de esta manera, una solución efectiva contra este proceso de biodegradación.

Desde el punto de vista metodológico, esta tesis doctoral propone una nueva metodología de evaluación global de la eficacia de principios activos antimicrobianos, en la que se abarca el estudio de la influencia del principio activo en las propiedades del hormigón, la posible lixiviación del principio activo, la eficacia del efecto antimicrobiano (cultivo microbiológico en placa de Petri) y su durabilidad, tanto a nivel de laboratorio como en ensayos de campo.

ABSTRACT

Microorganism-concrete interaction is a process which makes concrete a very porous material very susceptible to colonization by microorganism present in almost any habitat. This interaction may cause undesirable changes in the concrete and turn it a source of microbiological contamination. Although in some cases, the presence of microorganisms in concrete may be beneficial.

This investigation is focused just on the negative interactions. Its main objectives are two, first one, to make a selection of chemicals and evaluate their effectiveness against pathogenic to humans and / or their activity (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*) or against the microorganisms growth that could cause concrete biodeterioration (*Scenedesmus vacuolatus*, and *Thiobacillus thiooxidans*, *Stichococcus bacillaris*). The second objectives is to develop a comprehensive methodology (laboratory tests and field trials) to evaluate the different chemicals effectiveness against different factors over time.

The laboratory tests are divided in three phases, in which the antimicrobial efficiency of 15 different formulations (10 and 5 multi-component) containing 10 different active ingredients is evaluated. In the first phase the monocomponent products efficacy was assessed, evidencing that none of them reaches the required objectives and thus are discarded for the following reasons: key concrete properties were prejudiced (strength development, density and slump), chemical leaching and acceptable antimicrobial activity not reached. In the second phase multicomponent formulations were evaluated and when using PL-UV PL-H+M-2B excellent results were reached. This product presents a long lasting antimicrobial effect without compromising the rest of concrete performances

These good results obtained with PL-UV PL-H+M-2B, were confirmed in real use conditions field trials conducted in the port of Barcelona, in which the algae appearance was delayed up to 16 weeks. Finally, in the third phase the BXT/I effectiveness against biogenic sulfuric acid (*Thiobacillus thiooxidans* metabolism) attack was evaluated. Firstly, impregnation tests were done and demonstrate, qualitatively, that BXT/I inhibits the *T. thiooxidans* growth. Subsequently, sulfuric acid attack simulation tests were carried out, following the method described by Vincke (1999), showing that the use of formulated BXT/I reduced by more than 30% concrete mass loss due *T. thiooxidans* metabolism; hence, this treatment can be considered effective against this biodeterioration process.

From the methodological point of view, this PhD proposes a new methodology to evaluate the antimicrobial chemicals efficacy by studying the chemical influence in concrete properties, its possible leaching, antimicrobial effectiveness (microbiological cultures in Petri plate) and its durability, both laboratory and field trials.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 PRESENTACIÓN.....	1
1.2 RAZÓN DE SER.....	6
1.3 OBJETIVOS.....	7
1.3.1. Objetivos generales.....	7
1.3.2. Objetivos específicos	7
1.4 METODOLOGÍA.....	8
1.5 CONTENIDO DEL DOCUMENTO.....	9
2. ESTADO DEL CONOCIMIENTO.....	13
2.1. INTRODUCCIÓN.....	13
2.2. CRECIMIENTO MICROBIOLÓGICO EN EL HORMIGÓN.....	14
2.2.1. Origen de los microorganismos en el hormigón	15
2.2.2. Factores influyentes en el desarrollo microbiano en el hormigón.....	17
2.3. BIODEGRADACIÓN DEL HORMIGÓN.....	19
2.4. CONTAMINACIÓN MICROBIANA.....	25
2.4.1. Situación actual en la desinfección en la industria	27
2.4.2. Impacto medioambiental del proceso de desinfección.....	32
2.5. DETECCIÓN DE LA PRESENCIA MICROBIANA Y SU EFECTO.....	32
2.5.1. Técnicas analíticas de detección.....	32
2.5.2. Técnicas de simulación de biodegradación.....	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1. INTRODUCCIÓN.....	37
3.2. DISEÑO DEL HORMIGÓN	38
3.2.1. Los componentes del hormigón.....	39
3.2.2. Proceso de fabricación de las muestras de hormigón	41

3.3.	DISEÑO DEL AGENTE BIOSTÁTICO	41
3.3.1.	Los agentes biostáticos.....	43
3.4.	CAMPAÑA EXPERIMENTAL.....	45
3.4.1.	Ensayos en laboratorio.....	45
3.4.2.	Ensayo de campo.....	47
3.5.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOSTÁTICA	51
3.5.1.	Materiales y equipamiento utilizados	51
3.5.2.	Procedimiento de los ensayos	54
3.5.3.	Expresión de resultados.....	57
3.6.	DURABILIDAD DEL EFECTO ANTIMICROBIANO	57
3.6.1.	Materiales y equipamiento utilizados	59
3.6.2.	Procedimiento del ensayo	60
3.7.	EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO SOBRE LAS PROPIEDADES FUNDAMENTALES DEL HORMIGÓN	61
3.7.1	Consistencia y mantenimiento de la consistencia.....	61
3.7.2.	Resistencias compresión y tracción	61
3.8.	DETERMINACIÓN DE LA POROSIDAD SUPERFICIAL.....	62
3.8.1.	Material y aparatos utilizados	63
3.8.2.	Procedimiento del ensayo	63
3.8.3.	Expresión de los resultados.....	64
3.9.	DETERMINACIÓN DE LIXIVIACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO.....	65
3.9.1.	Materiales utilizados	65
3.9.2.	Procedimiento del ensayo	66
3.9.3.	Expresión de los resultados.....	68
3.10.	EVALUACIÓN DE LA DEGRACIÓN DEL HORMIGÓN POR ÁCIDO SULFÚRICO BIOGÉNICO.....	68
3.10.1.	Materiales y equipamientos utilizados.....	69
3.10.2.	Procedimientos de los ensayos.....	70
3.10.3.	Expresión de los resultados	72
4.	AGENTES ANTIMICROBIANOS MONOCOMPONENTE	73
4.1.	INTRODUCCIÓN.....	73
4.2.	RESULTADOS ENSAYOS DE LABORATORIO.....	74

4.2.1 Formulado BXT/AB.....	74
4.2.2. Formulado BXT/11	76
4.2.3. Formulado Acticide MBP®	78
4.2.4. Formulado Biopol D212®	82
4.2.5. Formulado Vantocil IB®	84
4.2.6. Formulado Vanquish 100®	86
4.2.7. Formulado Densil P®	88
4.2.8. Formulado P 24-81	90
4.2.9. Formulado BC 98-56.....	93
4.2.10. Formulado BXT	95
4.3. CONCLUSIONES	99
5. AGENTES ANTIMICROBIANOS MULTICOMPONENTE	101
5.1 INTRODUCCIÓN.....	101
5.2 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE LABORATORIO.	102
5.2.1. Formulado BXT / 12C	102
5.2.2. Formulado BXT /10P.....	104
5.2.3. Formulado BXT 1.....	106
5.2.4. Formulado BXT 5	108
5.2.5. Formulado PL-UV-H+M-2B.....	111
5.3 CONCLUSIONES	116
6. ENSAYOS DE CAMPO	119
6.1 INTRODUCCIÓN.....	119
6.2 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE CAMPO.	120
6.2.1. Formulado PL-UV-H-2B	120
6.2.2. Formulado PL-UV-H-3B	126
6.3. CONCLUSIONES	129
7. ENSAYOS ATAQUE ÁCIDO SULFÚRICO BIOGÉNICO	131
7.1. INTRODUCCIÓN.....	131
7.2. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE LABORATORIO	132
7.2.1. Determinación de la lixiviación principio del activo.....	134

7.2.2. Evaluación de las propiedades antimicrobianas	134
7.3. CONCLUSIONES	144
8. CONCLUSIONES	145
8.1 INTRODUCCIÓN.....	145
8.2 CONCLUSIONES GENERALES.....	146
8.3 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS.....	146
8.3.1. Desarrollo metodológico	146
8.3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana	147
8.4 LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS.....	148
BIBLIOGRAFÍA	151
ANEJO 1. INFORMACIÓN GENERAL DE MICROORGANISMOS	
PATÓGENOS.....	159
A1.1. INTRODUCCIÓN.....	159
A1.2. ORGANIZACIÓN CELULAR	159
A1.2.1 Células eucariotas	160
A1.2.2 Células procariotas.....	163
A1.3. PRINCIPALES GRUPOS DE MICROORGANISMOS	165
A1.3.1 Bacterias	165
A1.3.2 Hongos.....	170
A1.3.3 Algas	172
A1.4. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO MICROBIOLÓGICO	174
ANEJO 2. PROCESOS DE DESINFECCIÓN: MEDIOS FÍSICOS	
Y QUÍMICOS.....	179
A2.1 INTRODUCCIÓN.....	179
A2.2 LA DESINFECCIÓN POR MEDIOS QUÍMICOS.....	179
A2.3 LA DESINFECCIÓN POR MEDIOS FÍSICOS	183
A2.3.1 Desinfección por temperatura.....	183
A2.3.2 Desinfección por fumigación.....	184
A2.3.3 Desinfección por radiación	185
A2.3.4 Desinfección por presión.....	185

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.- Izquierda: Pavimento del Club de vela sin y con colonización de algas (elaboración propia). Derecha: Tubería de desagüe atacada por <i>Thiobacillus thiooxidans</i> (www.wallisengineering.net, 2012).	2
Figura 1.2.- Factores influyentes en el biodeterioro (Sánchez-Silva et al., 2009).....	4
Figura 1.3.- Etapas de la primera fase de ensayos microbiológicos en laboratorio.....	8
Figura 1.4.- Etapas de los ensayos microbiológicos con <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	9
Figura 2.1.- Detalle de los horizontes del suelo (Miller, 1994; Jaramillo, 2001)	15
Figura 2.2.- Principales factores influyentes en deterioro del hormigón (Elaboración propia)	17
Figura 2.3.- (a) Porosidad superficial del hormigón y (b) Algas fijadas sobre el hormigón (Elaboración propia).....	18
Figura 2.4.- (a) Proceso de formación del biofilm (Center for Biofilm Engineering, 2003) y (b) Hormigón cubierto por biofilm (Elaboración propia)	20
Figura 2.5.- Estadios del proceso de biodegradación por ácido sulfúrico biogénico	23
Figura 2.6.- (a) Detalle del interior tubería de hormigón degradada por <i>Thiobacillus thiooxidans</i> y (b) Cristales de yeso en el hormigón formados por el ácido sulfúrico segregado por <i>Thiobacillus thiooxidans</i> (Welton et al, 2005). .	23
Figura 2.7.- Imagen de líquenes en el hormigón (www.inspectapedia.com, 2009)....	25
Figura 2.8.- Proceso de contaminación microbiológica con origen en el hormigón (Elaboración propia)	26
Figura 2.9.- Representación gráfica de la evolución de crecimiento microbiano (Kraisty, 2012)	28
Figura 2.10.- Orden cronológico de aparición de los agentes desinfectantes (Kraitsy, 2012)	29
Figura 2.11.- Evolución del contenido de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y de CaCO_3 de dos muestras inmersas en cultivos.	36
Figura 3.1.- Curvas granulométricas de los áridos empleados.....	40
Figura 3.2.- Acopio de áridos formando conos.....	40
Figura 3.3.- Diagrama de flujo de ensayos en laboratorio.	46
Figura 3.4.- Esquema de disposición de las probetas de ensayo en campo.....	48

Figura 3.5.- (a) Rampa de acceso al mar. (b) Foto de las probetas de pruebas en el Puerto Olímpico de Barcelona.	49
Figura 3.6.- (a) Probeta nivel de rugosidad leve, (b) Probeta nivel de rugosidad moderado y (c) Probeta nivel de rugosidad alto.	49
Figura 3.7.- Foto de las probetas de pruebas en el Puerto Olímpico de Barcelona.	50
Figura 3.8.- (a) Autoclave e (b) Incubadora.	52
Figura 3.9.- (a) Balanza de precisión, (b) Centrifugadora y (c) Medidor de pH.	52
Figura 3.10.- Detalle de placa de Petri.	53
Figura 3.11.- Imágenes de diferentes etapas del proceso de preparación de las placas de Petri.	56
Figura 3.12.- (a) Amasadora utilizada y (b) Cámara de curado.	62
Figura 3.13.- Prensas utilizadas.	62
Figura 3.14.- Equipo de Karsten utilizado en los ensayos.	63
Figura 3.15.- Procedimiento de ensayo Karsten: (a) Disposición de los tubos y (b) esquema con las marcas del nivel de agua.	64
Figura 3.16.- Detalle del equipo de HPLC.	66
Figura 3.17.- Esquema del proceso de inmersión.	67
Figura 3.18.- Equipos empleados en el estudio: a) cámara estanca, b) espectrofotómetro UV-visible y c) hisopo para recuperación del cultivo.	70
Figura 3.19.- (a) Diagrama de ensayos por inmersión y (b) proceso de incubación.	71
Figura 4.1.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT/AB: a) compresión y b) flexotracción.	75
Figura 4.2.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT/11: a) compresión y b) flexotracción.	78
Figura 4.3.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado ACTICIDE MBP®: a) compresión y b) flexotracción.	79
Figura 4.4.- Ensayos microbiológicos realizados con formulado ACTICIDE MBP®.	81
Figura 4.5.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado Biopol D 212®: a) compresión y b) flexotracción.	83
Figura 4.6.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado Vantocil IB®: a) compresión y b) flexotracción.	85
Figura 4.7.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado Vanquish 100®: a) compresión y b) flexotracción.	88
Figura 4.8.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado Densil P®: a) compresión y b) flexotracción.	89

Figura 4.9.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado P 24-81: a) compresión y b) flexotracción	91
Figura 4.10.- Ensayos microbiológicos realizados con el formulado P-24-81	92
Figura 4.11.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BC 98-56: a) compresión y b) flexotracción	94
Figura 4.12.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT: a) compresión y b) flexotracción.....	96
Figura 4.13.- Ensayos microbiológicos realizados con el formulado BXT	97
Figura 4.14.- Segunda fase de ensayos microbiológicos realizados con el formulado BXT.	98
Figura 5.1.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT/12C: a) compresión y b) flexotracción	103
Figura 5.2.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT/12C: a) compresión y b) flexotracción	105
Figura 5.3.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT 1: a) compresión y b) flexotracción.....	107
Figura 5.4.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT 5: a) compresión y b) flexotracción.....	109
Figura 5.5.- Ensayos microbiológicos realizados con el formulado BXT 5	110
Figura 5.6.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado PL-UV-H-2B: a) compresión y b) flexotracción	113
Figura 5.7.- Ensayos microbiológicos realizados con el formulado PL-UV-H-2B.....	114
Figura 5.8.- Segunda fase de ensayos microbiológicos realizados con el formulado PL-UV-H-2B	116
Figura 6.1.- Variación del volumen de agua absorbido con el tiempo de las probetas fabricadas	120
Figura 6.2.- Variación de la temperatura del mar durante el primer ensayo de campo.....	121
Figura 6.3.- Evolución de la superficie de las probetas no tratadas con acabado liso.....	122
Figura 6.4.- Evolución de la superficie de las probetas no tratadas con acabado semi-rugoso.....	122
Figura 6.5.- Evolución de la superficie de las probetas no tratadas con acabado rugoso	123
Figura 6.6.- Evolución de la superficie de las probetas tratadas con acabado liso.....	123

Figura 6.7.- Evolución de la superficie de las probetas tratadas con acabado semi-rugoso.....	124
Figura 6.8.- Evolución de la superficie de las probetas tratadas con acabado rugoso	124
Figura 6.9.- Resultados microbiológicos del formulado PL-UV-H-2 B tras los ensayos de campo	125
Figura 6.10.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado PL-UV-H-3B: a) compresión y b) flexotracción	127
Figura 6.11.- Variación de la temperatura del mar durante el segundo ensayo de campo.....	128
Figura 6.12.- Evolución de la superficie de las probetas durante el segundo ensayo (izquierda, probeta tratada; derecha, probeta sin tratar).....	128
Figura 6.13.- Resultados microbiológicos del formulado PL-UV-H-3 B tras los ensayos de campo.....	129
Figura 7.1.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT/I: a) compresión y b) flexotracción.....	133
Figura 7.2.- Desarrollo de <i>Thiobacillus thiooxidans</i> a alta concentración en placa de Petri.	134
Figura 7.3.- Desarrollo de <i>Thiobacillus thiooxidans</i> a baja concentración en placa de Petri.	135
Figura 7.4.- Variación de peso de las probetas en medio de Vincke.....	137
Figura 7.5.- Pérdida de peso acumulada de las probetas en medio de Vincke.....	138
Figura 7.6.- Variación de peso de las probetas en medio de Ringer.....	138
Figura 7.7.- Pérdida de peso acumulada de las probetas en medio de Ringer.....	139
Figura 7.8.- Reacciones en el proceso de deterioro biogénico.....	139
Figura 7.9.- Variación de la concentración de sulfatos en el medio Vincke.....	140
Figura 7.10.- Variación de la concentración total de sulfatos en el medio Vincke....	141
Figura 7.11.- Variación de la concentración de sulfatos en el medio Ringer.	141
Figura 7.12.- Variación total de la concentración de sulfatos en el medio Ringer....	142
Figura 7.13.- Evolución de pH en medio de cultivo Vincke.....	143
Figura 7.14.- Evolución de pH en medio Ringer.....	144
Figura 8.1.- Probetas de hormigón con y sin tratamiento superficial situadas en el puerto de Barcelona.....	149
Figura A1.1.- Estructura membrana citoplasmática (Tortora et al., 2007)	161
Figura A1.2.- Citoplasma y orgánulos constituyentes (Tortora et al., 2007)	161

Figura A1.3.- Imagen de una mitocondria (tomada de www.3dsience.com)	163
Figura A1.4.- Imagen de un cloroplasto (Thierfelt)	163
Figura A1.5.- Esquema de pared celular: a) bacteria Gram positiva y b) bacteria Gram negativa	164
Figura A1.6.- Curva crecimiento bacteriano (Elaboración propia).....	167
Figura A1.7.- Rango de temperaturas de crecimiento de microorganismos (Elaboración propia).....	178

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1.- Reacciones producidas en la biodegradación química del hormigón (Cwalina et al., 2002).....	21
Tabla 2.2.- Procesos bioquímicos responsables de la biodegradación (Cwalina et al., 2002).....	24
Tabla 2.3.- Tabla resumen de los puntos de acción de los agentes químicos.....	30
Tabla 3.1.- Tabla de dosificación de los hormigones empleados en los ensayos.	39
Tabla 3.2.- Información general sobre los agentes biostáticos.....	44
Tabla 3.3.- Propiedades físicas de los agentes biostáticos.....	44
Tabla 3.4.- Características de los agentes biostáticos utilizados en la 1ª fase.....	45
Tabla 3.5.- Tabla resumen de los formulados ensayados	46
Tabla 3.6.- Composición del medio de cultivo para hongos y levaduras	53
Tabla 3.7.- Composición del medio de cultivo para bacterias.....	53
Tabla 3.8.- Composición del medio de cultivo algas.....	54
Tabla 3.9.- Composición de la solución de micronutrientes	54
Tabla 3.10.- Organismos empleados en la fase de ensayos microbiológicos	54
Tabla 3.11.- Condiciones de temperatura y duración del periodo de incubación.	57
Tabla 3.12.- Interpretación del ensayo de evaluación del biocida	57
Tabla 3.13.- Detalle de la irradiación de las diferentes lámparas.....	60
Tabla 3.14.- Composición del medio de cultivo para <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	69
Tabla 3.15.- Composición de la solución de Ringer para <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	69
Tabla 4.1.- Datos de identificación y características del formulado BXT/AB	75
Tabla 4.2.- Datos de identificación y características del formulado BXT/11.....	77
Tabla 4.3.- Datos de identificación y características formulado ACTICIDE MBP®.....	79
Tabla 4.4.- Determinación de la lixiviación del principio activo, formulado MBP®	80
Tabla 4.5.- Interpretación de los ensayos microbiológicos realizados con el formulado ACTICIDE MBP.....	81
Tabla 4.6.- Datos de identificación y características del formulado Biopol D 212®.....	82
Tabla 4.7.- Determinación de la lixiviación del principio activo, formulado Biopol D212®.....	84
Tabla 4.8.- Datos de identificación y características del formulado Vantocil IB®.....	85

Tabla 4.9.- Determinación de la lixiviación del principio activo, formulado Vantocil IB®.....	86
Tabla 4.10.- Datos de identificación y características del formulado Vanquish 100®.....	87
Tabla 4.11.- Datos de identificación y características del formulado Densil P®.....	89
Tabla 4.12.- Datos de identificación y características del formulado P 24-81.....	90
Tabla 4.13.- Determinación de la lixiviación del principio activo, formulado P 24-81.....	92
Tabla 4.14.- Interpretación de los ensayos microbiológicos realizados con el formulado P 24-81.....	93
Tabla 4.15.- Datos de identificación y características del formulado BC 98-56.....	93
Tabla 4.16.- Datos de identificación y características del formulado BXT.....	95
Tabla 4.17.- Determinación de la lixiviación del principio activo, formulado BXT.....	97
Tabla 4.18.- Interpretación de los ensayos microbiológicos realizados con el formulado BXT.....	98
Tabla 4.19.- Interpretación de la segunda fase de ensayos microbiológicos realizados con el formulado BXT.....	98
Tabla 5.1.- Datos de identificación y características del formulado BXT/12C.....	102
Tabla 5.2.- Datos de identificación y características del formulado BXT/10P.....	104
Tabla 5.3.- Datos de identificación y características del formulado BXT 1.....	106
Tabla 5.4.- Datos de identificación y características del formulado BXT 5.....	108
Tabla 5.5.- Interpretación de los ensayos microbiológicos realizados con el formulado BXT 5.....	111
Tabla 5.6.- Datos de identificación y características del formulado PL-UV-H-2B.....	112
Tabla 5.7.- Determinación de la lixiviación del principio activo, formulado PL-UV-H-2B.....	114
Tabla 5.8.- Interpretación de los ensayos microbiológicos realizados con el formulado PL-UV-H-2B.....	115
Tabla 5.9.- Interpretación de la segunda fase de ensayos microbiológicos realizados con el formulado PL-UV-H-2B.....	116
Tabla 6.1.- Interpretación de los ensayos microbiológicos del formulado PL-UV-H-2B tras los ensayos de campo.....	125
Tabla 6.2.- Datos de identificación y características del formulado PL-UV-H-3B.....	126
Tabla 7.1.- Datos de identificación y características del formulado BXT/I.....	132

Tabla 7.2.- Tabla resumen ensayos por impregnación obtenidos con el formulado BXT/I.....	136
Tabla A1.1.- Información general sobre <i>Escherichia coli</i> (Stanier et al, 2005; Tortora et al., 2007).....	168
Tabla A1.2.- Información general sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (Stanier et al, 2005; Tortora et al., 2007).....	169
Tabla A1.3.- Información general sobre <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	170
Tabla A1.4.- Información general sobre <i>Aspergillus niger</i>	172
Tabla A1.5.- Información general sobre <i>Stichococcus bacillaris</i>	174
Tabla A1.6.- Información general sobre <i>Scenedesmus vacuolatus</i>	174
Tabla A1.7.- Rango de actividad de agua (aw) para el crecimiento de algunos microorganismos	175

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PRESENTACIÓN

El hormigón es el material de construcción por excelencia en nuestro ámbito geográfico, debido a su bajo coste y amplias y elevadas prestaciones. Su evolución ha sido continua desde su aparición, como tal, hacia la mitad del siglo XIX. En estos casi dos siglos el aumento de las exigencias y campos de aplicación ha sido significativo y, entre ellos, los campos asociados a aspectos de biología, ya sea para evitar que se asienten microorganismos en estas aplicaciones o bien, para justo lo contrario, favorecer que se asiente, en determinadas zonas, para aprovechar sinergias positivas de ambas circunstancias (hormigón y microorganismos).

En esta línea de trabajo dentro del Departamento de Ingeniería de la Construcción de la UPC, se está trabajando en las dos direcciones, mediante dos tesis doctorales. La investigación de Manso (2012) incide en la colonización de elementos de hormigón con microorganismos, mientras que la presente tesis doctoral, incide en la línea de evitar o retardar la aparición de microorganismos en dichos elementos. En ambos casos, responde a problemas industriales de gran interés, ya sea para potenciar aplicaciones de tipo estético o ambientales, en la primera de las tesis o bien la de reducir riesgo y problemas en la presente tesis.

En la Figura 1.1 se muestran dos ejemplos claros de los problemas que pueden llegar a producirse en el hormigón debido a la presencia de determinados microorganismos. En la fotografías mostradas en las izquierda se puede observar las

consecuencias que tiene la presencia de algas sobre un pavimento de hormigón en un ambiente marino, mientras que en la figura que se encuentra a la derecha, se puede observar la degradación que experimenta una tubería de hormigón como consecuencia de la acción del *Thiobacillus thiooxidans*.



Figura 1.1.- Izquierda: Pavimento del Club de vela sin y con colonización de algas (elaboración propia). Derecha: Tubería de desagüe atacada por *Thiobacillus thiooxidans* (www.wallisengineering.net, 2012).

Debido a su variedad y a su gran diversidad metabólica, los microorganismos se encuentran en la práctica totalidad de los hábitats, incluidos los materiales de construcción. Los efectos pueden ser positivos o negativos. En el primer caso puede llegar, incluso, a ser beneficioso en ciertas condiciones, tal y como se demuestra en varios estudios, en los que se evalúa el uso de ciertos microorganismos para la conservación de patrimonio (De Muynck W, 2009; DeMuynck, 2011).

Sin embargo el énfasis en el presente trabajo se hace en los efectos negativos, derivados de que en el caso del hormigón, debido a su naturaleza porosa, es un material que puede albergar microorganismos y este hecho puede tener dos efectos negativos sobre este material:

- Provocar que el hormigón pueda llegar a ser un foco de contaminación microbiológica
- Sufrir diversos procesos de degradación debido a la actividad microbiana, provocando su biodeterioro.

Haciendo referencia al hormigón como potencial foco de contaminación microbiana, se debe destacar que cada vez adquiere una mayor relevancia el control de microorganismos, siendo una gran preocupación en diversos ambientes, entre los que se incluyen ambientes clínicos, industriales (agroalimentaria, farmacéutica, etc.) e incluso el doméstico y, es por esta razón, por la que se debe tener en cuenta el papel que juega el hormigón presente en una edificación en el nivel microbiológico ambiental. En el caso de la industria agroalimentaria (si bien es extrapolable para otro tipo de industrias) el nivel de asepsia tiene especial importancia debido al gran impacto que tiene sobre los productos producidos en dicha industria por la contaminación cruzada, entiéndase como tal a la producida por la transmisión de microorganismos de un alimento a otro, de forma

directa o indirecta, como consecuencia de una higiene inadecuada que provoca la contaminación de estos (*Kusumaningrum y Cols., 2003*). En esta situación los microorganismos patógenos pueden multiplicarse llegando a niveles de riesgo (*Reij et al., 2004*).

Los medios de contaminación más importantes son los manipuladores, las materias primas crudas, los equipos y las superficies de contacto (*Fuster, N. 2006*). Este tipo de contaminación es la responsable del casi el 25% de los brotes de toxiinfección alimentaria, según un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud en 1995 dentro del ámbito europeo.

En esta dirección, recientes estudios (*Cowan et al. 2003; Moretro et al. 2006*) demuestran que las superficies tratadas con productos mediante los que se controla la población microbiana pueden reducir la carga microbiológica de los alimentos que se encuentran en contacto con éstas. Los componentes activos que se emplean para este tipo soluciones antimicrobianas son tanto de origen orgánico como inorgánico. Dentro de este grupo de productos los que han tenido una mayor relevancia son compuestos de plata y cobre, siendo los principios activos más estudiados (*Matsamura et al. 2003*). Estos productos han sido utilizados en numerosas aplicaciones, siendo incorporados tanto en productos de uso doméstico como en componentes de utensilios quirúrgicos.

Independientemente del origen de los principios activos que se emplean hasta el momento como agentes antimicrobianos, la principal desventaja que presentan cuando se emplean en materiales de construcción, es la durabilidad de su efecto, ya que a diferencia de otras aplicaciones (material quirúrgico, plásticos, geles de limpieza, envases, etc) las edificaciones tienen una vida útil mucho mayor y por lo tanto se debe garantizar que la duración del efecto sea lo más duradera posible, o al menos, poder determinarla.

Otro de los aspectos que se debe tener en cuenta a la hora de emplear productos con propiedades antimicrobianas es su toxicidad, tanto del punto de vista humano, animal y medioambiental. Es una importante limitación ya que restringe el número de principios químicos que se pueden emplear (*Nikawa et al. 1997; Hotta et al 1998; Matsumura et al, 2003*).

Como respuesta a la necesidad de tener un material de construcción que ayude a mantener las condiciones de higiene requerida para una actividad determinada, se han llevado a cabo algunas investigaciones al respecto, en las que se estudia el comportamiento de diferentes componentes, orgánicos e inorgánicos, como inhibidores del crecimiento determinados microorganismos. Como ejemplo de algunas de las investigaciones realizadas con este fin y más cercanas a este estudio, son las llevadas a cabo para evaluar las prestaciones de los derivados del fenol como agente antimicrobiano en paredes y soleras realizadas con hormigón (*Wayne et al, 2000; Ramírez and De León, 2004*). Por su parte, *Navas y Borralleras (2005)* estudiaron el efecto de añadir a la masa de hormigón de unas fibras de polipropileno que contenían en su composición agentes

bactericidas y fungicidas, consiguiendo la inhibición del crecimiento de determinadas bacterias y hongos, si bien no determinaron la duración del efecto.

Debido al elevado coste que supone el tratamiento de una masa de hormigón, en la actualidad se están estudiando soluciones en las que solo se trate la parte superficial de la estructura de hormigón o mortero, evitando con ello dotar de una protección antimicrobiana al interior del hormigón, lugar donde nunca se desarrollará vida microbiana en unos niveles perjudiciales, debido a las condiciones de oxígeno, dióxido de carbono y humedad existentes.

Con respecto al segundo efecto señalado, el **biodeterioro del hormigón**, se debe destacar que hay un gran número de investigaciones que estudian los numerosos procesos provocados por determinados microorganismos que engloba el concepto biodeterioro. Este concepto, debe definirse como el proceso mediante el cual la estructura pierde algunas de las prestaciones para las que fue diseñada debido al efecto causado por la actividad microbiológica en valor o en calidad (*Rose, 1981*). Dentro del concepto biodeterioro se deben distinguir tres tipos, estético, físico y químico (*Gaylarde et al., 2003*) en función de las consecuencias que provoquen en el material afectado.

El grado de degradación de un material producido por la acción de determinados microorganismos viene dado por 4 factores principalmente: microorganismos, elemento estructural, condiciones ambientales y el material de construcción. En la Figura 1.2 se representa el modelo de interacción que interviene en los procesos de biodeterioro de un material genérico de construcción.

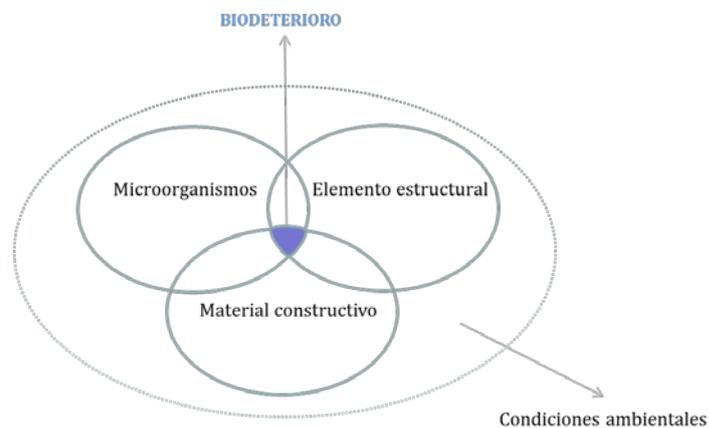


Figura 1.2.- Factores influyentes en el biodeterioro (*Sánchez-Silva et al., 2009*).

Es necesario aclarar que en un estado inicial una estructura es menos susceptible a sufrir un ataque microbiológico puesto que las características físico-químicas del material lo impiden (rugosidad superficial, pH, densidad del material, etc). Con el paso del tiempo, estas barreras se van debilitando haciendo que los microorganismos puedan colonizar la estructura, comenzando en este momento el biodeterioro. Las condiciones ambientales, el

uso de la estructura y su disposición determinarían en gran medida la presencia microbiana en tipo y cantidad.

Los efectos del biodeterioro de los materiales de construcción tienen importantes consecuencias económicas y deberían tenerse en cuenta a la hora de elaborar el coste de la estructura durante todo su ciclo productivo, ya que la durabilidad y, por lo tanto, su mantenimiento dependerán, en mayor o menor medida de la capacidad del material de soportar el ataque microbiano. A pesar de estas significativas repercusiones, el biodeterioro no ha recibido la atención requerida a nivel normativo, destacándose los dos ejemplos más importantes, el primero de ellos es el capítulo 4 de la ACI 350-06 (2006), donde se definen los requerimientos del hormigón en condiciones de exposición especiales; y el segundo, el número 182 de *The Durable Concrete Structures Bulletin d'information* (1989), en el cual se precisan las diversas condiciones a tener en cuenta a la hora de especificar la composición del hormigón en aplicaciones con riesgo de biodeterioro (Hudon et al., 2011)

En ambientes en los que se dan condiciones especialmente favorables para el biodeterioro las pérdidas de las capacidades de las estructuras pueden llegar a ser notables y es por ello, que en determinadas circunstancias este efecto se debe tener especialmente en cuenta. Por su parte, la cuantificación del impacto resultante del biodeterioro es difícil de estimar debido a que estos efectos no son fácilmente separables de otros procesos de degradación y en muchos casos el biodeterioro acelera otros mecanismos que también dañan el material.

Otro de los puntos que dificultan esta cuantificación es que este proceso está en medio de dos disciplinas muy diferenciadas, la microbiología y la ingeniería, y no siempre la comunidad de ingenieril está familiarizada con estos procesos biológicos y viceversa (Sanchez-Silva, 2009). No obstante hay algunos casos de cuantificación, a nivel de ejemplo, los trabajos llevados a cabo por Sand and Bock (1991) revelaron que el 1% del coste total de los edificios de Hamburgo se destinaba cada año a su mantenimiento, debido a los degradación física, química y biológica.

Dentro de los procesos de biodeterioro, el caso concreto de la degradación de las tuberías de hormigón por parte de bacterias sulfooxidantes es uno de los más estudiados debido a los importantes problemas que provocan. Para que este proceso tenga lugar se deben dar unas condiciones determinadas de acidez, generadas por la acción del ácido sulfhídrico y del dióxido de carbono proveniente de la carbonatación, haciendo que el agua presente en la porosidad del hormigón pase de tener un pH 12 a un pH 9. Una vez que se dan estas condiciones la bacteria *Thiobacillus thiooxidans*, también conocida como *Acidithiobacillus thiooxidans*, crece en el biofilm formado en el interior de la tubería y metaboliza el ácido sulfhídrico en ácido sulfúrico (Hudon, E. et al. 2011). Este proceso provoca que las tuberías pierdan una parte importante de la sección de hormigón que las componen, comprometiendo la durabilidad de la estructura y por lo tanto su vida útil.

Con el fin de valorar las repercusiones económicas que tiene este proceso de deterioro, en EE.UU. se han llevado a cabo varios estudios que ponen de manifiesto que la degradación tanto de las tuberías de desagüe de hormigón como de otras instalaciones para el tratamiento de aguas residuales provoca, sólo en EE.UU., pérdidas económicas de varios miles de millones de dólares anuales (*Brongers et al., 2001; EPA, 1999*). De estos costes, los daños provocados a las aguas residuales de los servicios públicos se valoran en 30 mil millones dólares anuales. En el caso concreto de la ciudad de Los Ángeles estos costes se valoraron en 200 millones de dólares (*McCrary et al., 1994*).

A nivel europeo cabe destacar el estudio de *Kaempfer y Berndt (1999)* en el que se estimó que los gastos de reparación y mantenimiento de los sistemas de alcantarillado público y privado en Alemania ascendían a 100 millones dólares, de los cuales el 40% fue atribuido a la corrosión por ataque de ácido sulfúrico biogénico.

En la actualidad en España, en la práctica, no se tiene constancia de que se esté realizando ningún tipo de tratamiento para evitar o minimizar este biodeterioro, aunque existen patentes a este respecto (*Maeda, 2004*) y como consecuencia esta problemática está desplazando esta solución constructiva (tuberías de hormigón) por otras que no se ven afectadas por este proceso, como por ejemplo las tuberías de materiales plásticos. Una vez conocida esta situación se hace necesario, al menos, establecer una metodología para evaluar este proceso degenerativo y posteriormente, un planteamiento de soluciones potenciales.

Tras lo descrito hasta el momento, se puede concluir que mucho de los problemas de biodeterioro del hormigón y de otros materiales de construcción no están resueltos en la actualidad, por lo que se hace necesaria una mayor confluencia en futuras investigaciones entre las disciplinas de la ingeniería y la microbiología.

1.2 RAZÓN DE SER

La falta de un profundo conocimiento sobre los posibles efectos que produce la presencia de determinados microorganismos en el hormigón, tanto a nivel de conservación de las condiciones higiénicas en una edificación, como a nivel del biodeterioro que puede sufrir este material por su metabolismo, hace que se produzcan una serie de pérdidas económicas importantes y hasta el momento no cuantificadas de forma fidedigna. Estas pérdidas pueden ser de diversa índole, desde pérdidas de efectividad en una industria agroalimentaria o de otro tipo, hasta un mayor mantenimiento de una estructura debido al biodeterioro, pasando por malestar físico del personal de una empresa producido por una contaminación microbiológica.

En esta dirección, deben abarcarse una serie de cuestiones que, en la actualidad, o bien no han sido profundamente estudiados, o no son tenidas en cuenta suficientemente. Uno de los ejemplos más claros de ello, es la nula importancia que se le da a la potencial presencia de microorganismos a la hora de diseñar un hormigón, a pesar de que ésta

pueda condicionar de forma clara su durabilidad. Otro de los ejemplos a destacar es que no se toma en suficiente consideración la clara influencia que tienen el material de construcción que compone una edificación y el estado de asepsia requerido por la actividad que en ella se desarrolla. Es por estos hechos, que se considera fundamental estudiar metodologías que permitan determinar los efectos de la interacción hormigón microorganismos y a su vez, evaluar soluciones que permitan minimizar o evitar posibles consecuencias.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivos generales

Valorando lo expuesto anteriormente, los objetivos generales de esta Tesis Doctoral son tres:

- Desarrollar una metodología mediante la cual se pueda evaluar la efectividad de diferentes agentes químicos frente al crecimiento de determinados microorganismos y la durabilidad de este efecto. Dentro de este estudio se evalúa otro aspecto, igualmente importante, como la influencia de los agentes antimicrobianos utilizados sobre las propiedades fundamentales del hormigón.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de determinadas sustancias químicas frente a microorganismos patógenos indicadores para el ser humano y/o su actividad (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*,) o frente al crecimiento de microorganismos que pueden ser provocar el biodeterioro del hormigón (*Scenedesmus vacuolatus*, *Stichococcus bacillaris* y *Thiobacillus thiooxidans*).
- Contrastar los resultados obtenidos a nivel de laboratorio con los obtenidos en fase de ensayos de campo y de este modo poder evaluar las prestaciones del productos en condiciones reales de uso.

1.3.2 Objetivos específicos

Con el fin de alcanzar los objetivos generales, se establecen una serie de objetivos específicos, detallados a continuación.

Desarrollo de metodología

- Estudiar las metodologías existentes para la evaluación de la efectividad antimicrobiana de agentes químicos.
- Proponer un nuevo modelo de determinación de la durabilidad del efecto antimicrobiano.

- Plantear un modelo mediante el cual determinar la toxicidad (humana, animal o medio ambiental) de los agentes antimicrobianos.
- Estudiar posibles soluciones con aplicaciones reales mediante ensayos de campo.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

- Determinar la actividad antimicrobiana de diferentes agentes, tanto mono-componentes como multicomponente.
- Evaluación de la influencia que tiene la presencia de los agentes antimicrobianos sobre las propiedades fundamentales del hormigón.
- Comprobación de la posible toxicidad de los agentes antimicrobianos.
- Constatar los resultados observados a nivel de laboratorio con los resultados obtenidos en los ensayos de campo.
- Contrastar los resultados obtenidos con los obtenidos mediante metodologías planteadas por otros autores.

1.4 METODOLOGÍA

Para poder alcanzar los objetivos fijados en esta Tesis Doctoral se hace necesario desarrollar una metodología que lo permita. La metodología seguida en la fase experimental comprende tanto **ensayos de laboratorio** como **ensayos de campo**. Uno de los aspectos a destacar de los métodos empleados es que sigue un flujo de cascada, mediante el cual solo los agentes antimicrobianos que superan cada fase pasan a la siguiente, con ello se pretende minimizar el coste y el tiempo empleado en la fase experimental, tal como se muestra en la Figura 1.3.

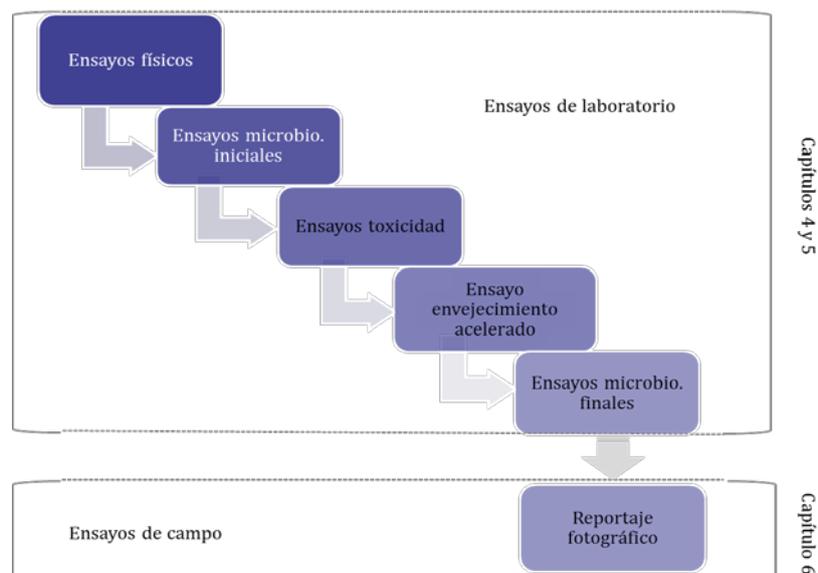


Figura 1.3.- Etapas de la primera fase de ensayos microbiológicos en laboratorio

Dentro de los ensayos de laboratorio llevados a cabo se deben distinguir dos tipos: ensayos microbiológicos en cultivo de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Stichococcus bacillaris* y ensayos microbiológicos en cultivo de *Thiobacillus thiooxidans*. Los principales tipos de ensayos de laboratorio en la primera fase de la metodología son los siguientes: físicos, microbiológicos iniciales, determinación de toxicidad, envejecimiento acelerado y microbiológicos finales (Figura 1.3).

Por su parte, las etapas seguidas en los ensayos microbiológicos (Figura 1.4) en los que se evalúa la eficiencia de un agente antimicrobiano frente al ataque por ácido sulfúrico biogénico producido por *Thiobacillus thiooxidans* son las siguientes:

- Ensayos físicos.
- Ensayos de simulación de ataque ácido.
- Monitorización de las variables que informan sobre la evolución del biodeterioro.

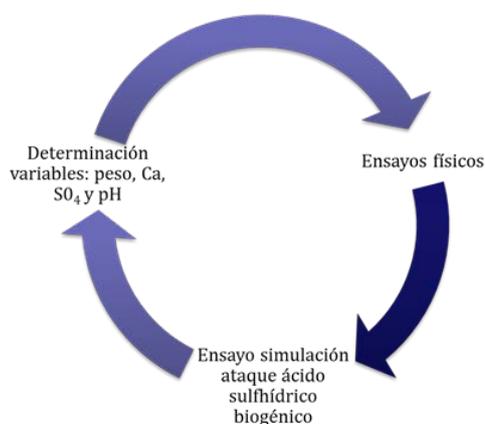


Figura 1.4.- Etapas de los ensayos microbiológicos con *Thiobacillus thiooxidans*.

Tras la realización de los ensayos del laboratorio en los que se evaluó la eficacia de los agentes antimicrobianos (capítulos 4 y 5) frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Stichococcus bacillaris*, se seleccionaron los formulados que presentaron mejores prestaciones y con ellos se realizaron los ensayos de campo. Esta fase de ensayo consistió en evaluar las prestaciones de los formulados en condiciones reales, en este caso se evaluó la eficacia de dos formulados frente al crecimiento de algas en el puerto de Barcelona.

1.5 CONTENIDO DEL DOCUMENTO

La tesis consta de ocho capítulos y dos anejos. El presente capítulo, (**Capítulo 1**) correspondiente a la introducción, se presenta el tema, los objetivos y la metodología necesaria para alcanzar los objetivos propuestos.

En el **Capítulo 2** se presenta una revisión bibliográfica sobre la interacción microorganismo-hormigón y sus posibles consecuencias, factores influyentes. Asimismo

se presentan las principales metodologías existentes hasta el momento para monitorizar esta interacción.

Por su parte, en el **Capítulo 3** se propone una metodología con la que sea posible evaluar las variables determinadas y a su vez, necesarias para alcanzar los objetivos marcados. En este capítulo se detalla la metodología seguida tanto en los ensayos realizados en el laboratorio como los llevados a cabo a nivel de campo.

En el **Capítulo 4** se presentan y se analizan los resultados obtenidos en la campaña experimental realizada en laboratorio empleando los agentes antimicrobianos monocomponentes. Mediante la realización de estos ensayos se pretende evaluar las prestaciones como inhibidores del crecimiento de los microorganismos indicadores de los formulados que contienen únicamente un principio activo. Por su parte, siguiendo el mismo patrón que en el capítulo anterior, en el **Capítulo 5**, se muestran los resultados de los ensayos microbiológicos llevados a cabo mediante el empleo de agentes antimicrobianos multicomponente.

En el **Capítulo 6** representa los resultados observados tras la fase experimental de campo realizada en el puerto de Barcelona. En ella se evaluó las prestaciones de los formulados, que presentaron mejores resultados en los ensayos de laboratorio, en condiciones reales de uso.

El **Capítulo 7** muestra los resultados procedentes de la fase experimental en la que se evalúa el biodeterioro del hormigón por parte del ácido sulfúrico metabolizado por el *Thiobacillus thiooxidans* simulando las condiciones que se dan en las tuberías de hormigón para aguas residuales. Del mismo modo, en esta fase se determina el nivel de eficiencia frente a este proceso de biodeterioro de un agente antimicrobiano.

En el **Capítulo 8** se explican las conclusiones resultantes de los distintos trabajos realizados y se proponen diferentes líneas futuras de investigación que permitirían una mayor profundización sobre algunos puntos abarcados en la presente Tesis Doctoral.

En el **Anejo 1** se presenta una información general sobre microorganismos, y haciendo especial énfasis en los microorganismos que han servido como indicadores en este estudio. Por otra parte, en el **Anejo 2** detalla la información referente a la situación actual de los medios de desinfección utilizados en la actualidad para controlar la población microbiana.

2. ESTADO DEL CONOCIMIENTO

2.1. INTRODUCCIÓN

El hormigón es uno de los materiales de construcción por excelencia desde hace más de 25 siglos, debido a sus características resistentes, su durabilidad y el bajo coste del mismo, siendo utilizado para todo tipo de edificaciones, elementos constructivos y estructuras. Debido a su universalidad como material de construcción, el hormigón ha sido estudiado ampliamente desde múltiples puntos de vista, si bien la biodegradación ha sido uno de los aspectos menos estudiados.

A pesar de ello, el proceso de biodegradación del hormigón es un proceso que puede tener lugar en construcciones que se encuentran en determinadas condiciones que hacen que el hormigón pueda ser colonizado por microorganismos. La interacción entre microorganismos y el hormigón es en la mayoría de las situaciones, no deseable debido a que puede afectar a las características estéticas y mecánicas del hormigón, así como perjudicar a sus usuarios y/o su actividad.

El **objetivo** de este capítulo es presentar una revisión del estado del conocimiento relacionado con la interacción de los diferentes microorganismos con el hormigón, fijando la atención, tanto en el conocimiento de los microorganismos patógenos y de los procesos bioquímicos que provocan como en las técnicas para determinar y simular estos procesos de biodegradación.

Con este fin, este capítulo consta de 4 apartados. En el primero (2.2) se detalla el estado del conocimiento sobre el crecimiento microbiológico en el hormigón. En el segundo (2.3) se describe los diferentes procesos de biodegradación del hormigón. En el tercer apartado de este capítulo (2.4) se estudia contaminación microbiana del hormigón, mientras que en el cuarto y último apartado (2.5) se estudian las técnicas para la determinación de la presencia microbiana y sus efectos.

2.2. CRECIMIENTO MICROBIOLÓGICO EN EL HORMIGÓN

El hormigón después de su construcción, es invulnerable al ataque biológico debido a su alta alcalinidad (pH 11-13). Este valor de pH es el resultado de la formación de hidróxido de calcio, resultante de la hidratación del cemento, pero con el paso del tiempo los valores van disminuyendo debido al efecto del dióxido de carbono y sulfuro de hidrógeno en la superficie del hormigón. Es en ese momento cuando el hormigón puede ser colonizado por determinados microorganismos, ya que a pesar de poseer una estructura compacta, el hormigón, si se observa a nivel microscópico se pueden apreciar rugosidades, fisuras y huecos en los que un microorganismo puede fijarse y desarrollarse, estableciéndose, por tanto, una relación entre el hormigón y los microorganismos (*Sánchez-Silva et al., 2008*).

Esta interacción, depende en gran medida de tres factores principales, en primer lugar, de la presencia de microorganismos en el ambiente del hormigón o en algunos de sus componentes, en segundo lugar, de la composición química y la estructura del hormigón, y por último, de las condiciones ambientales.

El tipo de microorganismos presentes en el hormigón o en contacto con él, determinaran la posible interacción microorganismo-hormigón, ya que dependiendo de su fisiología y metabolismo esta interacción tendrá consecuencias diferentes. Por su parte, la estructura y composición del hormigón condicionarán el número de microcanales en su matriz, la rugosidad superficial, así como, la disponibilidad de algunas sustancias químicas (principalmente sales de calcio) propiciando que la colonización microbiológica se dé en mayor o en menor medida.

El ambiente en el que se encuentra una estructura de hormigón determina en gran medida el desarrollo microbiológico y como consecuencia el efecto que tendrá este proceso en el hormigón, entendiendo como ambiente al conjunto de condiciones de humedad y temperatura y a los compuestos que están en su inmediatez.

En la mayoría de los casos, esta interacción entre microorganismo y hormigón, tiene consecuencias negativas para este, reduciendo su durabilidad, pero no siempre esta relación es negativa, hay investigaciones en las que se estudia el proceso de precipitación de carbonato inducido por bacterias como medio para aumentar la durabilidad de materiales cementicios (*De Muynck, et al, 2008, De Muynck, et al. 2010*)

2.2.1. Origen de los microorganismos en el hormigón

El primer punto a considerar es el medio mediante el cual los microorganismos pueden llegar al hormigón. En este estudio se consideran dos vías de contaminación. La primera, a la que se denominará *contaminación endógena*, en la que los microorganismos provienen de los componentes del hormigón, y, la segunda, la más importante, denominada *contaminación exógena*, producida por el contacto entre el hormigón y un medio que contenga microorganismos.

La *contaminación endógena* proviene básicamente de los microorganismos de los áridos. Para poder determinarlos debemos estudiar la microbiología, composición, propiedades, etc. del suelo. Hay diferentes tipos de suelo y sus características varían dependiendo de la localización y del clima. Los suelos difieren en profundidad, propiedades físicas, composición química y origen.

En la Figura 2.1 se presenta un esquema general del suelo. Éste, está compuesto de diversas capas. A dichas capas se les llama horizontes y cada una se caracteriza por su composición abiótica y/o biótica. En ella se pueden observar las tres capas principales, suelo, subsuelo y roca madre. En la primera de estas capas, suelo, se distinguen, a su vez, dos subfases, suelo superficial y suelo interno.

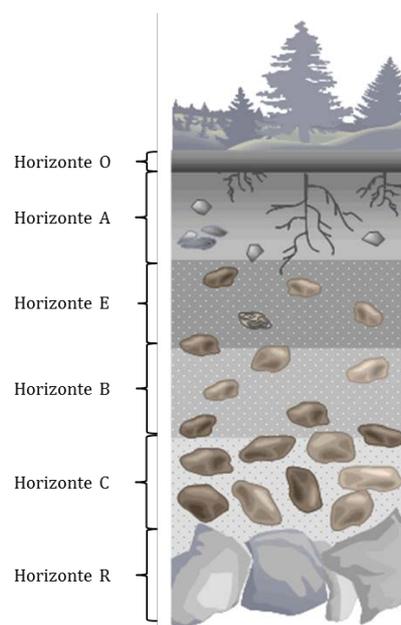


Figura 2.1.- Detalle de los horizontes del suelo (Miller, 1994; Jaramillo, 2001)

El horizonte más superficial, denominado *Horizonte O*, es la capa orgánica formada (o en formación) por una acumulación de materia orgánica depositada en la superficie del suelo. Contiene por lo menos del 20% al 30% de materia orgánica, y su composición depende del tipo de vegetación del que provenga la materia orgánica. Sólo puede formarse en ausencia de aire, cuando los suelos están continuamente anegados.

En la siguiente capa, *Horizonte A*, se encuentran los minerales y la materia orgánica en distintos estados de descomposición procedentes de vegetales y animales que se incorporan al suelo. La importancia de éste, es que mejora la textura y estructura del suelo, aumentando así su capacidad de retener agua y reducir los cambios en el pH. Además sirve como reserva de materiales nutritivos en el suelo propiciando la presencia de microorganismos.

El siguiente horizonte, llamados *Horizonte E y B*, son unas capas en que las partículas minerales se han concentrado con el decurso del tiempo; mientras que el *Horizonte C*, es la cuarta capa del suelo, siendo una fase mineral de material no consolidado a partir del cual se ha desarrollado el suelo. También se incluyen aquí los materiales gravosos y pedregosos de fondo.

La capa más profunda de las que forman el suelo es el *Horizonte R o roca madre*. Es la capa que da origen a los demás horizontes. Se trata de una capa de roca continúa endurecida que no ha sufrido alteraciones químicas o físicas.

De todos los horizontes, se consideran influyentes, desde el punto de vista microbiológico, solamente el C y R, puesto que de ellos se extrae el árido que compone el hormigón. La carga microbiológica potencial aportada por el árido es muy limitada ya que las condiciones de humedad y nutrientes disponibles hacen muy rara y escasa cualquier forma de vida.

Los microorganismos que potencialmente pueden provenir de los áridos (vía endógena) son básicamente bacterias, hongos y algas. En el suelo y por lo tanto en los áridos provenientes de él, podemos encontrar todo tipo de **bacterias**, desde autotróficas, heterotróficas hasta aeróbicas y anaerobias. En cuanto a la presencia de los **hongos**, cientos de especies se encuentran en el suelo, generalmente cerca de la superficie donde prevalece una condición aerobia. Por lo que no será frecuente que los hongos presentes en el hormigón tengan su origen en el árido puesto que éste proviene de capas profundas donde no se dan condiciones aerobias. Asimismo, las **algas verdes y diatomeas** pueden estar presentes en los áridos, pero solamente en los que están a nivel superficial ya que necesitan luz para llevar a cabo la fotosíntesis.

La *contaminación microbiológica exógena* es la vía de contaminación más importante. La mayoría de microorganismos patógenos presentes en el hormigón provienen de suciedad originada por la actividad desarrollada en la edificación o por el ambiente en el que se encuentra. Por lo tanto, muchas de las edificaciones y estructuras realizadas con hormigón están en contacto con sustancias con una potencial carga microbiológica, como pueden ser el suelo, agua, aguas residuales, comida, productos agrícolas, etc. y esto hace posible que un microorganismo colonice dichas construcciones (Cwalina. B, 2008). Parte de esta población microbiológica puede interactuar de diferentes maneras en función de los materiales minerales y en algunos casos teniendo consecuencias negativas para la estructura, a este proceso se le denomina biodegradación

o biodeterioro del hormigón. Las estructuras que suelen padecer más este tipo de degradación son las estructuras marítimas, puentes, tanques, silos, tuberías, torres de refrigeración entre otras.

Por otro lado, la presencia de microorganismos en el hormigón es un factor esencial a tener en cuenta en industrias en las que se quiere mantener el nivel de asepsia (Flanigan, 1997, Gabrio et al., 2003), independientemente de que esta presencia no condicione la durabilidad de la estructura de hormigón.

2.2.2. Factores influyentes en el desarrollo microbiano en el hormigón

Los factores que intervienen en el desarrollo microbiológico en el hormigón se pueden clasificar en dos categorías, *factores internos* y *factores externos*. En la Figura 2.2 se presentan los factores influyentes en el desarrollo microbiano en el hormigón.

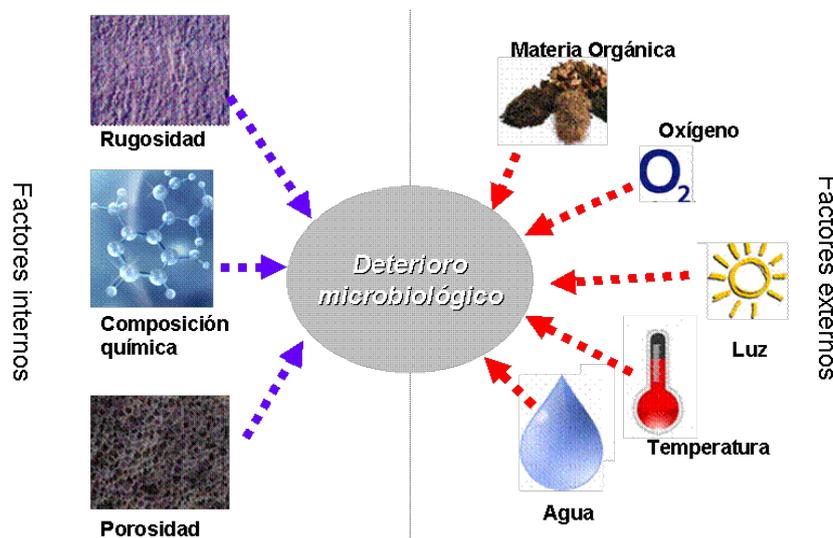


Figura 2.2.- Principales factores influyentes en deterioro del hormigón (Elaboración propia)

Los *factores internos* (Figura 2.2) son los que vienen determinados por la propia naturaleza del hormigón, la **rugosidad**, la **porosidad** y la **composición química** (Guillite y Dreesen, 1995; Gaylarde, 2001; Tiano, 2002; Barberousse et al., 2007; De Belie, 2010). En primer lugar, la rugosidad es el parámetro que determinará la adhesión de los microorganismos a la superficie del hormigón y su colonización. En segundo lugar, la porosidad determinará la capacidad del hormigón para albergar los microorganismos, agua, O_2 , así como los nutrientes necesarios. Y por último, la composición química, que establecerá la disponibilidad de nutrientes orgánicos o inorgánicos disponibles para la población microbiana y por lo tanto, determinará qué tipo de microorganismos podrán estar presentes en función del pH, álcalis, contenido de calcio, presencia de O_2 , etc. En el Anejo 1, *Información general de microorganismos*, se detallan las diferentes clasificaciones de microorganismos en función de los parámetros que determinan su presencia.

La **rugosidad** determina la velocidad de adhesión y la colonización (esporas) de los microorganismos sobre el material. Cuanto mayor sea la rugosidad del soporte mayor será la posibilidad de que el hormigón sea ocupado y cubierto por una población microbiana, debido a la mayor superficie de contacto del hormigón.

La **porosidad** del hormigón viene determinada por la relación agua/cemento (relación a/c), la porosidad propia del árido y la ejecución del mismo (Metha, 2006). La Figura 2.3a y b muestra dos fotografías de hormigón realizadas con lupa binocular, en las que se puede apreciar que aunque el hormigón parezca un material compacto y con una matriz cerrada, su microestructura es porosa y gracias a esta porosidad los microorganismos pueden fijarse a este sustrato, tal y como se puede observar en la Figura 2.3b, donde se observa una superficie de hormigón colonizado por algas.

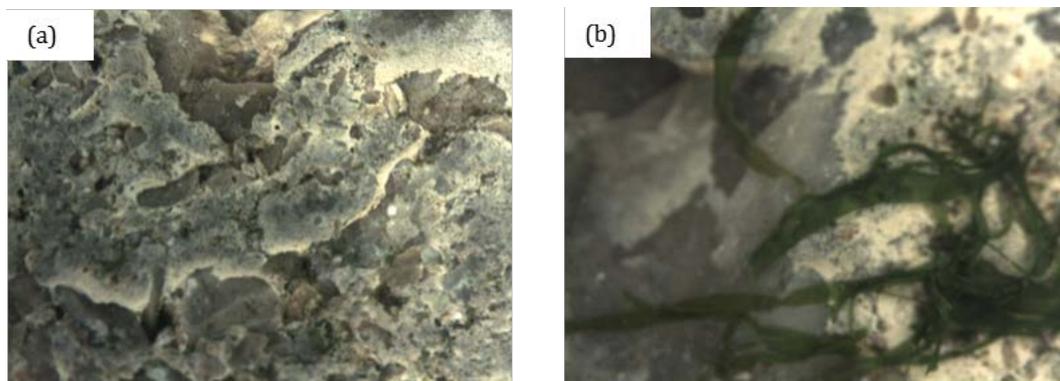


Figura 2.3.- (a) Porosidad superficial del hormigón y (b) Algas fijadas sobre el hormigón (Elaboración propia).

Tal y como se ha descrito en numerosos estudios (Neville, 1977; Fernández Canovas, 1999; Metha, 2006), la *relación a/c* influye de manera muy importante en la porosidad del hormigón, ya que el excedente de agua que no reaccione con el cemento se evaporará, creando una red capilar y provocando una porosidad superficial mayor.

La *porosidad de los áridos* es un factor influyente en menor medida ya que la mayor parte de la permeabilidad y porosidad del hormigón se produce en la pasta de cemento. A pesar de ello, se debe tener en cuenta que el árido representa entre el 60% - 75% del volumen del hormigón, y por lo tanto tendrá, en mayor o menor medida, influencia en la porosidad del hormigón (Portland Cement Association, 2002).

La influencia sobre la porosidad de la *ejecución del hormigón* y su consistencia es clara, debido a que, en función de los medios mediante los cuales se realice el proceso de hormigonado, la cantidad de aire ocluido en la matriz del hormigón variará en gran medida.

Por su parte, la **composición química** del hormigón determina la disponibilidad de nutrientes inorgánicos para los microorganismos existentes. Los componentes del hormigón que pueden ser metabolizados por determinados microorganismos son el

hidróxido de calcio, carbonato de calcio, compuestos de azufre, y algunas sales de magnesio, manganeso y hierro.

El hidróxido de calcio y el carbonato de calcio reaccionan con los ácidos generados por numerosos microorganismos provocando la formación de sales solubles y una disminución del pH del hormigón, lo que provoca la disolución de la matriz de éste. Estos ácidos pueden ser generados por bacterias (*Achromobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Thiobacillus*, etc.) y por hongos (*Aspergillus*, *Cerastostella*, *Fusarium*, *Penicillium*, etc.). En cuanto al magnesio, manganeso y el hierro son elementos que pueden ser metabolizados por algunas bacterias aunque esto sucede en un número de casos mucho menor.

Los *factores externos* o ambientales señalados en la Figura 2.2, corresponden a factores independientes a la naturaleza del hormigón, tales como, temperatura, oxígeno, CO₂, luz, materia orgánica y presencia de humedad (Saad, 2001). La influencia de cada uno de estos factores en el desarrollo microbiológico está ampliamente explicada en el Anejo 1: *Información general sobre microorganismos*.

2.3. BIODEGRADACIÓN DEL HORMIGÓN

La degradación microbiológica del hormigón es un proceso que se produce de forma natural ya que su composición y estructura, lo hacen susceptible de ser deteriorado por bacterias, cianobacterias, hongos y algas. Se entiende por biodegradación al cambio indeseable en las propiedades del hormigón debido a la actividad de uno o más microorganismos (Hueck, 1968). Estos cambios pueden ser (Warscheid et al. 1991):

- Decoloración
- Incremento de la rugosidad
- Alteración de la estructura/porosidad
- Incremento de la absorción
- Pérdida de peso

Según Gaylarde (Gaylarde, et al. 2003; Allsopp, 2006), la biodegradación microbiológica del hormigón se puede clasificar en **estética, química y física o mecánica**. Estos procesos de deterioro pueden ocurrir de forma separada o simultánea, dependiendo de las condiciones ambientales de temperatura, humedad, presencia de CO₂, presencia de nutrientes, etc., que se den.

Por orden cronológico, el primer deterioro en aparecer es el **estético**. Se entiende por deterioro estético cuando la superficie del material es ocupada por microorganismos, vivos o muertos, provocando una alteración estética del mismo. Un ejemplo claro de contaminación estética es la formación de *biofilm*.

El término *biofilm*, hace referencia a la estructura porosa adherida a la superficie del hormigón, formada por células microbiológicas, activas y no activas, y metabolitos de microorganismos (ácidos y varios polímeros) (Saad, 2004). La formación de un biofilm es el primer paso de cualquier biodegradación, puesto que los microorganismos utilizan esta capa como medio para fijarse al sustrato además de ser una fuente de agua y de nutrientes. Otras de las funciones del *biofilm* es proteger a la población microbiana frente a cambios de temperatura, humedad y pH. Debido a su capacidad de intercambio de iones, resiste la penetración de algunos biocidas, antibióticos y detergentes, impidiendo de este modo el control de la contaminación microbiológica (Warscheid, 1996).

Tal y como se ve en la Figura 2.4^a, el proceso de formación del biofilm comienza por la fijación del microorganismo en el sustrato. Posteriormente, y gracias al metabolismo de éstos se va creando una capa de material orgánico que va cubriendo la superficie del hormigón (colonización). En la fase de crecimiento, tanto los microorganismos colonizadores como otros nuevos, encuentran las condiciones ideales para su desarrollo y crecimiento. La Figura 2.4b muestra una imagen de biofilm formado por algas.

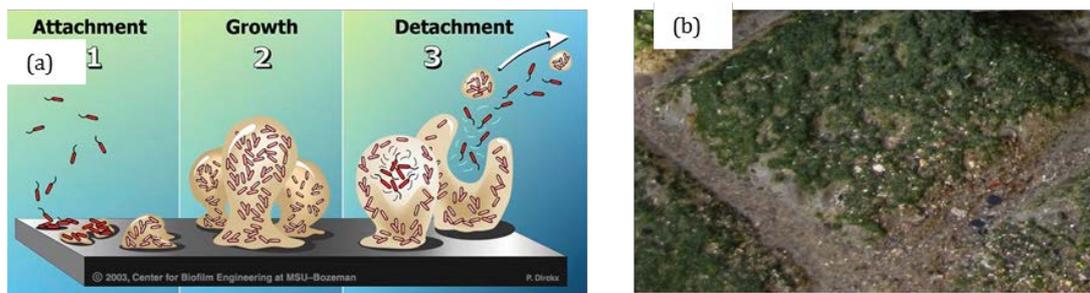


Figura 2.4.- (a) Proceso de formación del biofilm (Center for Biofilm Engineering, 2003) y (b) Hormigón cubierto por biofilm (Elaboración propia)

Aparte de la formación de los biofilms, otro de los casos de biodegradación estética más estudiados es la aparición de manchas oscuras en morteros y estucos de revoco provocados por el crecimiento de hongos (*Penicillium sp.* y *Uloclodium sp.*) y algas. Este proceso solamente sucede cuando las condiciones de temperatura y humedad son propicias para el crecimiento de dichos organismos. En el caso que las condiciones no sean propicias, los hongos crean esporas que se fijan al hormigón en estado de latencia esperando a que las circunstancias sean favorables (Puterman y Becker, 2000). Por último cabe remarcar que la biodegradación estética no supone ninguna pérdida en las prestaciones mecánicas del hormigón.

El siguiente proceso de biodegradación en aparecer es el **deterioro químico**, el cual provoca daños al hormigón o mortero debido al metabolismo de los microorganismos. Este tipo de daño es de los más estudiados debido a sus repercusiones en la durabilidad del hormigón. La biodegradación química la podemos dividir en: asimilativa y disimilativa.

En el caso de la biodegradación química *asimilativa*, los microorganismos utilizan componentes del hormigón como nutrientes, mientras que en el caso de la biodegradación química *disimilativa* utilizan nutrientes externos al hormigón excretando sustancias nocivas para éste. Los principales compuestos responsables de la biodegradación bioquímica son: ácidos orgánicos biogénicos, dióxido de carbono biogénico, ácido nítrico biogénico y ácido sulfhídrico y ácido sulfúrico biogénico. En la Tabla 2.1 se presentan las reacciones que originan estos ácidos sobre el hormigón y los productos derivados.

Reactivos	Microorganismo responsable	Producto
<i>Ácidos orgánicos biogénicos</i>		
$\text{Ca(OH)}_2 + 2 \text{C}_2\text{H}_4(\text{OH})\text{COOH} + 3\text{H}_2\text{O}$ (ácido láctico)	Microorganismos fermentativos	$\text{Ca}[\text{C}_2\text{H}_4(\text{OH})\text{COO}]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (lactato de calcio)
$\text{Ca(OH)}_2 + 2\text{CH}_3\text{COOH}$ (ácido acético)	Microorganismos fermentativos	$\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
<i>Dioxido de carbono biogénico</i>		
$\text{Ca(OH)}_2 + 2 \text{CO}_2$		$\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$
$\text{CaCO}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$		$\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$
<i>Ácido Nítrico biogénico</i>		
$2\text{NH}_4^+ + 3 \text{O}_2$	Nitrosomonas	$2\text{NO}_2^- + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{H}^+$
$2\text{NO}_2^- + \text{O}_2$	Nitrobacter	2NO_3^-
$\text{Ca(OH)}_2 + 2\text{HNO}_3$		$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{H}_2\text{O}$
<i>Ácidos sulfhídrico y sulfúrico biogénicos</i>		
$\text{SO}_4^{2-} + 2\text{H} + 4\text{H}_2$	Bacterias sulforeductoras	$\text{H}_2\text{S} + 4\text{H}_2\text{O}$
$\text{H}_2\text{S} + 2 \text{O}_2$		H_2SO_4
$\text{Ca(OH)}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$	Bacterias sulfooxidantes	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
$3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{CaSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O} + 3(\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) + \text{H}_2\text{O}$		$3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{CaSO}_4 \cdot 32\text{H}_2\text{O}$ (etringita)

Tabla 2.1.- Reacciones producidas en la biodegradación química del hormigón (Cwalina et al., 2002).

Los ácidos orgánicos biogénicos proceden en la mayoría de los casos de procesos de fermentación provocados por microorganismos fermentativos. Los ácidos más comunes son el ácido láctico, acético y en menor medida, ácido butírico, tal y como se señala en la Tabla 2.1. El efecto nocivo de los ácidos depende de la agresividad de los mismos. Las sales resultantes de estos ácidos (lactato, acetato y butirato) son solubles en agua pudiendo ser disueltos. En el caso de que los áridos que componen el hormigón, sean de origen calizo o dolomítico, estos ácidos pueden provocar un proceso de disolución muy similar al producido en la pasta de cemento. El primer efecto perceptible de este ataque es la disminución del pH del hormigón llegando a unos niveles incluso inferiores a 5,

provocando una reducción en la resistencia del hormigón (*Wazny et al., 1980; Paajanen et al., 1995; Davis et al., 1998*).

La agresividad de algunas aguas y suelos es provocada por la presencia de *dióxido de carbono* originado por microorganismos presentes en estos ambientes. El dióxido de carbono reacciona formando ácido carbónico, este ácido a su vez, reacciona con el hidróxido de calcio formando hidrogeno carbonato de calcio. Este compuesto es soluble y por lo tanto es fácilmente lavado del hormigón. En la citada Tabla 2.1 se representan las reacciones que tienen lugar en este proceso de ataque ácido.

El amoníaco presente en algunas aguas provoca la corrosión causada por el *ácido nítrico* biogénico. Las urobacterias metabolizan la urea convirtiéndola en amoníaco y este a su vez es metabolizado por las bacterias de los géneros *Nitrosomas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospiras* transformándolo en ácido nitroso. Este ácido nitroso es oxidado por las bacterias *Nitrobacter* y *Nitrococcus* produciendo ácido nítrico. Este ácido reacciona con los compuestos de calcio presentes en el hormigón endurecido generando compuestos solubles, que pueden ser fácilmente disueltos en agua (*Allan M.L., 1999*) (ver Tabla 2.1). En numerosos estudios se ha podido demostrar que la degradación del hormigón y de otros materiales de construcción minerales es debida a la presencia de bacterias (*Kaltwasser H., 1976; Sand et al., 1991; Monteny, 2000*).

El *ácido sulfhídrico biogénico* es el producto del metabolismo de bacterias sulforeductoras (*género Desulfovibrio*) presentes en zonas anaerobias del suelo y sobretodo, en aguas residuales, este proceso es representado en los estadios 1 y 2 de la Figura 2.5, en la que se representan los estadios que se dan durante el proceso de biodegradación por la generación de ácido sulfhídrico. La presencia de ácido sulfhídrico es la razón de la corrosión del hormigón de las tuberías de hormigón que conducen aguas residuales.

Este fenómeno se da normalmente en tuberías con ventilación insuficiente y con reducidos caudales (*Fagerlund et al., 1997; Roberts et al., 2002*). El ácido sulfhídrico es metabolizado por bacterias sulfooxidantes (*género Thiobacillus*) generando *ácido sulfúrico* (ver estadios 3 y 4 de la Figura 2.5). El ácido sulfúrico reacciona con el hidróxido de calcio formando etringita, yeso y en algunos casos taumasita (*Eriksen et al., 2003; Jana et al., 2005*).

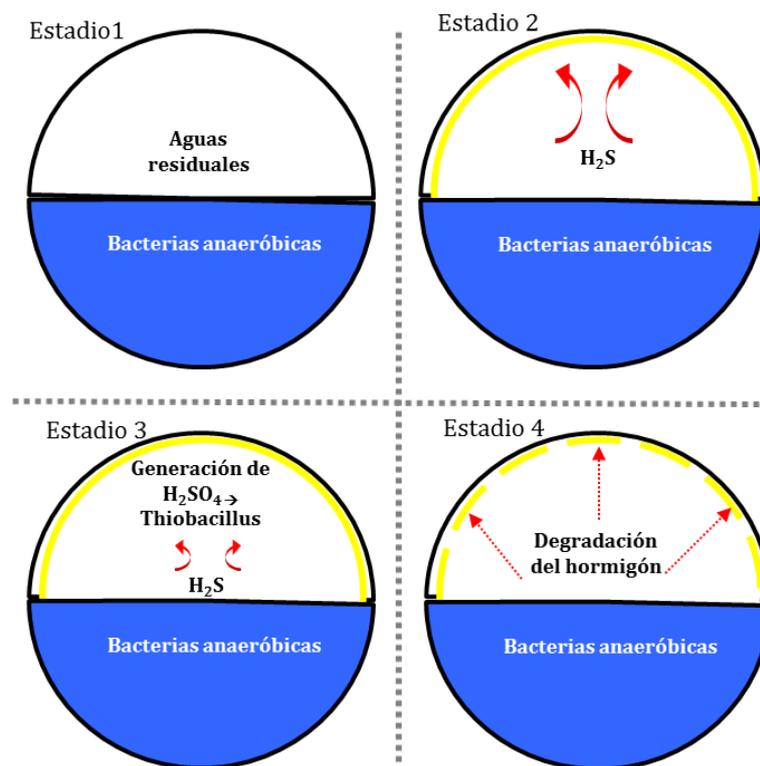


Figura 2.5.- Estadios del proceso de biodegradación por ácido sulfúrico biogénico

En la Figura 2.6a se puede observar claramente que la zona afectada por *Thiobacillus thiooxidans* es la zona que no cubre el agua, debido a que dichas bacterias metabolizan el ácido sulfhídrico (H₂S) en estado gaseoso que hay en la bóveda de la tubería. Tal y como se observa en la Figura 2.6a la zona afectada ha perdido gran parte del mortero presente en la superficie interna del tubo, dejando el árido visto, provocando unas mayores pérdidas de carga en el tubo y por lo tanto mermando las prestaciones hidráulicas del tubo al verse aumentado el coeficiente de Manning.

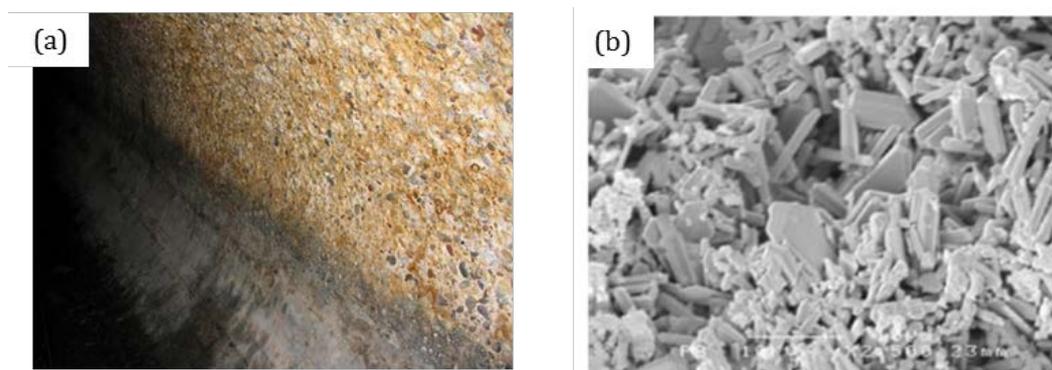


Figura 2.6.- (a) Detalle del interior tubería de hormigón degradada por *Thiobacillus thiooxidans* y (b) Cristales de yeso en el hormigón formados por el ácido sulfúrico segregado por *Thiobacillus thiooxidans* (Welton et al, 2005).

En la Figura 2.6b, se pueden observar los cristales de yeso formados durante este proceso. El proceso de formación de estas sales supone un aumento en el volumen

respecto al volumen inicial, provocando unas tensiones en el interior del hormigón produciendo fisuras y la posterior desintegración del mismo (Monteny J., 2000) (ver tabla 2.1, anteriormente presentada).

Si bien el mayor número de microorganismos perjudiciales para el hormigón son bacterias, como se aprecia en la Tabla 2.2, hay algunos causados por hongos, como es el caso del *Aspergillus*. Este hecho hace importante que a la hora de valorar posibles soluciones a este proceso degenerativo del hormigón se tenga en cuenta que no sólo deben usarse soluciones que sean eficientes contra las bacterias. Por otra parte, es importante destacar que los mismos microorganismos capaces de degradar materiales cementicios (mortero y hormigón) también puedan degradar materiales tan diferentes como los ladrillos (compuestos de arcillas) o materiales pétreos (ver Tabla 2.2).

Proceso bioquímico	Material	Microorganismos involucrados
Oxidación $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$	Piedra, ladrillos, hormigón, mortero	Bacteria: <i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrosococcus</i> , <i>Nitrospira</i> , <i>Nitrosolobus</i>
Oxidación $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$	Piedra, ladrillos, hormigón, mortero	Bacteria: <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrococcus</i>
Reducción $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	Piedra, ladrillos, hormigón, mortero	Bacteria: <i>Escherichia</i> , <i>Pseudomonas</i>
Reducción $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NH}_4^+$	Hormigón	Bacteria: <i>Clostridium</i>
Reducción $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$	Piedra, ladrillos, hormigón, mortero	Bacterias sulforeductoras: <i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfotomaculum</i> , <i>Desulfomonas</i>
Oxidación H_2	Ladrillos, hormigón, mortero	Bacterias: <i>Alcaligenes</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Desulfovibrio</i>
Oxidación S Inorgánico $\rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$		Bacterias sulrooxidantes: <i>Acidithiobacillus</i> , <i>Thiobacillus</i> , <i>Sulfobacillus</i> , <i>Sulfolobus</i>
Oxidación $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$	Piedra, ladrillos, hormigón, mortero	Bacteria: <i>Crenothrix</i> , <i>Gallionella</i> , <i>Leptothrix</i> , <i>Sphaerotilus</i> , <i>Sulfobacillus</i> , <i>Acidithiobacillus ferroxidans</i>
Oxidación $\text{Mn}^{2+} \rightarrow \text{Mn}^{3+}$	Piedra, ladrillos, hormigón, mortero	Bacteria: <i>Bacillus</i> , <i>Gallionella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sphaerotilus</i>
Procesos fermentativos	Piedra, ladrillos, hormigón, mortero	Bacteria: <i>Achromobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> Hongo: <i>Aspergillus</i> , <i>Ceratostomella</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Hormoconis</i> , <i>Hormodendrum</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Spicardia</i> , <i>Trichosporon</i>

Tabla 2.2.- Procesos bioquímicos responsables de la biodegradación (Cwalina et al., 2002).

El **deterioro físico o mecánico** se da cuando el material se destruye por el crecimiento o motilidad de microorganismos. En la mayoría de los casos la biodegradación mecánica del hormigón es la consecuencia del biodeterioro químico, ya que tanto el deterioro de la superficie y la fisuración del hormigón, como el desprendimiento de material son la consecuencia de la acción, mayoritariamente, de los ácidos provenientes del metabolismo microbiológico. Un ejemplo claro de ello es la biodegradación del hormigón por líquenes (unión simbiótica entre hongo y alga).

En el estudio llevado a cabo por Rosato y Traversa (1998) se desarrolla un método a través del cual se determina los daños producidos por líquenes en un hormigón de presas así como la distribución de cada uno de los líquenes en toda la superficie de la presa. En este estudio queda constancia de que cada una de las especies de líquenes se distribuye en función de la humedad relativa y que son microorganismos que pueden biodegradar el hormigón químicamente mediante el efecto del ácido oxálico proveniente de su metabolismo y mecánicamente mediante la penetración de las hifas del hongo a través de la matriz del hormigón.

En la figura 2.7a y b se muestra una imagen donde se observan líquenes en el hormigón. En primera instancia es solamente un problema estético (ver figura 2.7a), pero conforme va pasando el tiempo y el liquen se va desarrollando, este problema se convierte en mecánico (ver figura 2.7b), ya que este desarrollo hace que la superficie del hormigón sobre la cual ha crecido el liquen, se vea claramente afectada.

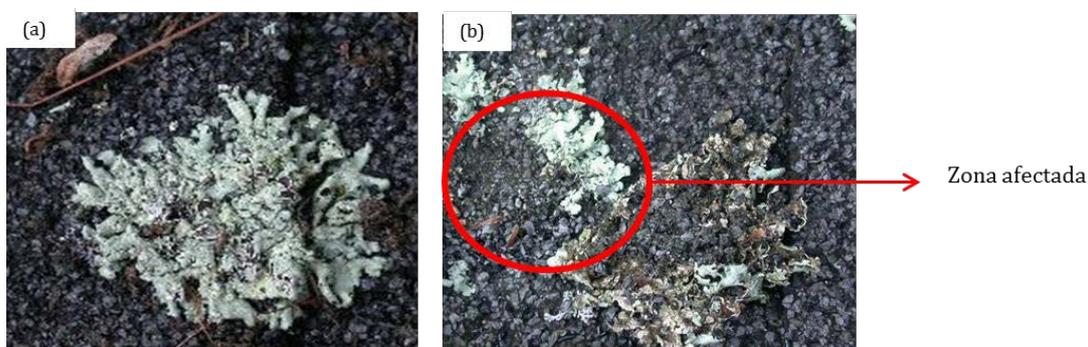


Figura 2.7.- Imagen de líquenes en el hormigón (www.inspectapedia.com, 2009)

Otro caso similar es el que provocan algunas algas que absorben calcio, silicio y magnesio, provocando una serie de cavidades en el interior del hormigón y éstas a su vez derivan en pequeñas fisuras en la superficie del mismo, provocando una reducción considerable de las resistencias y mermando la durabilidad del material, sobre todo a los ciclos de hielo deshielo.

2.4. CONTAMINACIÓN MICROBIANA

Los microorganismos presentes en el hormigón, aparte de provocar problemas de biodegradación, pueden ser también responsables de la contaminación del ambiente en el

que se encuentran. El hormigón, al poder albergar en su interior microorganismos, esporas, células muertas y toxinas microbianas (endotoxinas y micotoxinas), puede provocar procesos alérgicos y enfermedades a los habitantes o usuarios de la construcción (Flannigan, 1997, Gabrio et al, 2003). Por lo tanto se puede considerar que en determinadas circunstancias el hormigón puede ser un foco de contaminación.

En la Figura 2.8 se representa el posible ciclo de una contaminación originada en el hormigón. En el primer estadio, se puede observar el hormigón, en su estado original es un medio limpio y libre de microorganismos, pero al ser una estructura porosa puede llegar a contaminarse debido a las condiciones ambientales, de uso o a la actividad realizada en su proximidad, tal y como se muestra en el estadio 2. Esta contaminación compuesta, normalmente, por materia orgánica, agua y microorganismos, se alberga en la matriz porosa del hormigón, y a pesar del proceso de limpieza superficial convencional no se logra eliminar la contaminación interna. En el último estadio del proceso, representado en la Figura 2.8, se observa que la carga microbiológica albergada en el interior del hormigón puede contaminar el ambiente exterior, siempre que las condiciones del ambiente sean favorables.

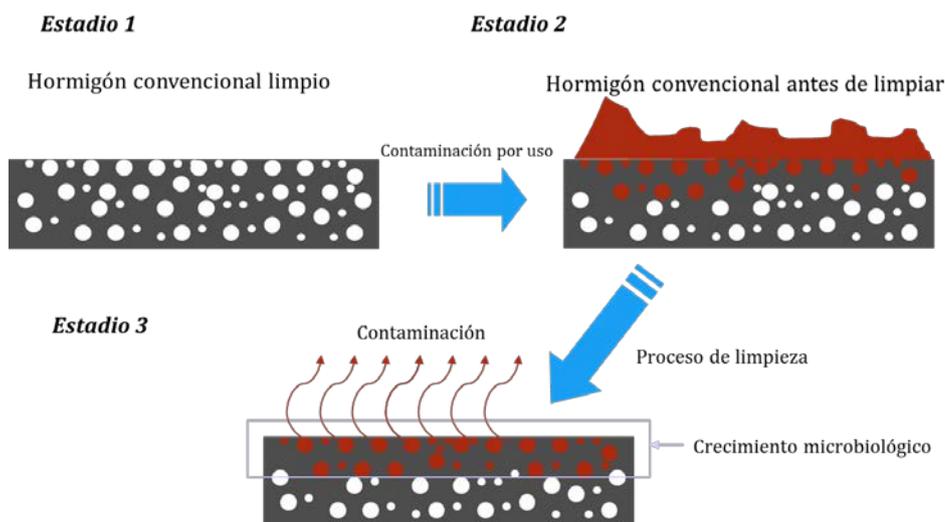


Figura 2.8.- Proceso de contaminación microbiana con origen en el hormigón (Elaboración propia)

Unos de los estudios que pone de manifiesto la estrecha relación que hay entre el estado microbiológico de un alimento, animal, estructura, etc. y el estado microbiológico del ambiente en el que se encuentra, es el realizado por Sánchez en unas instalaciones de procesamiento cárnico. El citado estudio consistió en tomar muestras de las canales y de las superficies que entraban en contacto con ellas, realizando posteriormente cultivos microbiológicos de bacterias aerobias y Enterobacterias. Los resultados obtenidos demostraron que hay una gran correlación entre la contaminación que existe en una superficie de un matadero, de forma previa a la matanza, y el estado microbiológico final de las canales, siendo esta relación más íntima en el caso de las Enterobacterias (Sánchez, 2006).

Por otra parte, hay estudios en los que se evalúan diversos agentes químicos como medio de desinfección. Este es el caso del estudio experimental realizado en Méjico en el que se estudiaron las propiedades bactericidas de un hormigón en el que se había añadido un agente **bacteriostático** (no tóxico para los seres humanos o animales). Con este hormigón se construyó una granja avícola, construcción en la cual es de vital importancia mantener las condiciones de higiene para evitar la pérdida de rentabilidad de la explotación. La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó en especímenes de hormigón convencional y en hormigón antimicrobiano. Los especímenes se sometieron a medios de cultivo de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* durante 24 horas a 37° C aplicando el método de Kirby Bauer (Rodríguez, 2000). Este método se utiliza para demostrar la efectividad de los agentes antimicrobianos y determinar su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Según los resultados obtenidos, el crecimiento de estas bacterias indicadoras fue prácticamente nulo.

De forma análoga al estudio anterior, se encuentra un estudio en el que se evalúa la efectividad de la isotiazolina/carbamato y del nitrofurano como agentes **antifúngicos**. Las pruebas realizadas constaron en añadir estos productos en diferentes proporciones a un mortero y comprobar que éstos actuaban de la forma esperada respecto al hongo estudiado, *Aspergillus niger*, además de comprobar si tenía algún efecto sobre las propiedades físicas del mortero (resistencia a compresión, a tracción, consistencia). Según los resultados sólo el isotiazolina/carbamato presenta actividad antifúngica en el mortero en la proporción de 5% sobre peso de cemento (spc), sin perjudicar de manera significativa a las propiedades físicas (Jeongyun et al. 2004).

2.4.1. Situación actual en la desinfección en la industria

Una vez definidas las razones que hacen que el hormigón pueda albergar una población microbiológica en su matriz y enumeradas algunas investigaciones en las que se estudian agentes químicos para la desinfección del hormigón se hace necesario realizar una revisión sobre la situación actual en la desinfección en la industria.

Se entiende por desinfección como el proceso mediante el cual se eliminan los microorganismos infecciosos de un medio dado, a través del uso de agentes químicos o físicos, que reciben el nombre de desinfectantes, definiéndose éstos, como los agentes que eliminan las fuentes de infección. Generalmente se trata de un producto químico, aunque también puede tratarse de un agente físico o biológico que destruye los microorganismos patógenos, aunque no necesariamente las esporas.

Es importante aclarar los diferentes niveles de higiene que se pueden alcanzar tras un proceso de limpieza, ya que no se debe confundir el concepto **microbiostasis** o el de **tratamiento de conservación con desinfección**. Se denomina microbiostasis a la condición en la que el crecimiento o la multiplicación de un determinado microorganismo es inhibido, mientras que el tratamiento de conservación es el proceso mediante el cual se reduce la población microbiana hasta un nivel determinado. En la Figura 2.9 se presentan

gráficamente los conceptos anteriormente definidos, en ella se observa la evolución del número de células a lo largo del tiempo.

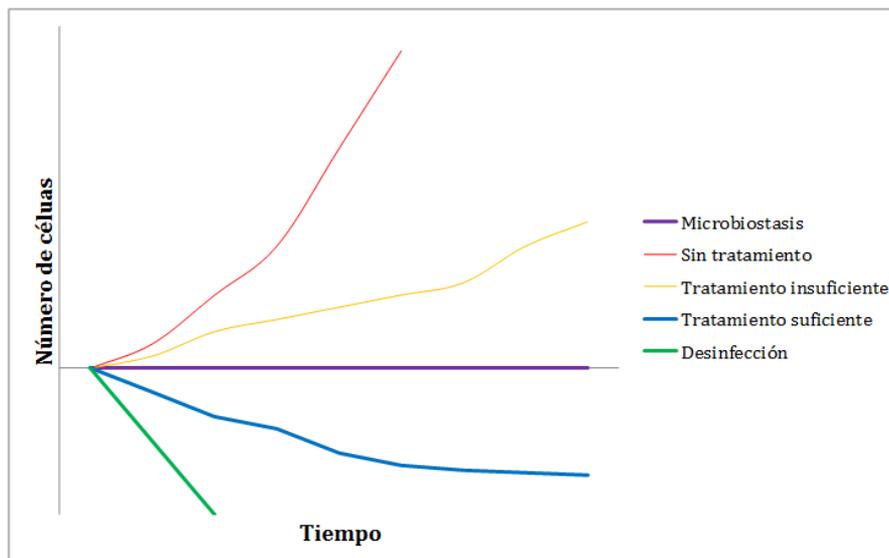


Figura 2.9.- Representación gráfica de la evolución de crecimiento microbiano (Kraisty, 2012)

La desinfección es un proceso cada vez más complejo y su interés abarca un amplio abanico de ámbitos, desde la sanidad humana hasta la sanidad animal, higiene en los procesos productivos, en la industria de la alimentación humana y animal, restauración y conservación de estructuras. Este proceso tendrá en un futuro próximo un papel más importante en la lucha contra los agentes de infección, sea cuál sea el ámbito, lo que hará que se deba mejorar cada vez más esta herramienta en función de los avances científicos, la evolución de las industrias agrícolas y ganaderas y la conciencia social.

A pesar del gran número de desinfectantes disponibles en el mercado se ha de tener en cuenta que muchos de los posibles desinfectantes deben desestimarse por su actividad residual, por lo que el número de agentes con posibilidad de ser utilizados queda bastante restringido. A lo largo del tiempo los agentes desinfectantes han ido evolucionando, aumentando su eficacia y reduciendo su agresividad.

En la Figura 2.10 se presenta el orden cronológico de la aparición de los agentes desinfectantes, en la que se puede observar las diferentes familias de desinfectantes químicos, empezando por las sales de mercurio orgánico en la década de los 70 y hasta los compuestos libres de halógenos actuales.

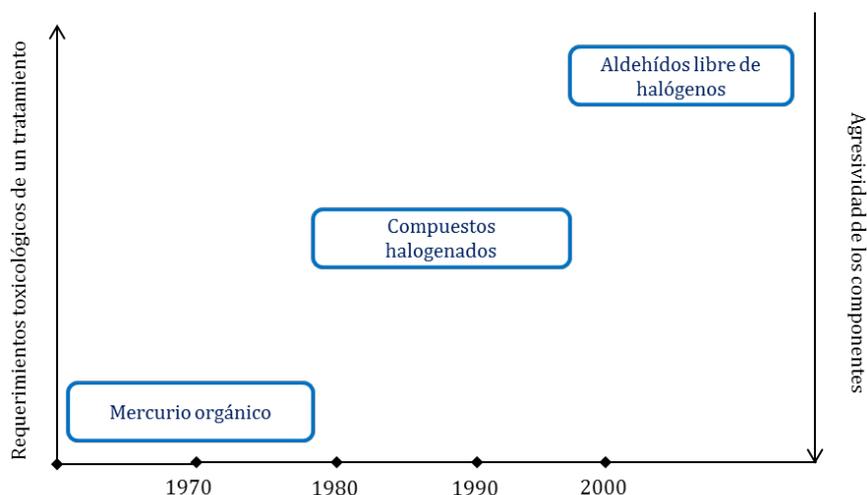


Figura 2.10.- Orden cronológico de aparición de los agentes desinfectantes (Kraitsy, 2012)

En la sanidad animal los desinfectantes utilizados son productos antimicrobianos o biocidas relativamente potentes y generalmente tóxicos, que se aplican de manera superficial en las zonas contaminadas. En la industria agroalimentaria los productos utilizados son generalmente menos tóxicos y menos concentrados. En medicina humana, la desinfección hospitalaria alcanza todos los aspectos relativos al enfermo, desde quirófanos a almacenes y por supuesto material quirúrgico.

Cabe mencionar que la eficacia de un desinfectante contra un determinado microorganismo vendrá determinada por factores como la concentración, tiempo de contacto, temperatura y humedad de trabajo.

Hoy en día, gracias a los adelantos en la química, bioquímica y microbiología se empiezan a conocer de manera más profunda tanto los mecanismos de acción de los desinfectantes como la propia etología de los propios microorganismos y ya se dispone de una metodología definida de desinfección. Esta metodología cambia de manera constante, según evolucionan las tecnologías, las implicaciones políticas y medioambientales.

Los procesos de desinfección más comúnmente empleados son los realizados a través de **medios químicos** y **medios físicos**. A continuación se indicarán las principales características de cada uno de estos procesos de desinfección, si bien en el **Anejo 2** se amplía la información referente a la desinfección, tanto por medios químicos como físicos.

La *desinfección química* se basa en la aplicación de productos químicos cuya función es la de inhibir o retardar el crecimiento microbiano. El nombre genérico que reciben los desinfectantes químicos es biocida y engloba a los fungicidas, alguicidas y bactericidas. Para que un biocida se puede considerar válido debe cumplir una serie de requisitos:

- Amplio espectro de acción
- Largo periodo de actividad

- Insoluble en agua (para evitar su lixiviación)
- No debe afectar a las características del sustrato
- No tóxico para humanos, animales o vegetales
- Ser económicamente viable

El mecanismo de acción de los agentes químicos de desinfección se basa en atacar alguna estructura o algún proceso vital del microorganismo. En la Tabla 2.3 se presenta un resumen en el que se presentan los puntos de acción de los microorganismos donde actúan los diferentes tipos de desinfectante químicos.

Agente	Pared celular	Membrana celular	Proteínas	Á. nucleicos	Enzimas grupos SH	Aminoácidos
Ácidos inorgánicos		+	+		+	
Alcoholes		+	+		+	
Álcalis		+	+		+	
Agentes quelantes		+		+	+	+
Biguanidas		+				
Colorantes				+		
Halógenos		+			+	+
Metales pesados			+		+	
Fenoles	+	+	+			
DAQ		+	+			

Tabla 2.3.- Tabla resumen de los puntos de acción de los agentes químicos

Las familias de desinfectantes químicos más utilizadas las podemos clasificar en dos grandes grupos en función de su mecanismo de acción, en primer lugar los **agentes electrofílicos** y en segundo lugar las **sustancias activas de membrana**.

Los *agentes electrofílicos* basan su acción en la capacidad de interacción de sus grupos funcionales con los grupos amino y tiol de las células microbianas. Dentro de este grupo se encuentran tres grandes familias químicas:

- **Aldehídos:** este grupo lo componen formaldehído, compuestos liberadores de formaldehído, glutaraldehído (GDA) y glioxal. Dentro de este grupo el más comúnmente utilizado es el glutaraldehído (GDA). Esta sustancia presenta

actividad frente a virus y bacterias, mientras que frente a hongos su acción es limitada. Cabe remarcar que su eficacia viene determinada por el pH en el que se encuentre el medio, encontrándose su mayor efectividad a pH neutro.

- **Compuestos halogenados activados:** dentro de este grupo se encuentra bromonitropropandiol, cloroacetamida, dibromodicianobutano y dibromonitrilopropianamida. Estos compuestos presentan actividad principalmente frente a bacterias y son altamente reactivos, lo que hace que los efectos sean rápidos pero su efecto no es duradero debido a su volatilidad. Su mecanismo de acción se centra en la inactivación de las proteínas de las células. Debido a sus limitaciones como desinfectante contra hongos y levaduras, suele usarse en combinación con isotiazolinonas.
- **Isotiazolinonas:** los principios químicos más representativos de este grupo son Metil/clorometilisotiazolinona (CIT/MIT), metilisothiazolinona (MIT), benzisotiazolinona (BIT), metilisotiazolinona/benzisotiazolinona (MIT/BIT) y octilisotiazolinona (OIT). Esta es la familia más comúnmente utilizada en muchos procesos de desinfección y de todos sus componentes cabe destacar octilisotiazolinona (OIT), metilisotiazolinona (MIT) y benzisotiazolinona (BIT).

El primero de ellos, OIT es un fungicida de alta eficacia en un rango de pH amplio, mientras que frente a bacterias presenta una actividad débil, su mecanismo de acción se basa en su interacción con los grupos tiol de las proteínas. Por su parte el MIT, es un agente de larga duración que focaliza su larga actividad frente a bacterias en medios alcalinos pero sus prestaciones frente a hongos es débil. Por último, destacar el BIT por la larga duración de su efecto bactericida y su alta estabilidad en pH alcalinos, a pesar de no poder ser empleado como fungicida. Debido a las diferentes prestaciones que presentan los componentes de esta familia como biocidas suelen usarse combinados con el fin de alcanzar un efecto duradero y de amplio espectro.

En cuanto a las sustancias activas de membrana, cabe destacar tres grupos principales:

- **Alcoholes:** dentro de este grupo destacar el bencilalcohol, fenoxietanol. Su uso es moderado debido a la corta duración del efecto debido a su volatilidad.
- **Ácidos lipofílicos débiles:** este grupo está compuesto por ácido sórbico y ácido benzoico principalmente.
- **Sustancias catión-activas:** los agentes químicos que forman este grupo son principalmente el piritionato de sodio, benzalconio y polihexametilen- biguanida. El más usado es el piritionato de sodio debido a su gran efectividad frente a la bacteria *Pseudomonas* especialmente entre pH 4 y 9 e incluso a altas temperaturas,

aunque frente al resto de bacterias su efecto es muy limitado. Su efecto está basado en la interrupción del equilibrio de la membrana celular.

Como alternativa o complemento a los medios químicos, están los **medios de desinfección físicos**. Este tipo de procesos consiste en llevar las condiciones de temperatura, humedad, presión al límite de la supervivencia de los microorganismos y mediante esto poder mantener la población microbiana patógena en unos niveles aceptables.

2.4.2. Impacto medioambiental del proceso de desinfección

La utilización de desinfectantes conlleva unos efectos indirectos sobre el medioambiente. Aunque en la actualidad cada vez está más controlado el vertido de las aguas de limpieza al alcantarillado público y en la mayoría de las empresas se cuenta con equipos de depuración de aguas, el tipo de productos con los que se realizan las operaciones de limpieza pueden tener un gran impacto en la fauna y flora de la zona en la que se ubica la actividad industrial.

Teniendo en cuenta que los productos utilizados en la desinfección tienen la capacidad de eliminar determinados microorganismos, se deben manejar con especial cuidado ya que pueden reducir o eliminar otros organismos si las aguas o residuos procedentes de la limpieza no son gestionados correctamente.

Para que la operación de limpieza sea realizada con la máxima seguridad se debe poseer y tener en cuenta toda la información referente al principio activo empleado como por ejemplo: métodos óptimos de utilización, dosis de utilización, condiciones de utilización adecuadas.

2.5. DETECCIÓN DE LA PRESENCIA MICROBIANA Y SU EFECTO

Una vez detectado un problema de biodegradación, es importante conocer cuál es el microorganismo que lo ha provocado, los efectos que tiene este proceso y las condiciones en las que se ha producido, para ello se necesitan técnicas analíticas de detección. Por otra parte, con el fin de conocer con la mayor exactitud el proceso de degradación producido, hay estudios que definen técnicas de simulación de biodegradación, que intentan recrear este proceso. Estas investigaciones son fundamentales para poder diseñar un sistema de control y protección del hormigón frente a la biodegradación.

2.5.1. Técnicas analíticas de detección

Con respecto a las técnicas analíticas de detección, Koestler (1997), propone la forma de enfocar y analizar los daños sufridos en un material, desglosado en varias etapas:

- **Recopilación de datos:** descripción de los daños, historial de la estructura, condiciones ambientales, propiedades del material. A partir de estos datos se puede predecir qué tipo de microorganismo puede ser la causa del proceso de deterioro, ya que cada tipo o familia de microorganismos crece y se desarrolla en unas condiciones de pH, temperatura, disponibilidad de agua y de nutrientes determinadas (*Warscheid, 1996*).
- **Observaciones no destructivas:** video-microscopía óptica, medición de fotosíntesis, evaluación del contenido de ATP, etc. A través de estos procedimientos se puede determinar el nivel de actividad microbiana.
- **Análisis microscópicos:** microscopia de fluorescencia, microscopio electrónico de barrido, microscopía láser confocal etc. Mediante estas técnicas se puede observar la presencia de microorganismos y los efectos producidos por éstos como pueden ser fisuras, poros, fragmentaciones, etc. La utilización de microscopios electrónicos da una información sobre la morfología de la célula, el material polimérico extracelular y del material inorgánico extracelular, lo que permite la detección del microorganismo. A través de esta técnica también se puede evaluar los daños ocasionados por el agente en el hormigón. Como inconveniente, la observación por microscopía electrónica o de fluorescencia presenta un elevado coste, si bien, hoy en día no se entendería un diagnóstico sin esta técnica.
- **Mediciones bioquímicas:** cuantificación de proteínas, fosfolípidos, pigmentos. Estas cuantificaciones de materiales provenientes del metabolismo informan, de manera indirecta, de la presencia microbiana e incluso del tipo de microorganismo presente.
- **Análisis microbiológicos:** clasificación y caracterización de la microflora. Esta técnica consiste en la extracción de una muestra de material potencialmente contaminado y depositarlo en una Placa de Petri, donde hay una solución apta para la alimentación del microorganismo, siguiendo la normativa ISO/CD 16869 y ISO/FDIS 846 (*Navas et al, 2005*). Dependiendo del microorganismo que se espera encontrar, tanto la solución alimenticia como las condiciones de incubación serán específicas.

Una vez que el microorganismo se haya desarrollado, la identificación se realiza, normalmente, a través de las características morfológicas, usando un microscopio o un análisis de un cultivo puro aislado. La desventaja que presenta esta técnica es que no detecta más que el 10% de los microorganismos existentes, siendo además el tiempo de incubación necesario para determinar el agente sumamente largo en muchos de los casos, de 7 a 10 días para hongos y de más de 21 días para las cianobacterias (*May y Lewis, 1998*).

Uno de los objetivos que permiten alcanzar los ensayos microbiológicos es determinar las condiciones necesarias para que un microorganismo se desarrolle sobre

una superficie de hormigón, la eficacia de los métodos utilizados para controlar el crecimiento microbiano y la duración del efecto que puede tener este método de control. En este sentido, la técnica descrita por Jeongyun (*Jeongyun, 2005*) define los conceptos básicos necesarios para poder realizar una valoración de un ensayo microbiológico con muestras de hormigón. Tanto en la fase experimental de este trabajo, como en la interpretación de resultados, se han tenido en consideración las indicaciones establecidas en dicho estudio.

De los métodos alternativos a los anteriormente comentados, podemos destacar los análisis de ADN, éstos reducen el tiempo de detección y no precisan la realización de cultivos. Esta es la técnica más avanzada para la identificación de un microorganismo y consiste en realizar la replicación completa de la cadena de ADN a partir de pequeños fragmentos de éste y una vez obtenida se contrasta con las cadenas de ADN de las bases de datos disponibles y se identifica el microorganismo (*Saad, et al., 2003*). Pero del mismo modo que ocurre con la técnica de análisis anterior, su coste hace que su utilización se limite a casos en los que la determinación del espécimen ha de ser muy específica.

2.5.2. Técnicas de simulación de biodegradación

En primer lugar, aclarar que el proceso de biodegradación sobre el que más investigaciones y simulaciones se han hecho es el ataque por ácido biogénico, concretamente el ácido sulfúrico biogénico. Partiendo de esta premisa, a continuación de describen las técnicas más comúnmente utilizadas para este fin y algunas otras que se han considerado destacables, ya sea por el microorganismo evaluado o por el método utilizado.

Las técnicas empleadas para evaluar los efectos de la biodegradación se pueden clasificar en dos grupos, las que simulan el efecto recreando el crecimiento del organismo patógeno y las que solamente evalúan, por ejemplo, el efecto que tiene los ácidos producidos por los microorganismos.

Si bien hay numerosas investigaciones en las que se proponen diferentes técnicas que recrean la degradación del hormigón mediante el desarrollo microbiológico (*Sand et al., 1987; Mori et al., 1992; Schmidt et al., 1997; De Belie et al., 2004*), cabe destacar el estudio llevado a cabo por Vincke (*Vinke et al., 2000*) en la cual se define una metodología de ensayo para la determinación del efecto que tiene sobre el hormigón el crecimiento y el desarrollo del *Thiobacillus thiooxidans*. A través de este método se recrea el metabolismo microbiológico del azufre que se produce en las tuberías de aguas residuales. Esta técnica, que se toma como referencia para la fase experimental de esta tesis doctoral, evalúa la pérdida de sección, la disminución del pH, el contenido de Ca en solución y la concentración de sulfatos que provoca el metabolismo del H₂S por parte de la bacteria sulfooxidante mencionada.

Además de esta metodología de simulación hay diversos estudios en los que los ensayos son realizados in situ, es decir, se ha evaluado el proceso de degradación en

condiciones reales, como tuberías de aguas residuales y en plantas de tratamiento de aguas (Roberts et al., 2002; Okabe et al., 2007). De estos trabajos se sacaron las bases experimentales de la fase ensayos de campo que se realizaron en esta tesis.

Como estudio complementario al anterior, en el que se comparan diferentes medios de evaluación de un ataque de ácido sulfúrico biogénico, se hace necesario destacar el estudio llevado a cabo por (Beeldens et al., 2001) donde se comparan diferentes métodos de ensayos para evaluar este proceso de degradación. Los tres métodos que se evalúan en dicho estudio permiten ver en qué medida afecta el origen del ácido sulfúrico a los efectos producidos sobre el hormigón.

1. La prueba de inmersión, consiste en sumergir una muestra de hormigón de determinadas características en una solución de ácido sulfúrico, evaluando posteriormente la pérdida de peso. Se trata de un ensayo químico.
2. Inmersión de cilindros que giran sobre su propio eje en una solución de ácido sulfúrico con pH 1 durante seis días. Al acabar el ciclo los cilindros se cepillan y se evalúa la pérdida de masa del hormigón. Este método también es un ensayo químico.
3. Test microbiológico mediante el cual se pretende producir biológicamente ácido sulfúrico tras tratar unas muestras de hormigón con una solución que contiene nutrientes, azufre e inóculos de *Thiobacillus thiooxidans*.

La conclusión extraída de este estudio es que el ácido sulfúrico reacciona con el óxido de calcio y el gel CSH provocando la formación de cristales de yeso en la zona de transición árido-pasta, provocando de este modo una mayor degradación del hormigón. La única diferencia observada entre los tres tipos de ensayos, es el tipo de cristales de yeso formados. En los test químicos los cristales tenían forma hexagonal y los filos bien formados, mientras que en el ensayo bioquímico los cristales son más retorcidos y los filos tienen forma de sierra.

En esta misma dirección hay otras investigaciones (Kawai, 1994) en las que se evalúa del efecto del ácido carbónico proveniente de la respiración de los microorganismos aeróbicos. El ácido generado reduce el pH del medio poroso, potenciando el efecto de los ácidos orgánicos y la aceleración del proceso degenerativo. En este estudio los microorganismos que son sometidos a ensayo son *Escherichia coli* y *Penicillium expansum*, donde se determina el contenido de carbonato cálcico y de hidróxido de calcio de dos muestras de hormigón inmersas en dos medios de cultivos donde una de ellas tiene inoculada los microorganismos mencionados.

En la Figura 2.11 se muestra la evolución del contenido de Ca(OH)_2 y de CaCO_3 de dos muestras inmersas en cultivos, pudiéndose observar que en el caso de los dos microorganismos la suma de las cantidades de CaCO_3 y Ca(OH)_2 es mayor después de los

32 días de cultivo, este fenómeno se explica debido a que tanto *E.coli* como *P.expansum* son capaces de disolver el ión calcio presente en el cemento endurecido.

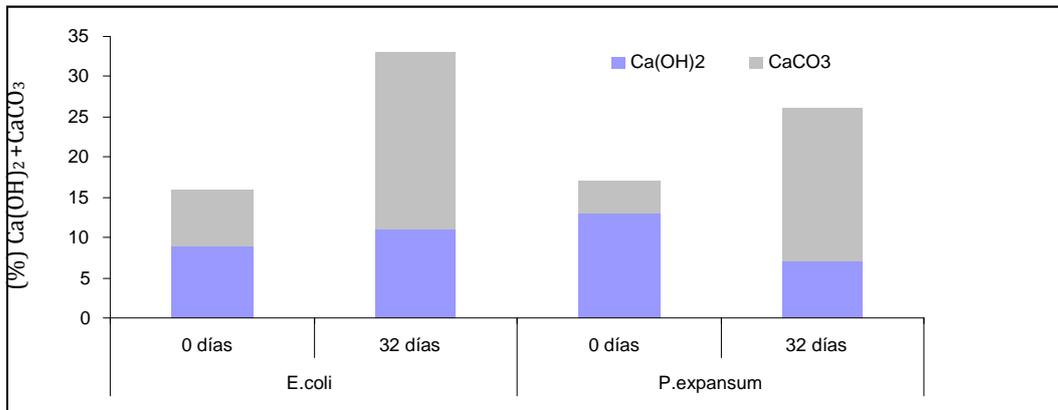


Figura 2.11.- Evolución del contenido de Ca(OH)_2 y de CaCO_3 de dos muestras inmersas en cultivos.

El contenido de carbonato de calcio es el equivalente a la cantidad de hidróxido de calcio que se ha transformado, resultando que la suma de los contenidos de calcita y portlandita es mayor tanto en el cultivo inoculado como después de los 32 días de cultivo. Este incremento en la suma de las sales de calcio se debe a la disolución del ión calcio presente en el cemento endurecido.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior se indicaron las razones por las que es interesante conocer y controlar los efectos provocados por la existencia de microorganismos en el hormigón. Para ello, se hace necesario el desarrollo de una metodología que nos permita determinar la presencia de determinados microorganismos, diseñar un agente antimicrobiano que inhiba o reduzca el crecimiento microbiano, evaluar que este agente no sea perjudicial para el ser humano y/o su actividad y, por último, comprobar el efecto que tiene esta adición de este principio activo en las propiedades fundamentales del hormigón.

La metodología desarrollada para llevar a cabo la fase experimental de este estudio es uno de los puntos más novedosos de esta tesis, por tres puntos fundamentales: *evaluación del efecto del agente biostático en el material, evaluación de la durabilidad del efecto biostático en el tiempo y evaluación directa de la acción biostática del principio activo*. A continuación se describirán en detalle cada uno de estos puntos

- *Evaluación del efecto del agente biostático en el material*. Este primer punto es una de las cuestiones novedosas de esta tesis doctoral, dado que junto con la evaluación de la actividad biostática de un amplio número de principios activos en forma de diferentes formulados, se ha considerado de manera previa el efecto que puede tener cada formulado en las propiedades fundamentales del material – consistencia, densidad, propiedades mecánicas a edades tempranas y a largo plazo – de modo que únicamente se eligen aquellos formulados que no perjudiquen las propiedades del material.

- Evaluación de la durabilidad del efecto biostático en el tiempo. En la bibliografía consultada hay numerosos estudios que analizan el efecto que ha tenido en el hormigón la presencia de un determinado organismo (Gaylarde et al. 2003; Ribas Silva and Pinheiro, 2006), o se han evaluado las consecuencias de un crecimiento acelerado de un determinado microorganismo en el hormigón (Roberts et al, 1996; Escadeillas et al, 2007), pero hasta donde se ha podido conocer en ningún caso se ha simulado un envejecimiento acelerado del hormigón y se han evaluado las consecuencias que provoca en la actividad del agente biostáticos.
- Por último, la evaluación directa de la acción biostática del principio activo. Gran parte de los trabajos publicados en la bibliografía no evalúan de manera directa el efecto biostático de los principios activos, sino la resistencia del material a un proceso de degradación. Si cabe, esto es más evidente en la evaluación de la degradación producida por el ácido sulfúrico biogénico en la que, en la mayoría de los casos, se evalúa la resistencia del hormigón a un ataque ácido, sin abordarse de manera directa la evaluación de la colonización del material por parte de los microorganismos causantes de este ataque.

Por otra parte, cabe destacar que, a pesar de que no haya numerosos estudios en los que se trate la metodología para este tipo de ensayos (Beeldens et al., 2000; Tiano et al, 1995; Muynck et al, 2010; Escadeillas et al, 2007; Sanchez-Silva et al, 2008), la bibliografía revisada ha servido como punto de partida para definir algunos de los ensayos realizados, tales como: el cultivo en placa o la evaluación de la porosidad.

Otro aspecto a destacar es que en el presente trabajo se han sometido a comprobación las correlaciones entre parámetros establecidos en estudios realizados con anterioridad, como es el caso de la porosidad superficial frente a la resistencia a la biodegradación (De Souza et al, 2004; Quirynen, 1996; Verran et al., 1986; Verran et al. 1994; Verran et al. 1995; Ribas Silva, 1995).

El desarrollo del presente capítulo consta de nueve apartados. En primer lugar se aborda el diseño del hormigón con el que se desarrollaran los ensayos (3.2) y se describe el proceso seguido para la obtención del agente biostático (3.3). A continuación se presenta la cronología de la fase experimental (3.4), se describe el método usado en la evaluación del efecto antimicrobiano (3.5) y se explica la metodología utilizada para determinar la durabilidad del efecto antibacteriano de un agente biostático (3.6). Se exponen los ensayos realizados para la determinación de las propiedades fundamentales del hormigón (3.7). Posteriormente se describen las técnicas empleadas para determinar la porosidad superficial (3.8) y la lixiviación de los agentes químicos (3.9) y en último lugar, en el apartado (3.10) se describe la metodología empleada en el ensayo de evolución de la degradación del hormigón por ataque ácido sulfúrico biogénico.

3.2. DISEÑO DEL HORMIGÓN

De acuerdo con la mayoría de los trabajos que se encuentran en la bibliografía afín a este estudio se utiliza el hormigón como material en el que se realizan los ensayos y no en probetas de mortero, a pesar de las ventajas de estos de la rapidez a la hora de hacer las probetas y el menor número de áridos empleados. La selección responde a que es el material base que se utiliza en condiciones reales.

Para determinar la dosificación del hormigón, una de las premisas que se debe tener en cuenta es que sea representativo, es decir que su formulación se corresponda con un hormigón habitual, y de este modo, que los ensayos realizados en el laboratorio sean lo más verosímiles posibles.

La dosificación de hormigón empleada para la fase experimental corresponde a un hormigón HA-25/B/12 de consistencia blanda (6-9 cm de asentamiento según norma UNE EN 12350-2:11.2009 Ensayos de hormigón fresco - Ensayo de asentamiento). Esta dosificación y consistencia de trabajo fueron seleccionadas por ser una fórmula de hormigón comúnmente empleada en el mercado español de hormigón preparado. En la Tabla 3.1 se muestra la formulación tanto del hormigón patrón como del hormigón tratado, el cual sólo difiere en el empleo del agente biostático.

Material (kg/m ³)	Hormigón	
	Patrón	Tratado
Cemento	350	350
Arena 0/5	1074	1074
Gravilla 5/12	724	724
Aditivo (%)	1	1
Agente Biostático	---	X
Agua	244	244
R A/C	0,7	0,7

Tabla 3.1.- Tabla de dosificación de los hormigones empleados en los ensayos.

3.2.1. Los componentes del hormigón

El hormigón base para este estudio está compuesto por cinco componentes cemento, arena, gravilla, aditivo y agua (Tabla 3.1).

- El **cemento** seleccionado fue un cemento tipo CEM IIA/V con adición de cenizas volantes, suministrado por UNILAND, siendo uno de los más ampliamente utilizados en el sector. Se debe verificar que la muestra de cemento no contenga terrones y para ello a la hora de pesar el cemento se debe hacer vertiéndolo a través de un tamiz de 2 mm.
- Con respecto al **árido** utilizado, en la Figura 3.1 se presenta la curva granulométrica de la arena y de la gravilla empleada, pudiéndose observar que

esta corresponde a un tamaño máximo de 12 mm; lo cual responde al tamaño de las placas de Petri donde se realizan los ensayos microbiológicos, que son probetas prismáticas con unas medidas de 40 x 40 x 160 mm. El árido era lavado de origen silíceo con un porcentaje de partículas inferiores a 0,125 mm prácticamente nulo. Con ello se pretende forzar a que la matriz del hormigón posea una mayor cantidad de agua y ello facilite una mayor porosidad en el hormigón.

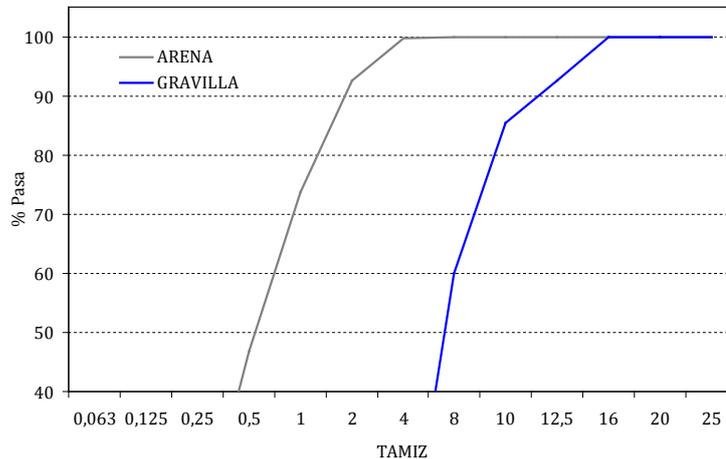


Figura 3.1.- Curvas granulométricas de los áridos empleados

- Con el objetivo de asegurar la homogeneización de los áridos, se deben mezclar cada uno de ellos formando conos, tal y como se representa en la Figura 3.2 en montones separados y en cantidad suficiente para realizar todos los ensayos con los mismos materiales.



Figura 3.2.- Acopio de áridos formando conos

- Con ello se pretende que no se produzcan variaciones (humedad y granulometría). Los conos de los diferentes áridos deben separarse lo máximo posible para evitar que se mezclen entre ellos y provocar que la composición final del hormigón sea errónea (Ver Figura 3.2).

- El **plastificante** utilizado en el hormigón ensayado, fue el Pozzolith 475N de la casa comercial BASF Construction Chemicals, usual a nivel industrial. La base química del producto es lignosulfonato y permite reducir moderadamente la relación a/c del hormigón así como, aumentar el mantenimiento de la consistencia del mismo. Es importante hacer circular el aditivo dentro del envase agitándolo, para homogeneizar el contenido. Se verificará su estado observando que no haya sedimentos. La dosificación del aditivo fue 1% sobre peso de cemento (spc).
- El **agua** de amasado utilizada en los ensayos procedía de la red de abastecimiento del municipio de Palau Solità i Plegamans.

3.2.2. Proceso de fabricación de las muestras de hormigón

Una vez definidos los componentes del hormigón, es importante explicar el proceso de mezcla de dichos componentes, ya que aspectos como el orden de adición de los componentes o el tiempo de amasado son puntos que tienen influencia en parámetros como la oclusión de aire y la consistencia. El amasado del hormigón se realizó de acuerdo a los siguientes pasos:

- Se depositan los áridos en el recipiente con una tercera parte del agua de amasado prevista y se mezclan durante 60 segundos.
- Se añade la cantidad de cemento prevista, una tercera parte del agua y se mezcla durante 60 segundos.
- Posteriormente se raspa a mano con una paleta, el fondo y paredes del recipiente, para incorporar a la mezcla los posibles restos de arena que hayan quedado adheridos. Esta operación se realizará en los siguientes 30 segundos.
- Se añade el aditivo disuelto en una porción de agua, de la última parte de agua preparada y a demanda de la consistencia requerida, se completa la adición del resto del agua y se amasa durante 90 segundos.

Como consideraciones a tener en cuenta se debe destacar que el proceso de amasado duró 4 minutos y que el volumen de las cantidades amasadas en cada ensayo fue de 10 litros, puesto que es el volumen mínimo necesario para garantizar una correcta homogeneización en una amasadora de 50 litros.

3.3. DISEÑO DEL AGENTE BIOSTÁTICO

El objetivo de adicionar un agente biostático en el hormigón es dotarle de una capacidad de inhibición de crecimiento microbiano tanto a nivel superficial como a nivel interno. Hasta el momento, tanto las soluciones comerciales como las soluciones propuestas en la bibliografía consultada, tratan o evalúan esta problemática haciendo referencia, sólo a un tipo de microorganismo, es decir, focalizan la solución en bacterias, hongos o algas de forma separada.

En la presente tesis doctoral se busca dar una solución global al problema del diseño de un agente biostático, dado que cuando el hormigón es colonizado por microorganismos no siempre son de la misma familia. Para ello se han evaluado biocidas de diferente naturaleza y con diferente mecanismo de acción. Los criterios que se tuvieron en cuenta a la hora de seleccionar los agentes químicos estudiados fueron los siguientes:

- Efectividad frente a los microorganismos a controlar: en cuanto a los microorganismos a controlar, en este estudio se clasifican los microorganismos seleccionados en dos grupos, el primero de ellos sería el que engloba los microorganismos que pueden albergarse en el hormigón provocando contaminaciones o perjudicando las condiciones higiénicas de la edificación, y en el segundo grupo que englobaría los microorganismos que pueden degradar el hormigón.

Los microorganismos escogidos como indicadores del primer grupo, son el *Aspergillus niger* (hongo), el *Staphylococcus aureus* y la *Escherichia coli* (bacterias). La razón de esta selección es que son microorganismos indicadores de la transmisión de patógenos por vía alimentaria y a su vez son indicadores de las condiciones higiénicas ambientales. El hecho de que estos microorganismos sean utilizados para evaluar la eficacia de biocidas y agentes desinfectantes en otras aplicaciones como plásticos, tejidos, pinturas, etc., nos sirve para poder contrastar los resultados obtenidos con experiencias anteriores.

En cuanto al grupo de microorganismos indicadores que pueden intervenir en el proceso de degradación del hormigón son el *Scenedesmus vacuolatus*, el *Stylococcus bacillaris* (algas) y el *Thiobacillus thiooxidans* (bacteria). La razón por la que fueron escogidas las dos especies de algas fue por la gran capacidad que tienen una gran capacidad para contaminar ambientes con humedad y luz solar. Las algas así mismo son las responsables de la formación del *biofilm*, que sirve como soporte para otros microorganismos y presentan una gran velocidad de colonización en condiciones favorables. El *Thiobacillus thiooxidans* es la bacteria responsable de la producción de ácido sulfúrico biogénico, por lo que se consideró importante estudiar una solución potencial a este problema.

- Alteración mínima en las prestaciones del hormigón: la adición de una solución antimicrobiana no debe alterar las prestaciones fundamentales del hormigón, en el caso que exista una alteración ésta debe ser la mínima posible. Los parámetros en los que se evaluó el efecto de la adición del agente químico fueron la consistencia, el mantenimiento de la trabajabilidad, la resistencia (compresión y flexo-tracción), oclusión de aire, densidad en estado fresco y en estado endurecido.
- Nula toxicidad para humanos y animales: debido a que en numerosas edificaciones y estructuras el hormigón se encuentra en contacto con seres humanos y animales, el biocida adicionado debe ser inocuo.

- Nula lixiviabilidad: con el fin de evitar, por una parte, la liberación del producto fuera del hormigón y contaminar el medio en el que se encuentra, y por otra evitar la pérdida de eficiencia de esta solución, el agente empleado no debe ser soluble en agua.
- Estabilidad en el tiempo: la vida útil de una estructura de hormigón es de 25, 50 años o más, por lo que la capacidad antimicrobiana de este hormigón debe acercarse lo más posible al periodo de servicio de la estructura.
- Estabilidad en el medio alcalino del hormigón (pH 12-14): la alcalinidad del hormigón hace que la estabilidad de algunos principios químicos sea imposible, por lo tanto, es un parámetro que se tuvo en consideración a la hora de seleccionar los agentes biocidas.
- Actividad en un rango de temperatura elevado (5-30° C): el rango de temperaturas en las que el biocida debe presentar actividad debe ser lo más amplio posible, debido a que el hormigón en la mayoría de los casos está sometido a un gradiente de temperatura importante.
- Coste razonable: para que la solución sea lo más universal posible, el coste derivado de su uso debe ajustarse a los beneficios que aporta, intentando, en la medida de lo posible, minimizarlo.

3.3.1. Los agentes biostáticos

En la fase experimental se probaron 10 principios activos. Estos biostáticos fueron seleccionados por ser productos de los que se tienen experiencias como agentes desinfectantes y que cumplieran las condiciones requeridas. En la Tabla 3.2 se detalla la información sobre los agentes biostáticos, su información general, el nombre químico de producto, la estructura y fórmula molecular, el nombre comercial y la marca que lo comercializa. En la Tabla 3.3 se detallan las propiedades físicas de los productos ensayados.

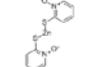
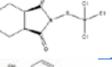
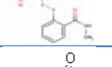
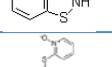
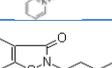
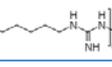
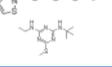
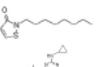
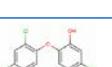
	Principio activo	Formulación	Estructura molecular	Nombre comercial	Marca
1	Zinc-2- piridintiol-1-oxido* (ZINC PIRITIONA 10%)	$C_{10}H_8N_2O_2S_2Zn$		ACTICIDE SR 1288®	THOR
2	1,2,3,6-Tetrahidro-N-triclorometiltio-ftalimida	$C_9H_8Cl_3NO_2S$		BIOPOL D-212®	CHEMIPOL
3	Ditio-2, 2 '-bis (benzometilamida)	$C_{16}H_{16}N_2O_2S_2$		'DENSIL'P®	ZENECA
4	2-Piridinetiol-1-NaO + 1, 2-benzisotiazol-3(2H) ona	C_7H_5NOS		P24-81	CLARIANT
5	Zinc-2- piridintiol-1-oxido* (ZINC PIRITIONA 10%)	$C_{10}H_8N_2O_2S_2Zn$		BC 98-56	SANITIZED
6	n-Butil-1,2-benzisotiazolin-3-ona	$C_{11}H_{13}NOS$		VANQUISH 100®	AVECIA
7	Poli(hexametylenbiguanida) hidroclo	$C_{18}H_{41}ClN_{10}$		'VANTOCIL' IB®	ZENECA
8	2-octil-2H-isotiazol-3-ona + Terbutrin	$C_{11}H_{19}NOS$ + $C_{10}H_{19}N_5S$		ACTICIDE 1453®	THOR
9	n-Tert-butil-N-clclopropil-6-(metiltio)-1,3,5-triazina-2-4-diamina + 2 Octil-2H-isotiazol-3-ona	$C_{11}H_{19}NOS$ + $C_{11}H_{19}N_5S$		ACTICIDE MBP®	THOR
10	2,4,4 '-Tricloro-2' hidroxil-difenil-eter	$C_{12}H_7Cl_3O_2$		NIRGASAN DP 300®	CIBA

Tabla 3.2.- Información general sobre los agentes biostáticos

	Nombre comercial	Aspecto físico	Densidad (gr/cm ³)
1	ACTICIDE SR 1288®	Líquido	1,20
2	BIOPOL D- 212®	Polvo	0,50
3	'DENSIL'P®	Líquido	1,10
4	P24-81	Polvo (fibra)	0,55
5	BC 98-56	Polvo	0,59
6	VANQUISH 100®	Líquido	1,17
7	'VANTOCIL' IB®	Líquido	1,04
8	ACTICIDE 1453®	Polvo	0,39
9	ACTICIDE MBP®	Polvo	0,50
10	IRGASAN DP 300®	Polvo	0,72

Tabla 3.3.- Propiedades físicas de los agentes biostáticos

En la Tabla 3.4 se representan distintas características de los agentes empleados: tipo de microorganismo frente al que presenta actividad, mecanismo de acción y clasificación en función del riesgo químico (CRQ), función de la peligrosidad de manipulación (Irritante - Xi -, Nocivo - Xn -, Peligroso - N -, y Corrosivo - C -).

	Nombre comercial	Efecto	Mecanismo de acción	CRQ
1	ACTICIDE SR 1288®	Fungicida y Bactericida	Replicación de ADN	Xn/Xi/N
2	BIOPOL D- 212®	Fungicida	Respiración	Xn
3	'DENSIL'P®	Fungicida y Bactericida	Replicación de ADN	Xi
4	P24-81	Fungicida y Bactericida	Síntesis de ARN, lipídica y proteica	Xn/Xi/N
5	BC 98-56	Fungicida y Bactericida	Replicación de ADN	Xn/Xi/N
6	VANQUISH 100®	Fungicida, Bactericida y Alguicida	Replicación de ADN	C/N
7	'VANTOCIL' IB®	Bactericida	Replicación de ADN	Xn/N/Xi
8	ACTICIDE 1453®	Alguicida y fungicida	Síntesis de proteínas	Xn/N/Xi
9	ACTICIDE MBP®	Alguicida y fungicida	Fotosíntesis	Xn/N
10	IRGASAN DP 300®	Bactericida y fungicida	Metabolismo lipídico/Fotosíntesis	Xi

Tabla 3.4.- Características de los agentes biostáticos utilizados en la 1ª fase

3.4. CAMPAÑA EXPERIMENTAL

3.4.1. Ensayos en laboratorio

En una primera fase se evaluaron los 10 principios activos siguiendo las recomendaciones de los fabricantes, a excepción del ACTICIDE 1453® que siguiendo recomendaciones del fabricante, se empleó solamente en combinación con otros biocidas. El IRGASAN DP 300® se utilizó en solución de propilenglicol y en solución acuosa. En la fase posterior se evaluaron formulaciones que contenían combinaciones de dos biocidas con el fin de conseguir un espectro de acción antimicrobiana lo más amplio posible, habiéndose ensayado 5 combinaciones. En la Tabla 3.5 se detallan los formulados probados, así como las diferentes dosis empleadas de cada uno de ellos.

Cada uno de estos formulados se sometió a un proceso de ensayos en cascada, en el que cada formulado debe superar una etapa analítica antes de pasar a la siguiente y, en el caso que no lo haga no se seguirá avanzando hacia la siguiente. Este proceso constaba de cinco etapas detalladas gráficamente en la Figura 3.3 mediante el diagrama de flujo de las etapas del proceso de ensayo.

Formulado	Principio activo	Aditivos	Dosis (%)
BXT/AB	IRGASAN DP 300®	PROPILENGLICOL TIBP/BUBLEX	0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,15
BXT/12C	IRGASAN DP 300® ACTICIDE SR 1228®	PROPILENGLICOL POLIETILENGLICOL TIBP/BUBLEX	0,1 - 0,6
BXT/11	IRGASAN DP 300®	PROPILENGLICOL / TIBP	0,15 - 0,18 - 0,2 - 0,22
BXT/10P	ACTICIDE BMP® IRGASAN DP 300®	MOUSSEX® / FILLER CALIZO	0,8 - 1
BXT	ACTICIDE SR 1288	FILLER CALIZO	0,05 - 0,15
PL-UV-H-2B	IRGASAN DP 300® ACTICIDE SR 1453®	MOUSSEX® / FILLER CALIZO	0,15 - 0,2 - 0,3
PL-UV-H-3B	ACTICIDE SR 1453®	MOUSSEX® / FILLER CALIZO	0,3
BXT/I	IRGASAN DP 300®	TIBP/FILLER CALIZO	0,3
BXT/1	ACTICIDE SR 1288® ACTICIDE SR 1453®	MOUSSEX®	2,5 - 3 - 3,5
BXT/5	ACTICIDE SR 1288® IRGASAN DP300®	PROPILENGLICOL POLIETILENGLICOL TIBP/OPTIGEL CR	0,075 - 0,15 - 0,2 - 0,4
ACTICIDE MBP	ACTICIDE MBP®	Sin aditivos	0,1 - 0,4 - 0,8
BIOPOL D211	BIOPOL D 211®	Sin aditivos	0,1 - 0,2 - 0,3
VANTOCIL IB	VANTOCIL IB®	Sin aditivos	0,3 - 0,6 - 1
VANQUISH 100	VANQUISH 100®	Sin aditivos	0,002 - 0,013 - 0,025 - 0,037 - 0,05
DENSIL P	DENSIL P®	Sin aditivos	0,2 - 0,5 - 2 - 1
P 24-81	P 24-81	Sin aditivos	0,3
BC 98-56	BC 98-56	Sin aditivos	0,3

Tabla 3.5.- Tabla resumen de los formulados ensayados

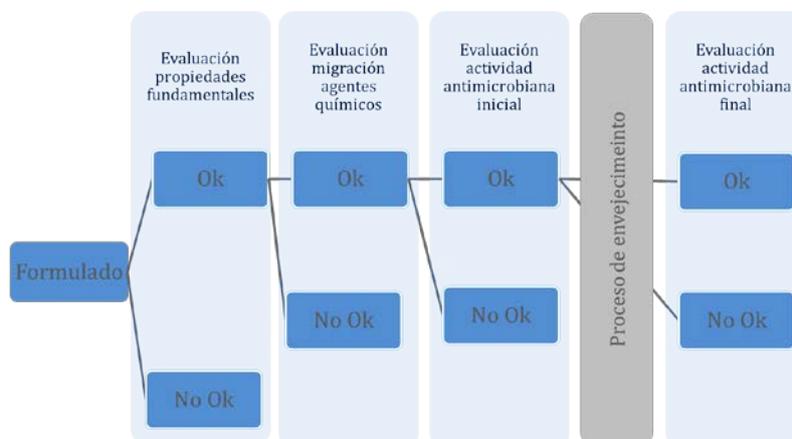


Figura 3.3.- Diagrama de flujo de ensayos en laboratorio.

En cada una de las cinco etapas que componen este proceso analítico se realizaron diferentes ensayos presentados a continuación:

1. *Evaluación de propiedades fundamentales del hormigón.* Se comprobó la influencia que tienen estos principios químicos en las propiedades fundamentales del hormigón (resistencia a compresión, consistencia, densidad). En el apartado 3.7 del presente capítulo se detallan los pasos seguidos en estos ensayos.
2. *Evaluación migración agentes químicos.* En esta fase se analizó la cantidad de biocida que lixivia de las probetas de hormigón mediante lavados de agua desionizada, tal y como se explica en el apartado 3.9 del presente capítulo.
3. *Evaluación actividad antimicrobiana inicial.* Se determina la eficacia de los agentes de los biocidas frente a los microorganismos a controlar en el hormigón. En el apartado 3.5 se encuentran definidos todos los datos de este ensayo.
4. *Ensayos de envejecimiento acelerado.* En estos ensayos se someten las muestras de hormigón a un proceso de envejecimiento acelerado mediante el cual se pretende simular el efecto del paso del tiempo en los agentes biostáticos y evaluar las consecuencias que tienen sobre su eficacia. En el apartado 3.6 de este capítulo se explica detalladamente este ensayo.
5. *Comprobación final de la eficacia de los biocidas.* Las muestras de hormigón se vuelven a someter a controles microbiológicos, idénticos a los de la etapa 1, para comprobar el comportamiento del agente químico después del ensayo de envejecimiento acelerado.

3.4.2. Ensayo de campo

Como última parte de la fase experimental se llevan a cabo dos ensayos de campo. Estos ensayos se realizan en las instalaciones de la Federación Catalana de Vela, situadas en el puerto olímpico de Barcelona. En la rampa de bajada desde el embarcadero al mar, en la zona donde rompen las olas, crecen de manera generalizada algas que provocan graves problemas a los usuarios y a los responsables del embarcadero. Las algas hacen que la rampa de hormigón se convierta en un firme extremadamente deslizante haciendo que la acción de bajar la embarcación al mar sea un acto peligroso.

Para mitigar este problema en la época de mayor desarrollo de las algas se eliminan las algas mediante agua a presión, pero este proceso junto al desarrollo de las algas provoca un deterioro de esta parte del puerto deportivo. Una vez conocida la problemática, los responsables de estas instalaciones nos permitieron realizar una serie de pruebas *in situ* con los productos que mejor se comportaron a nivel de laboratorio.

El producto seleccionado para el primer ensayo de campo fue el formulado PL-UV-H+M-2B. En la segunda fase de ensayos se empleó el formulado PL-UV-H+M-3B, que fue una modificación de PL-UV-H+M-2B que no contenía bactericida debido a que la función prioritaria era solamente la inhibición del crecimiento de algas.

Ensayos con formulado PL-UV-H-2B

Esta primera fase de ensayos de campo se llevó a cabo desde el 5/12/2011 hasta el 30/3/2012. Este ensayo de campo consistió en fijar una placa de hormigón que servía como soporte a seis probetas de hormigón. Estas seis probetas están divididas según dos criterios, tal y como se puede observar en la Figura 3.4:

- Rugosidad superficial del hormigón (leve, moderado y alto)
- Tratamiento biostático (con o sin tratamiento).

Con este estudio se pretende evaluar, en condiciones reales, la eficacia del principio activo con mayor potencial respecto a un patrón. Otros de los parámetros que se pretende evaluar es el efecto que tiene en el desarrollo de las algas la rugosidad del soporte.

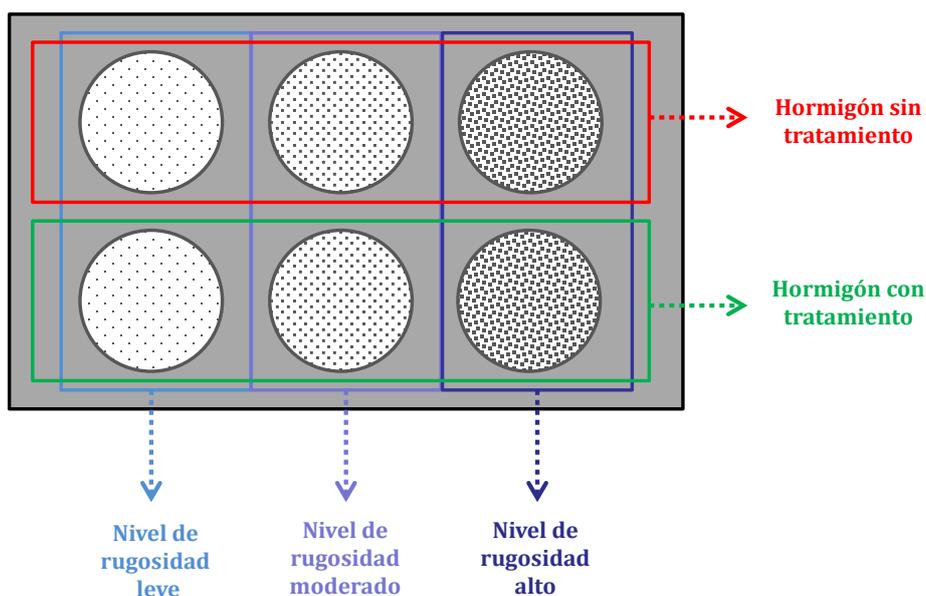


Figura 3.4.- Esquema de disposición de las probetas de ensayo en campo.

La ventaja de tener seis placas divididas en dos series es que permite evaluar de una forma cruzada los parámetros, tratamiento antialgas frente a la rugosidad del soporte (ver Figura 3.4), viendo cuál de los dos factores es más influyente en el crecimiento de las algas. En la Figura 3.5a se puede ver una vista general de la rampa de bajada al mar del club de vela y en la Figura 3.5b se pueden observar las probetas del estudio dispuestas en el Puerto de Barcelona.

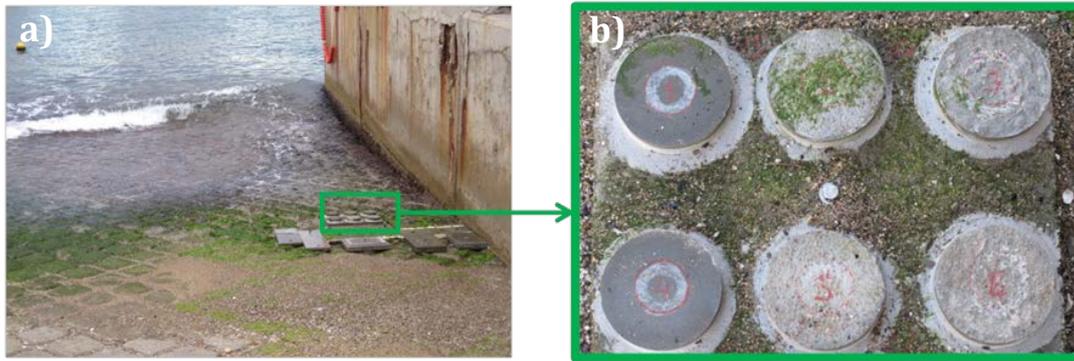


Figura 3.5.- (a) Rampa de acceso al mar. (b) Foto de las probetas de pruebas en Puerto Olímpico de Barcelona.

Los diferentes grados de rugosidad que se dio a las probetas fueron realizados de modo manual, para simular de la mayor manera posible el acabado real que se le puede dar a una solera de las características de la rampa de un puerto. Los tres grados de rugosidad de las placas se obtuvieron realizando tres tipos de acabado superficial diferentes, tal y como se puede observar en la Figura 3.6.

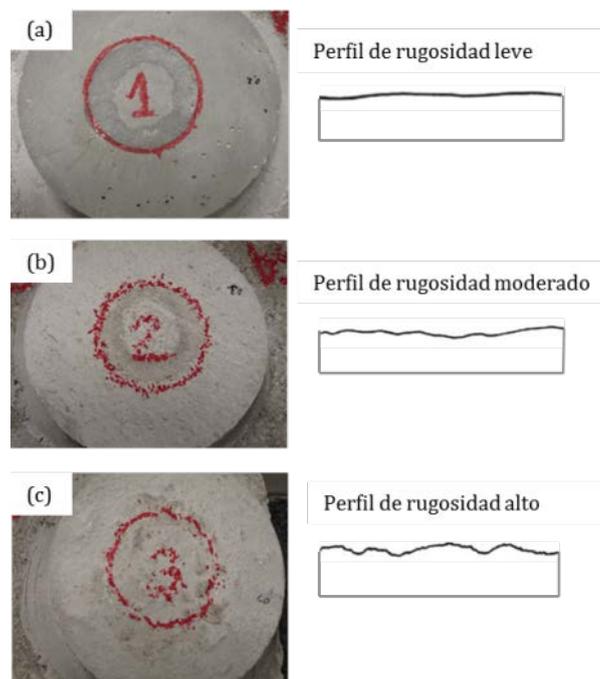


Figura 3.6.- (a) Probeta nivel de rugosidad leve, (b) Probeta nivel de rugosidad moderado y (c) Probeta nivel de rugosidad alto.

Los procesos seguidos para poder obtener los tres niveles de acabados se describen a continuación.

- *Nivel de rugosidad leve* (Figura 3.6a): este nivel de rugosidad corresponde a la probeta con una rugosidad menor, es decir, la más lisa y se realizó sometiendo a la

probeta a un proceso de vibración en una mesa vibratoria durante 30 segundos y después se procede a alisar la superficie utilizando una llana.

- *Nivel de rugosidad moderado (Figura 3.6b)*: este nivel de acabado superficial se consigue realizando el mismo proceso que para conseguir un nivel de rugosidad leve y posteriormente haciendo pasar una arpillera por encima de la superficie de la probeta.
- *Nivel de rugosidad alto (Figura 3.6c)*: la rugosidad más elevada que tienen las probetas evaluadas se obtiene después de hacer los mismos pasos que en los anteriores niveles de rugosidad superficial con la única diferencia que la arpillera utilizada en este caso es más gruesa y por lo tanto deja un acabado más vasto.

Una vez colocadas las placas se realizó un seguimiento fotográfico durante todo el periodo de ensayo de tal modo que se tomaban fotografías de todas las probetas cada quince días, obteniendo un total de 8 imágenes por probeta. Gracias a este reportaje fotográfico se observó la evolución del desarrollo de las algas en las diferentes placas. Como último paso de los ensayos de campo, una vez retiradas las probetas, se extrajeron unas muestras de hormigón y se realizó ensayos microbiológicos en el laboratorio siguiendo la técnica descrita en el punto 3.5 del este capítulo. Mediante estos ensayos de laboratorio se pretende evaluar la pérdida de eficacia del agente químico tras el periodo de exposición en condiciones reales de uso.

Ensayos con formulado PL-UV-H-M-3B

La segunda fase de los ensayos de campo tuvo lugar durante los meses de agosto y septiembre del 2012 y en esta ocasión se colocaron dos probetas en la misma rampa que en la fase anterior; si bien en esta ocasión las probetas tenían unas dimensiones de 40 x 40 x 160 mm (Figura 3.7). Una de las dos probetas estaba tratada con el formulado PL-UV-H-M-3B, mientras que la segunda, probeta referencia, no poseía ningún tipo de tratamiento antialgas.



Figura 3.7.- Foto de las probetas de pruebas en el Puerto Olímpico de Barcelona.

En esta fase de ensayos se comprobó la efectividad del formulado PL-UV-H-M-3B frente al crecimiento de algas en una época del año en el que las condiciones meteorológicas eran mucho más propicias para el desarrollo de las algas; si bien en esta segunda fase no se consideró como variable a estudiar la rugosidad del superficial del hormigón, ya que fue estudiada en la primera etapa.

Del mismo modo que en la fase anterior se realizó un reportaje fotográfico de las probetas colocadas, tomándose 8 fotografías de la pareja de probetas sometidas a estudio, pero en esta ocasión las tomas se realizaron semanalmente, debido a la gran velocidad de desarrollo de las algas en estas condiciones de temperatura y luz.

3.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOSTÁTICA

Hasta el momento no existe ninguna normativa mediante la cual se determine el crecimiento microbiológico sobre hormigón, ni ninguna mediante la cual se pueda evaluar la eficacia de un biocida como inhibidor de crecimiento de microorganismos en el hormigón, por lo tanto, teniendo en cuenta estos antecedentes se ha tomado como referente la normativa ISO/CD 16869. Esta norma se evalúa la eficacia de compuestos fungistáticos en formulaciones plásticas. Aunque se toma como base este procedimiento, se establecen algunas modificaciones para adecuar dicha norma a las condiciones del material a estudiar, el hormigón. Con esta metodología se pretende evaluar la eficacia de los biocidas frente a hongos, algas, bacterias y levaduras.

El principio del ensayo es exponer el hormigón a una suspensión que contiene microorganismos inoculados. Como el medio de cultivo y las condiciones ambientales son favorables para el crecimiento de los microorganismos, se observará el efecto del biocida que contiene el hormigón. En función del grado de actividad del biocida inhibirá en mayor o menor medida el crecimiento del microorganismo en cuestión.

3.5.1. Materiales y equipamiento utilizados

Los materiales utilizados para poder desarrollar los ensayos de evaluación de la actividad antimicrobiana de los agentes seleccionados se describen a continuación:

- Autoclave (Figura 3.8a): todos los objetos y utensilios utilizados en el ensayo se esterilizan, mediante autoclave a 121°C durante 15 min.
- Incubadora (Figura 3.8b): los cultivos microbiológicos deben mantenerse en unas condiciones de temperatura determinada que garanticen el desarrollo de los microorganismos.

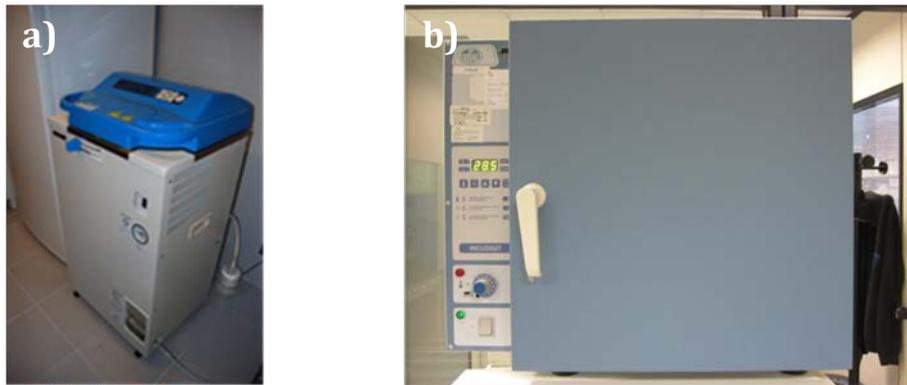


Figura 3.8.- (a) Autoclave y (b) Incubadora.

- Balanza analítica con una precisión de $\pm 0,1$ mg (Figura 3.9a).
- Centrifugadora (Figura 3.9b): para homogenizar el medio de cultivo en el que se desarrollaran los microorganismos se utiliza un equipo de centrifugación que puedan dar una velocidad de giro a la muestra de 2000 a 5000 rpm.
- Medidor de pH (Figura 3.9c): mediante este instrumento se asegura que las condiciones de pH del cultivo sean las requeridas para cada uno de los microorganismos.

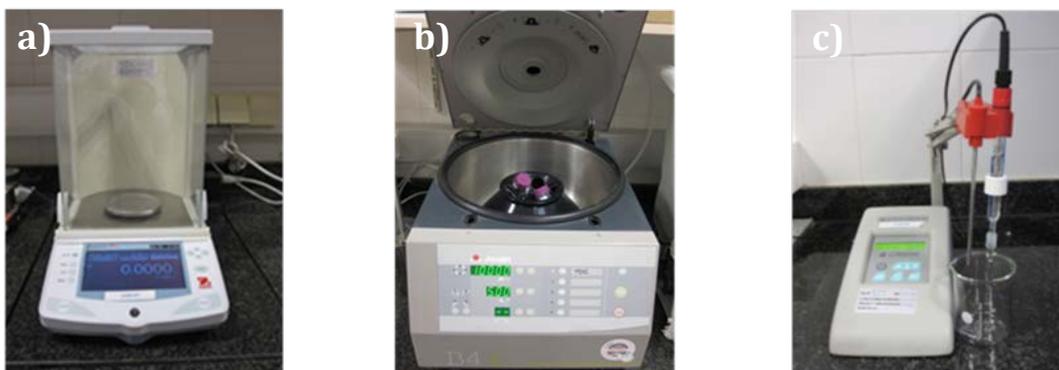


Figura 3.9.- (a) Balanza de precisión, (b) Centrifugadora y (c) Medidor de pH.

- Placas de Petri: Son los recipientes de plástico en los que se realizan los cultivos microbiológicos. En ellos se deposita la muestra a evaluar junto al nutriente y a los microorganismos inoculados. En la Figura 3.10 se muestra el detalle de una placa de Petri con las que se realizaron los ensayos microbiológicos. Esta placa alberga el medio de cultivo con microorganismos inoculados y la sección de la probeta de hormigón que se someterá a estudio.

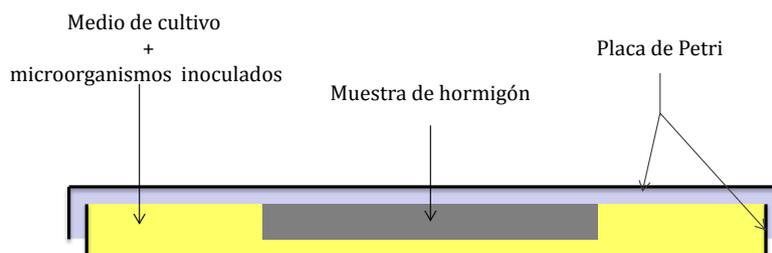


Figura 3.10.- Detalle de placa de Petri

- Agar de extracto de malta (MEA): medio de cultivo especialmente indicado para el desarrollo de hongos y levaduras. Una vez preparado este medio de cultivo se debe conservar en unas condiciones de $\text{pH } 7 \pm 0,2$. A continuación, en la Tabla 3.6, se puede observar los componentes de medio de cultivo.

Componente	Cantidad (gr)
Extracto de malta	30
Soyapeptona	3
Agar-Agar	15
Agua desionizada	c.r. 1000 g

Tabla 3.6.- Composición del medio de cultivo para hongos y levaduras

- Agar nutriente: medio de cultivo utilizado para el desarrollo de bacterias. Al igual que sucede con el medio de cultivo apto para hongos y levaduras, el medio de cultivo para bacterias debe conservarse a $\text{pH } 7 \pm 0,2$. En la Tabla 3.7 se presenta la composición del medio de cultivo agar nutriente.

Componente	Cantidad (gr)
Extracto de carne de buey	3
Peptona	5
Agar-Agar	15
NaCl	5
Agua desionizada	c.r. 1000 g

Tabla 3.7.- Composición del medio de cultivo para bacterias

- Solución nutriente de Kuhl: esta solución es la seleccionada para el cultivo de las algas. Los componentes de la solución nutriente se muestran en la Tabla 3.9. La adición del componente $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se realiza en forma de un complejo de Fe con EDTA. Para la preparación de este complejo de Fe-EDTA se añaden 0,70 gr de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,93 gr de sal disódica de EDTA y se disuelven en 80 ml de agua destilada calentando hasta la ebullición. Una vez enfriado hasta temperatura ambiente, se ajusta el volumen hasta 100 ml y se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión.

Componente	Cantidad (ml)
KNO ₃	10
NaH ₂ PO ₄ · 1H ₂ O	10
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	10
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10
CaCl ₂ · 2H ₂ O	10
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1
Solución micronutrientes	1
Agua desionizada	948

Tabla 3.8.- Composición del medio de cultivo algas

Junto con lo anterior es preciso añadir una solución de micronutrientes compuesta por una serie de minerales y compuestos químicos vitales para el desarrollo de las algas. La composición de la solución de micronutrientes se detalla en la Tabla 3.9.

Componente	Cantidad (mg)
H ₃ BO ₃	61
MnSO ₄ · H ₂ O	169
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2,5
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	12,5

Tabla 3.9.- Composición de la solución de micronutrientes

- Los organismos de ensayo: Los organismos utilizados para evaluar la eficacia de los productos bacteriostáticos fueron los representados en la Tabla 3.10. Los microorganismos empleados se obtuvieron del centro de cultivos ATCC (American Type Culture Collection) y SAG (Sammlung von Algenkulturen Göttingen)

Tipo de microorganismo	Microorganismo	Código de referencia origen
Hongo	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 6275
Bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
Alga	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	SAG 211-8b
Alga	<i>Stichococcus bacillaris</i>	SAG 379-1a

Tabla 3.10.- Organismos empleados en la fase de ensayos microbiológicos

- Elementos auxiliares como: pipetas con capacidad nominal de 1,0 ml y 15,0 ml y agua con una conductividad de <1 μS / cm.

3.5.2. Procedimiento de los ensayos

La primera consideración a tener en cuenta durante la realización de los ensayos microbiológicos son las condiciones de limpieza durante este proceso. Para evitar

contaminaciones que puedan alterar los resultados y derivar en conclusiones erróneas, la manipulación de las placas y del resto de instrumentos se realiza mediante la utilización de pinzas. Las etapas del procedimiento de los ensayos para la evaluación de la eficacia de los productos antimicrobianos son los siguientes:

1. **Etiquetado y almacenamiento.** Las placas de Petri se identifican y almacenan en unas condiciones de temperatura y humedad determinadas ($23^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ y $50 \pm 10\%$ HR) y un lugar limpio para evitar contaminaciones.
2. **Llenado de placas de Petri con agar base.** Después de la esterilización se vierten en las placas de Petri 20 ml del medio de cultivo (agar) adecuado para cada espécimen. Se espera a que solidifique y se seque hasta que no quede agua superficial. Las placas de agar deben estar recién preparadas, no deben conservarse más de 3 días, almacenadas. Las soluciones esterilizadas pueden ser almacenadas hasta 3 meses. (Figura 3.11b)
3. **Preparación de la solución con microorganismos inoculados.** El primer paso que se realiza es preparar una solución que contenga al menos 5×10^6 esporas/ml homogenizada mediante un agitador electromecánico. Esta solución ha de ser almacenada durante 4 días a 4°C . Por otro lado, se funde agar hasta tenerlo líquido y se mantiene a $45 - 48^{\circ} \text{C}$. De este agar se separan 45 ml y se mezcla con un 1 ml de la solución con esporas.

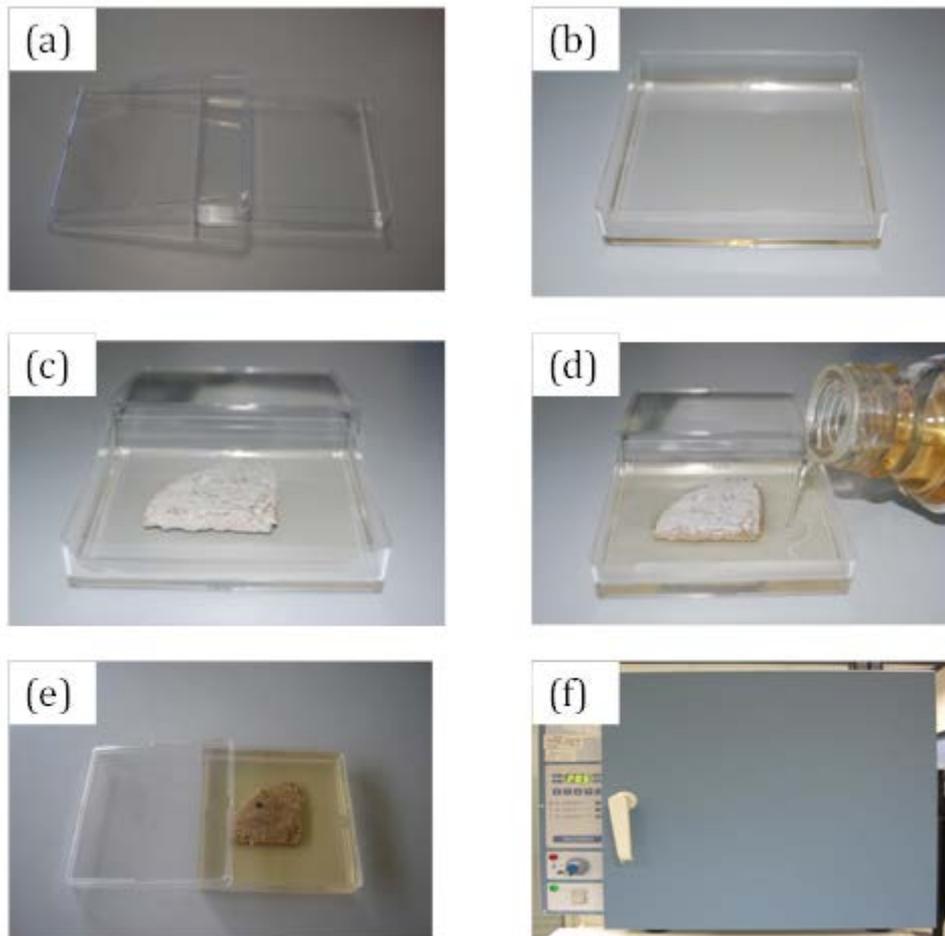


Figura 3.11.- Imágenes de diferentes etapas del proceso de preparación de las placas de Petri

4. **Colocación de la lámina de hormigón.** Esta lámina de 1 cm de espesor se obtiene de las probetas prismáticas de 40 x 40 x 160 mm y se coloca sobre la capa de agar anteriormente vertido en las placas de Petri (Figura 3.11c).
5. **Llenado de placa de Petri con la solución inoculada con micro-organismos.** La mezcla se vierte sobre el agar base que contiene la lámina de hormigón a evaluar, quedando ésta entre la capa de agar base y la capa de agar inoculada con el microorganismo a evaluar. (Figura 3.11d)
6. **Incubación.** Una vez preparadas las placas de Petri (Figura 3.11e) con la muestra de hormigón embebida entre el agar base y el agar inoculado se deben conservar en la incubadora (Figura 3.11f) en unas condiciones de temperatura determinadas para que el desarrollo microbiológico se produzca. En la Tabla 3.11 se detallan los datos de temperatura y la duración de los periodos de incubación en función del microorganismo.

Microorganismo	Temperatura (°C)	Duración (días)
<i>Aspergillus niger</i>	25 ± 2	5-7
<i>Staphylococcus aureus</i>	30 ± 2	2
<i>Escherichia coli</i>	30 ± 2	2
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	20 ± 2	21
<i>Stichococcus bacillaris</i>	20 ± 2	21

Tabla 3.11.- Condiciones de temperatura y duración del periodo de incubación.

Las bacterias se desarrollan en unas condiciones de temperatura superiores a los hongos y algas. En cuanto a la duración de la incubación cabe destacar los 21 días necesarios para que se produzca el crecimiento en el cultivo de algas.

3.5.3. Expresión de resultados

Si el principio activo no presenta actividad el organismo se desarrollará en toda la suspensión. Si por el contrario sí que la tiene, inhibirá el crecimiento del microorganismo en la superficie de la muestra del hormigón e incluso el efecto puede llegar a inhibir el crecimiento alrededor de la muestra de hormigón, creando un halo de inhibición. Los resultados se interpretan de acuerdo a la escala que se muestra en la Tabla 3.12.

Índice de desarrollo	Interpretación desarrollo microbiano
0	Sin crecimiento. El material es resistente al ataque del microorganismo estudiado.
1	Crecimiento inicial. El material queda parcialmente protegido.
2	Crecimiento y esporulación evidente: susceptible al ataque de microorganismo estudiado.

Tabla 3.12.- Interpretación del ensayo de evaluación del biocida

3.6. DURABILIDAD DEL EFECTO ANTIMICROBIANO

Los ensayos que engloba este apartado tienen como cometido la evaluación del efecto del agente desinfectante a lo largo del tiempo. Hay innumerables ensayos para determinar la duración del efecto biostático, pero siempre están referidos a unos periodos de tiempo mucho más cortos (horas, días, meses) que la vida útil de cualquier edificación.

En este estudio se pretende desarrollar una metodología con la que poder evaluar la actividad de un principio activo a largo plazo, sometiendo al hormigón y al producto a unas condiciones especialmente desfavorables que simulen un proceso de envejecimiento acelerado. Con los datos obtenidos se pretende estimar la vida útil de la materia empleada como biostático.

Debido a la ausencia de normativa referente a la viabilidad de productos biostáticos en periodos muy largos (25, 50, 100 años), los ensayos que se emplean en esta fase experimental provienen de otras áreas, por lo que son un posible punto de partida para próximas investigaciones en este ámbito.

El test de exposición realizado se denomina Xenotest 150S y consiste en irradiar ininterrumpidamente las muestras durante 2000 horas a 340 nm y 0,5 W/m², en condiciones estándar ISO 4892-2, que equivale a 6 – 8 meses de radiación solar fuerte continua. Este test está diseñado para evaluar la durabilidad de barnices y pinturas, pero debido al efecto que simula se ha considerado válido para poder determinar el periodo de efectividad de los inhibidores de crecimiento de microorganismos tanto en la superficie como dentro de la matriz del hormigón.

Este método de ensayo se utiliza, usualmente, para determinar las resistencias de pinturas y barnices al envejecimiento artificial en laboratorio incluye lámparas de luz ultravioleta fluorescente y aspersores de agua. La luz ultravioleta que producen estas lámparas fluorescentes simula solamente una parte del espectro luz solar natural, y por lo tanto el test no reproducirá totalmente un envejecimiento natural.

Para poder comprender el procedimiento de ensayo y sus resultados se hace necesaria la aclaración de una serie de conceptos que se detallan a continuación:

- **Criterio de envejecimiento.** Para un determinado grado de envejecimiento se debe especificar el cambio que se produce en una propiedad seleccionada del hormigón sometido al ensayo. En este caso se evalúa la capacidad de inhibición del crecimiento microbiano.
- **Comportamiento de envejecimiento.** Se estudia el cambio en las propiedades de las muestras sometidas a ensayo durante el periodo de envejecimiento artificial.
- **Irradiación (E).** Se mide mediante la ecuación 3.1, a través del cociente del Flujo de radiación W medido en vatios con respecto al área (en m²) para un determinado rango de longitud de onda.

$$E = W / A \quad (3.1)$$

- **Exposición a la radiación (H).** Parámetro que mide la radiación (E en vatios por metro cuadrado) a la que está sometida la muestra, a lo largo del tiempo (en segundos), mediante la ecuación 3.2.

$$H = \int E \delta t \quad (3.2)$$

El envejecimiento artificial, usando lámparas de luz ultravioleta fluorescente y aspersores de agua, responde a la necesidad de poder reproducir una determinada

exposición a la radiación de acuerdo a un total de número de horas de exposición. Mediante este proceso se pretende simular un periodo de tiempo mucho más prolongado en condiciones reales.

El cambio de la capacidad de inhibición del crecimiento de determinados microorganismos se compara con muestras no expuestas a la radiación y preparadas de la misma manera que las sometidas a estudio (de las cuales se conoce la degradación de las propiedades que no son debidas a la radiación). Cabe destacar que los resultados obtenidos a través de este método no son necesariamente extrapolables a los que se hubieran obtenido en condiciones de exposición naturales.

3.6.1. Materiales y equipamiento utilizados

A continuación se describen los **aparatos y materiales** utilizados para la realización de este ensayo.

- Cámara de pruebas. Receptáculo dentro del cual están alojadas las lámparas de radiación, las boquillas de aspersion de agua y los soportes de las muestras.
- Lámparas. Las lámparas UV emiten luz ultravioleta mediante un arco de mercurio de baja presión. La distribución del espectro requerida se alcanza a través de una selección del tipo de fósforo que recubre la superficie interna de la lámpara y de la naturaleza del vidrio que se ha utilizado en la fabricación de los tubos de las lámparas. En este método se utilizan tres tipos de lámparas:
 - 1.- *Lámpara tipo 1*: esta lámpara emite la mayor parte de su radiación el longitud de onda por debajo 300 nm, si bien tiene su pico tiene su pico de emisión a partir de 313 nm lo que le da el nombre UVB 313. Este tipo de radiación no se encuentra en la luz solar, por lo tanto la degradación que provoca ésta no se dará en condiciones naturales. Esta lámpara sólo se utiliza para la evaluación de materiales usados en la industria aeroespacial.
 - 2.- *Lámpara tipo 2*: de forma análoga a la lámpara tipo 1, esta lámpara se denomina UVA 340 y tiene su pico de emisión a partir de 340 nm.
 - 3.- *Lámpara tipo 3*: Esta lámpara se denomina UVA 351 y tiene su pico de emisión a partir de 351 nm.

En la Tabla 3.13, se muestra la irradiación relativa según la longitud de onda de cada una de las tres lámparas utilizadas en este ensayo, estando el 100 % en el rango de $270 < \lambda \leq 400$. No es recomendable utilizar lámparas diferentes a las definidas debido a que no se podrá asegurar la uniformidad del espectro de irradiación en la superficie de los especímenes

Longitud de onda, λ (nm)	Irradiación espectral relativa (%)		
	Lámpara 1	Lámpara 2	Lámpara 3
$\lambda \leq 270$	0	0	0
$270 < \lambda \leq 280$	0.3 ± 0.03	0	0
$280 < \lambda \leq 300$	16.2 ± 1.6	0	0
$300 < \lambda \leq 320$	41.6 ± 4.2	7.8 ± 0.8	2.1 ± 0.2
$320 < \lambda \leq 340$	29.4 ± 2.9	29.4 ± 3.0	19.4 ± 1.9
$340 < \lambda \leq 360$	9.1 ± 0.9	34.4 ± 3.4	43.4 ± 4.3
$360 < \lambda \leq 380$	3.0 ± 0.3	20.9 ± 2.1	28.2 ± 2.8
$380 < \lambda \leq 400$	0.4 ± 0.04	7.3 ± 0.7	6.9 ± 0.7

Tabla 3.13.- Detalle de la irradiación de las diferentes lámparas

- Sistema de aspersión de agua. Se utilizaron boquillas de aspersión de agua para garantizar una humedad relativa determinada en el ambiente.
- Termómetro Black Panel. Para determinar la temperatura que alcanzan los especímenes estudiados se utiliza un termómetro Black Panel que monitoriza, durante todo el proceso de ensayo, la temperatura de los mismos.
- Radiómetro. El uso de un radiómetro para monitorizar la irradiación y la exposición de radiación es opcional.
- Muestras de hormigón. Para la realización del ensayo se confeccionan probetas prismáticas de hormigón de 4x4x16 cm que son cortadas a espesores de 1 cm.

3.6.2. Procedimiento del ensayo

1. **Montaje de las muestras.** Asegurar las muestras en el soporte. Seguir las indicaciones del fabricante del aparato de pruebas (XenoTest) para garantizar una uniformidad de la exposición a la irradiación de las muestras. Se recomienda que la rotación de las muestras no sea mayor a 3 días.
2. **Operación.** Es importante situar el XenoTest en un lugar donde la temperatura sea $23 \pm 5^\circ \text{C}$. Mantener el Panel Negro del termómetro a una temperatura de $60 \pm 3^\circ \text{C}$ durante el periodo de irradiación. Mantener el Panel Negro del termómetro durante la fase de humectación (4 horas) a una temperatura de $50 \pm 3^\circ \text{C}$. Las muestras se deben examinar entre las fases de irradiación y humectación, y periódicamente cada semana.
3. **Duración del ensayo.** La duración del test fueron 2000 horas de irradiación continua. Es importante que no haya interrupción durante el test para que el proceso de envejecimiento acelerado se realice de la forma más continua y uniforme posible.

3.7. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO SOBRE LAS PROPIEDADES FUNDAMENTALES DEL HORMIGÓN

Con el fin de evaluar la potencial influencia que pueden tener los agentes biostáticos evaluados sobre las propiedades del hormigón, se evalúan diferentes parámetros, tanto en estado fresco como en estado endurecido, de todos los hormigones tratados y los resultados obtenidos se comparan con los obtenidos con un hormigón patrón. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

- Consistencia y mantenimiento de la consistencia
- Resistencia inicial (1 y 7 días) a compresión y tracción.
- Resistencia final (28 días) a compresión y tracción.
- Densidad.
- Porosidad superficial.

3.7.1. Consistencia y mantenimiento de la consistencia

La medición de la consistencia se realizará mediante el cono de Abrams (según norma ISO 4109). Para determinar el mantenimiento de la trabajabilidad se hicieron mediciones en los minutos 0, 30 y 90.

El método de fabricación de las probetas se realizó según indicaciones de la norma UNE-EN 12390-2. El hormigón fue amasado en una amasadora de 25 litros (Figura 3.12a) de laboratorio convencional de eje vertical, si bien las amasadoras que se realizaron para este estudio tenían un volumen de 10 litros. Este volumen garantiza la correcta homogenización del material en la amasadora y es suficiente para preparar todas las probetas necesarias en todas las fases experimentales

3.7.2. Resistencias compresión y tracción

Una vez amasado hormigón y medida la consistencia, se preparan las probetas que se curan y conservan según indica la norma UNE-EN 12390-2. En la Figura 3.12b se muestra una fotografía de la cámara de curado donde se conservaron las probetas. Dicha cámara cuenta con un termómetro y un higrómetro conectados a ventiladores y pulverizadores de agua que hacen mantener las condiciones de humedad y temperatura dentro de los límites establecidos, es decir, $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y 95% de humedad relativa.

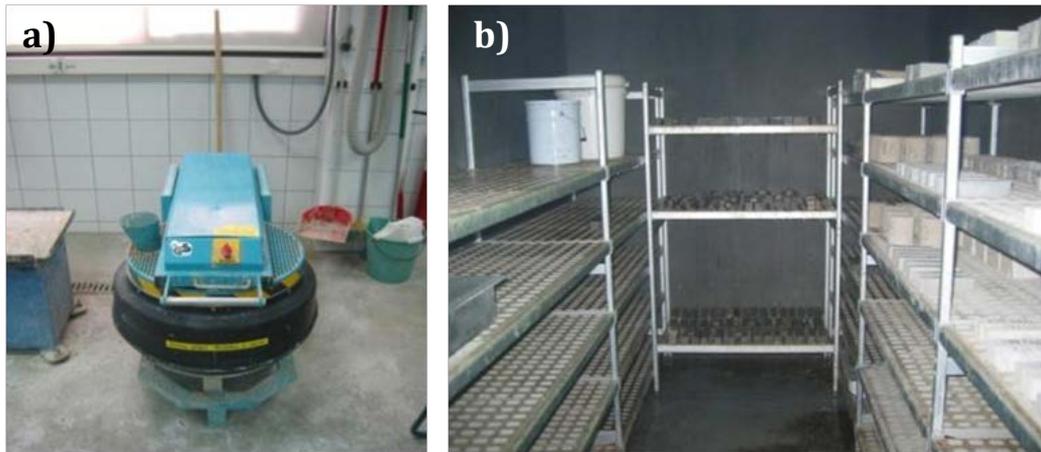


Figura 3.12.- (a) Amasadora utilizada y (b) Cámara de curado.

Cuando el proceso de curado ha finalizado las probetas se ensayan a las edades de 1, 7 y 28 días. La prensa empleada para realizar las roturas es de la casa comercial Ibertest (Figura 3.13), la cual puede realizar tanto las roturas a flexo tracción como a compresión de las probetas de 4 x 4 x 16 cm. La velocidad de carga de la prensa fue de 0,05 KN/s y de 2,4 KN/s, para los ensayos de flexo-tracción y de compresión, respectivamente, siguiendo las normas UNE-EN 12390-3 y 12390-4.



Figura 3.13.- Prensas utilizadas

3.8. DETERMINACIÓN DE LA POROSIDAD SUPERFICIAL

La población microbiana en una superficie es directamente proporcional a la porosidad de la misma, como se comentó en el Capítulo 2. El reducido tamaño de los microorganismos les permite ocupar los poros existentes en la superficie. Por lo tanto, se considera del todo necesaria la determinación de la porosidad superficial para poder conocer la influencia de este parámetro en el crecimiento de microorganismos en una superficie de hormigón.

La determinación de la porosidad superficial se realiza de manera indirecta, mediante el ensayo de absorción inmediata de agua, siguiendo la recomendación de la RILEM N^o. II. 4; a mayor absorción de agua mayor porosidad superficial. Cabe destacar que esta determinación es uno de los aspectos novedosos de esta investigación puesto que hasta donde se conoce esta metodología no ha sido empleada para un estudio de este tipo, si bien es una técnica comúnmente empleada en otro tipo de ensayos.

3.8.1. Material y aparatos utilizados

Los aparatos y materiales utilizados para la realización de este ensayo se describen a continuación.

- El tubo de Karsten es un tubo de vidrio graduado abierto por ambos lados (En la Figura 3.14 se muestra una fotografía del tubo de Karsten utilizado); uno de los cuales es el que se pone en contacto con la superficie a evaluar y el otro es por el que se introduce el agua. El diámetro del tubo que está en contacto con el hormigón es de 25 mm, por lo tanto la superficie de contacto será 490,87 mm².

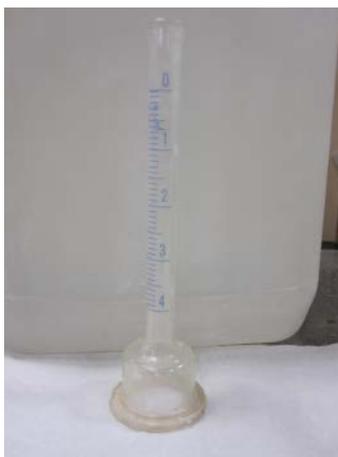


Figura 3.14.- Equipo de Karsten utilizado en los ensayos.

- Materiales auxiliares como: cronómetro, utilizado para determinar los momentos exactos cuando han de hacerse las mediciones y silicona, empleada para unir el tubo de Karsten a la superficie del hormigón evitando fugas de agua.

3.8.2. Procedimiento del ensayo

Para evaluar la eficacia del método se confeccionan dos juegos de placas de hormigón, uno posee tratamiento biocida y el otro no. Cada uno consta de tres placas, cada placa tiene una rugosidad diferente y una porosidad diferente (ver apartado 3.4.2). Con estas placas pretendemos ver la influencia que posee las variables: porosidad y tratamiento biocida vs. crecimiento microbiano superficial. A continuación se describen los pasos a seguir en la realización del ensayo de absorción de agua:

1. **Fijación tubos Karsten:** Sobre la superficie limpia y seca de hormigón se fija un Karsten con silicona, con el fin de sellarlo para evitar que la pérdida de agua fuera del diámetro del tubo Karsten. En la Figura 3.15a se puede apreciar la disposición final de los tubos de Karsten sobre las probetas de hormigón.
2. **Medición del nivel de agua:** Una vez la silicona ha endurecido, se enrasa el Karsten con agua (nivel 0) y se pone en marcha el cronómetro, tal y como se representa en la Figura 3.15b, y se anotan las mediciones en los tiempos establecidos. La medición de la columna de agua se realiza por primera vez a los 10 minutos de haber enrasado el tubo Karsten (nivel A), y posteriormente cada hora (nivel B, C, et.), tal y como representado en la Figura 3.15b.

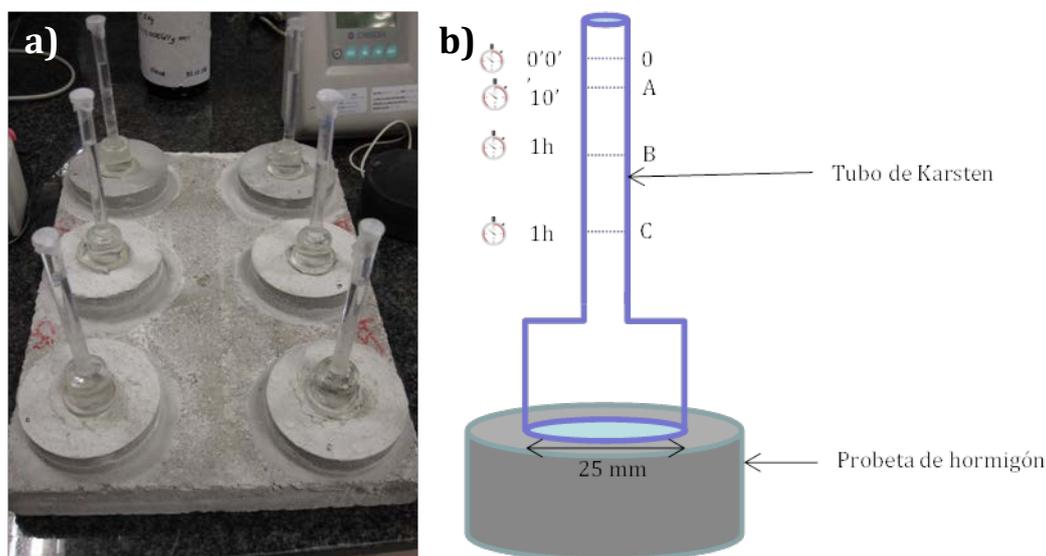


Figura 3.15.- Procedimiento de ensayo Karsten: (a) Disposición de los tubos y (b) esquema con las marcas del nivel de agua.

3.8.3. Expresión de los resultados

Una vez tenemos las lecturas en los tiempos determinados, se puede determinar el **coeficiente de absorción de agua (W)**. Este parámetro informa sobre la capacidad que tiene un soporte de absorber agua. Mediante la ecuación 3.3 se obtiene el coeficiente W, dado en $\frac{\text{kg}}{\text{m}^2 \cdot \text{h}^{1/2}}$

$$W = \frac{1273.24 (B-A)}{D^2} \quad (3.3)$$

donde:

- A:** absorción de agua después de 10 minutos de enrasado el Karsten, en ml.
- B:** absorción de agua después de 70 minutos de enrasado el Karsten, en ml.
- D:** es el diámetro interno del Karsten, expresado en mm.

El resultado se debe expresar como la media aritmética de todos los valores obtenidos, acompañada del correspondiente intervalo de confianza al 95%.

3.9. DETERMINACIÓN DE LIXIVIACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

Una de las características claves que debe poseer el agente biostático es que no lixivie, es decir, que el principio activo no sea soluble en agua. Este aspecto es de vital importancia para evitar problemas de contaminación de las personas, animales, materiales e incluso el medio ambiente que estén en contacto con el hormigón antimicrobiano.

La determinación del grado de lixiviación de un biocida es fundamental en el caso del hormigón con tratamiento antibacteriano, puesto que este material puede estar destinado a estructuras marinas, depósitos de agua, granjas, mataderos y demás edificaciones, donde no se pueden dar contaminaciones por parte del principio activo. La lixiviación de los biocidas procedente del hormigón tratado que se produce en el agua debe ser cuantificada para evaluar los posibles riesgos medioambientales del uso de éstos.

El método que se utiliza para esta evaluación está basado en la **prEN 16105:2010**. Esta prenorma abarca el campo de los revestimientos y las pinturas, pero debido a que no hay ninguna norma que se pueda aplicar al hormigón se ha tomado ésta como base. Para poder interpretar debidamente los resultados obtenidos de este ensayo es necesario aclarar los siguientes conceptos básicos:

- **Elemento base:** material donde es incorporado el biocida. En este estudio será el hormigón.
- **Emisión:** liberación de sustancias potencialmente nocivas para el medio ambiente.
- **Lixiviación:** extracción (de emisiones) de sustancias potencialmente nocivas de un material en el agua.
- **Inmersión:** la exposición de la probeta con el agua.
- **Día de inmersión:** ciclo de 1 hora de inmersión, 4 horas de secado y 1 hora inmersión. Este ciclo representa un día de lluvia.
- **Eluido:** la solución líquida que resulta del proceso de separación de un sólido de otro mediante un proceso de lavado. Agua con sustancias disueltas.

3.9.1. Materiales utilizados

Los equipos y materiales utilizados para poder desarrollar este ensayo se describen a continuación:

- Muestras de hormigón. Se utilizan muestras tanto de hormigón con o sin tratamiento antimicrobiano que se toman como patrón.

- Equipo de cromatografía líquida de alta presión (*HPLC*) (ver Figura 3.16). mediante el cual se analizan las muestras de eluido para determinar la posible contaminación por parte de los agentes biostáticos.



Figura 3.16.- Detalle del equipo de HPLC

- Materiales auxiliares como:
 - El agua utilizada es desionizada, con un valor del pH de 5 a 7 y a una temperatura de $23^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$.
 - Medidor de pH (Ver Figura 3.9c). Se utiliza un medidor de pH para determinar el grado de alcalinidad/acidez de las muestras de agua.
 - Báscula (Ver Figura 3.9a). Se utiliza la báscula para determinar el peso de la muestra de hormigón antes y después del proceso de inmersión.
 - Vasos de precipitados, de los que se utilizan de dos tipos, los primeros son en los que la muestra de hormigón se encuentra en contacto con el agua desionizada y los segundos, son los utilizados para recoger el eluido.

El recipiente para la inmersión debe ser de un material inerte a los componentes de los eluidos y lo suficientemente grande como para permitir que los especímenes de prueba queden cubiertos totalmente por el agua.

3.9.2. Procedimiento del ensayo

El hormigón exterior de una estructura o edificación está sujeto a intervalos de lluvia intermitente y de secado, y para simular este proceso las muestras se sumergen en agua y posteriormente se seca. El agua obtenida después de la inmersión se analiza y se determinan las cantidades de lixiviados.

La tasa de emisión de biocidas se determina a partir de los datos analíticos obtenidos en miligramos por metro cuadrado para un día de inmersión. Debemos tener en cuenta que la cantidad, la duración, la temperatura y el pH de las precipitaciones son parámetros importantes a la hora de evaluar la emisiones de los lixiviados.

1. **Obtención de muestras.** Las muestras de hormigón en las que se realizará el ensayo de lixiviación, se obtienen del hormigón tratado con el biocida una vez que esta endurecido, además de una muestra de hormigón patrón.

El ensayo se realiza por duplicado, por lo menos dos muestras de análisis con biocidas y con una muestra de la prueba de control, es decir, un muestra de hormigón sin tratamiento antimicrobiano. Estas muestras deben poseer una superficie mínima de 100 cm².

Los especímenes sometidos a ensayo deben estar, como mínimo, durante 7 días con libre circulación de aire a $23 \pm 2^\circ \text{C}$ y a una humedad relativa del $50 \pm 5 \%$.

2. **Proceso de inmersión.** Este proceso dura 24 días y se realizan 9 ciclos de inmersión en los días 1, 3, 7, 9, 14, 16, 18, 22, 24. En cada ciclo de inmersión se siguen los siguientes pasos:

- 1 hora de inmersión.
- 4 horas de secado a $23^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ y con una humedad relativa de $50 \pm 5 \%$
- 1 hora de inmersión.
- 48 horas de secado

En el esquema representado por la Figura 3.17, se muestra el proceso de inmersión al que son sometidas las muestras de hormigón evaluadas.

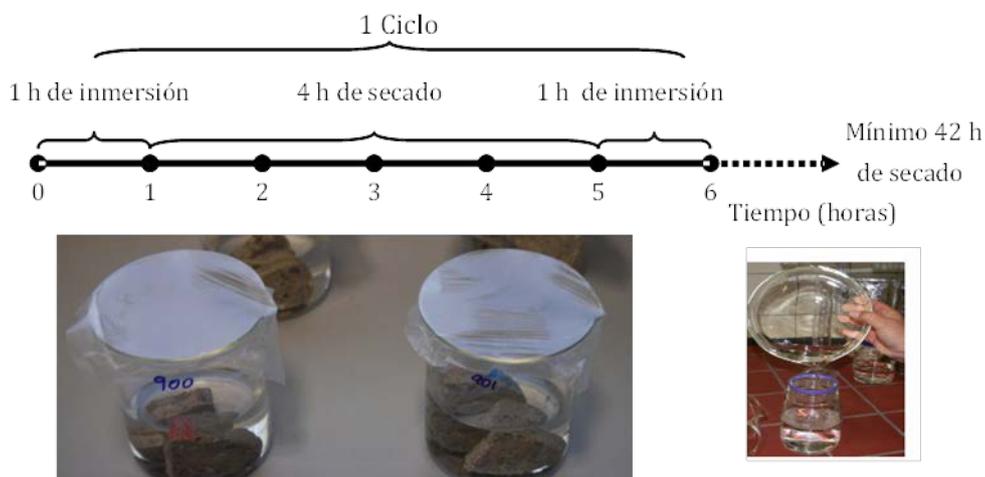


Figura 3.17.- Esquema del proceso de inmersión.

Hay una serie de consideraciones a tener en cuenta en durante el proceso de simulación de lixiviación:

- El recipiente de inmersión debe ser lavado y secado.
- Agua desionizada fresca se utiliza para cada evento de inmersión.
- Determinar y registrar el valor del pH.

- Determinar y registrar la masa de cada muestra antes de cada inmersión.
 - El recipiente de inmersión se debe cubrir para evitar la evaporación del agua durante la inmersión.
3. **Obtención de muestras del eluido.** Una vez que el proceso de lixiviación ha finalizado, las muestras de hormigón tratadas deben retirarse de los recipientes de inmersión. El agua procedente de cada uno de los ensayos realizados por duplicado se mezcla y se prepara para realizar el análisis para determinar la cantidad de biocida resultante y a su vez determinar el pH de los eluidos.

Las condiciones en las que deben estar las muestras entre los días de inmersión son: $23 \pm 2^\circ \text{C}$ y a una humedad relativa de $50 \pm 5\%$. Este proceso de lixiviación y secado se debe realizar nueve días tal y como se indica en el esquema de la Figura 3.17.

4. **Análisis de las muestras.** Los eluidos se analizan para determinar la concentración de biocida en el disolvente. Este proceso se realiza mediante HPLC.

3.9.3. Expresión de los resultados

Los resultados de los análisis (concentración del biocida en el disolvente) se expresan en ppm. Mediante la ecuación 3.4 podremos convertir el resultado expresado en ppm a $\text{mg}/\text{m}^2\text{día}$.

$$M = C \times V_{real} \quad (3.4)$$

dónde:

- M** es la cantidad de biocida lixiviada, expresado en miligramos;
C es la concentración de biocida en el eluido, expresado en miligramos por litro
V_{real} es el volumen real de eluido después de días de inmersión, expresado en litros.

3.10. EVALUACIÓN DE LA DEGRACIÓN DEL HORMIGÓN POR ÁCIDO SULFÚRICO BIOGÉNICO.

En el capítulo 2 se ha expuesto de forma detallada el proceso de degradación del hormigón por la acción de ácido sulfúrico biogénico, uno de los procesos de biodegradación más importantes y estudiados, por ese motivo en la presente tesis se ha querido reproducir este proceso a nivel de laboratorio y poder evaluar sus efectos, con y sin el tratamiento bactericida (BXT / I).

La metodología seguida para la realización de este ensayo (ensayo por inmersión) se basa en el procedimiento realizado por Vincke (*Vincke et al. 1999*, si bien se incluyen

algunas modificaciones. Como ensayo complementario se realiza un estudio del efecto del tratamiento aplicando una suspensión con *Thiobacillus thiooxidans* inoculado sobre la superficie de hormigón tratada y sin tratar, evaluando posteriormente el crecimiento de microorganismo en placa, a este ensayo se le denominará ensayo por impregnación.

3.10.1. Materiales y equipamientos utilizados

Los materiales utilizados para poder desarrollar los ensayos de evaluación de la actividad del agente bactericida frente al *Thiobacillus thiooxidans* se describen a continuación:

- Autoclave (Figura 3.8a), incubadora (Figura 3.8b), balanza (Figura 3.9a), descritos en el punto 3.5.
- Centrifugadora: para homogenizar el medio de cultivo en el que se desarrollaran los microorganismos se utiliza un equipo de centrifugación que puedan dar una velocidad de giro a la muestra de 90 rpm.
- Medidor de pH (Figura 3.9c): mediante este instrumento podremos medir el pH del medio de cultivo durante los 3 ciclos de ensayo.
- Placas de Petri (Figura 3.10): descrito en el punto 3.5.
- Medio de cultivo enriquecido para *Thiobacillus thiooxidans*: medio de cultivo especialmente indicado para un rápido desarrollo de este microorganismo. A continuación, en la Tabla 3.14, se puede observar los componentes de medio de cultivo.

Componente	Cantidad (g)
$K(NH_4)SO_4$	0,2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
$CaCl_2$	0,25
KH_2PO_4	3
$FeSO_4$	0,005
Agua	1000

Tabla 3.14.- Composición del medio de cultivo para *Thiobacillus thiooxidans*.

- Medio de cultivo isotónico (solución de Ringer) para *Thiobacillus thiooxidans*: medio de cultivo indicado para mantener vivo al microorganismo pero no para un gran desarrollo del mismo. En la Tabla 3.15, se puede observar los componentes de medio de cultivo.

Componente	Cantidad (g)
NaCl	8,4
KCl	0,4
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,34
Agua	1000

Tabla 3.15.- Composición de la solución de Ringer para *Thiobacillus thiooxidans*.

- Microorganismo del ensayo: el cultivo de *Thiobacillus thiooxidans* utilizado en esta fase experimental fue obtenido de la ATCC (American Type Culture Collection) con código de referencia ATCC 19377.
- Cámara estanca (Figura 3.18a): recipiente en el cual se realiza el periodo de incubación de las muestras de hormigón en ambiente de H₂S a una concentración 250 ppmv. Esta concentración de H₂S se consigue mediante la mezcla de 100 ml de solución Na₂S al 4% con 100 ml de HCl 1,5 N.
- Cromatógrafo iónico: equipo con el que se cuantifica la concentración de Ca²⁺ en el medio de cultivo
- Espectrofotómetro de UV-Visible (Figura 3.18b): equipo mediante el que se realiza la determinación de la concentración de SO₄ en el medio de cultivo.
- Elementos auxiliares como: pipetas con capacidad nominal de 1,0 ml y 15,0 ml, hisopos (Figura 3.18c) y agua con una conductividad de <1 μS / cm.



Figura 3.18.- Equipos empleados en el estudio: a) cámara estanca, b) espectrofotómetro UV-visible y c) hisopo para recuperación del cultivo.

3.10.2. Procedimientos de los ensayos

Dentro de este punto se diferencian los métodos seguidos en la realización de los dos ensayos realizados: ensayo por inmersión y ensayo por impregnación.

Ensayo por inmersión

El ensayo por inmersión fue realizado por duplicado utilizando los dos medios de cultivos definidos anteriormente, medio de cultivo específico para el desarrollo del *Thiobacillus thiooxidans*, y medio de cultivo isotónico. La duración de este ensayo es de 51 días, distribuidos en 3 ciclos de 17 días cada uno, tal como se muestra en la Figura 3.19a y cada ciclo, a su vez, consta de las 4 etapas siguientes:

1. **Incubación en cámara estanca.** Las muestras de hormigón se incubaron en una atmósfera de ácido sulfhídrico a una concentración de 250 ppm, durante 3 días.
2. **Incubación en la solución con el *Thiobacillus thiooxidans* inoculado.** Cada uno de los especímenes de hormigón se sumerge en 150 ml de medio de cultivo, al que

se le añade 1.5 ml de la suspensión de microorganismo con una concentración de 1×10^9 UFC (unidades formadoras de colonias)/ml, se cubren y se incuban durante 10 días (Ver Figura 3.19b).

Los recipientes permanecieron en rotación a una velocidad de 90 rpm. Durante el proceso de incubación se extraen 4 muestras de medio de cultivo los días 1, 4, 6 y 9 de cada ciclo para poder determinar la cantidad de Ca^{2+} y SO_4^{2-} y se conservan refrigerados hasta su análisis.

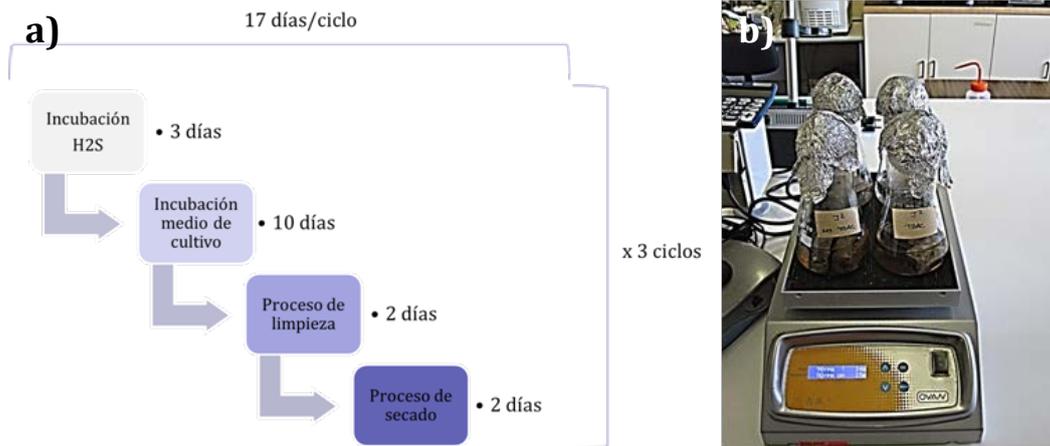


Figura 3.19.- (a) Diagrama de ensayos por inmersión y (b) proceso de incubación.

3. **Lavado.** Las muestras de hormigón se lavan en agua Milli-Q durante 2 días mediante agitadores rotatorios.
4. **Secado.** La duración del proceso de secado de las muestras fue de 2 días.

Una vez finalizados los 3 ciclos de los que consta esta fase experimental se realizan las siguientes evaluaciones:

- Determinación del peso de los especímenes: antes de empezar cada ciclo y después de acabarlo se pesaron cada uno de los especímenes de hormigón sometidos a ensayo.
- Determinación de la concentración de Ca^{2+} de cada una de las muestras extraídas durante los 3 ciclos de ensayo.
- Determinación de la concentración de SO_4^{2-} de cada una de las muestras extraídas durante el proceso de ensayo.

Ensayo por impregnación

El ensayo por impregnación consiste en embeber la superficie de hormigón, tratado y sin tratar, con una suspensión que contiene *Thiobacillus thiooxidans*, esta

operación se realiza por duplicado utilizando dos suspensiones con dos concentraciones de microorganismos diferentes.

1. **Preparación de las suspensiones.** El primer paso que se realizó fue extraer *Thiobacillus thiooxidans* desde la placas de cultivo y re-suspenderlo en la solución de Ringer mediante el uso de un hisopo, e incubarlo hasta alcanzar las concentraciones adecuadas de microorganismo requeridas, siendo éstas comprobadas en primera instancia por comparación con la escala MacFaarland y posteriormente mediante siembra en placas de Agar. En este estudio se emplearon dos concentraciones diferentes, alta concentración de microorganismos: 1×10^9 UFC/ml y baja concentración: 1×10^6 UFC/ml.
2. **Impregnación de la superficie de hormigón.** Una vez obtenida las soluciones se impregnan con cada una de ellas las superficies de las probetas de hormigón, tanto las probetas tratadas como las probetas no tratadas. Este proceso se realiza por duplicado obteniendo por tanto 16 muestreos.
3. **Recuperación de la solución.** Las muestras se recuperaron de cada una de las probetas mediante el uso de un hisopo estéril y se siembran en el medio de cultivo para *Thiobacillus thiooxidans*. Este proceso se realiza en 5 momentos puntuales: momento inicial, día 1, día 4, día 6 y día 9, con el fin de poder evaluar el desarrollo del microorganismo con el paso del tiempo.
4. **Incubación.** Las placas de Petri sembradas se incuban 10 días a 37°C .
5. **Recuento.** Una vez se han desarrollado las colonias se realizó determinación de presencia de las mismas

3.10.3. Expresión de los resultados

Resultados del ensayo por inmersión.

- Evolución de la concentración de Ca^{2+} y SO_4 : los resultados de los análisis para la determinación de la concentración de Ca^{2+} y SO_4 se expresan en ppm.
- Pérdida de masa: los valores de peso de los especímenes de hormigón obtenidos tras cada uno de los 3 ciclos de los que consta el ensayo, se expresan en % de pérdida de peso.

Resultados del ensayo por impregnación.

Los resultados extraídos del ensayo por impregnación se expresan como en número de colonias formadas en cada placa de Petri.

4. AGENTES ANTIMICROBIANOS MONOCOMPONENTE

4.1. INTRODUCCIÓN

Tras la explicación de la metodología experimental presentada en el capítulo anterior, el objetivo del presente capítulo es mostrar el resultado de los ensayos realizados en laboratorio para evaluar la eficacia de los agentes antimicrobianos monocomponente, entendiendo como tales aquellos formulados que sólo tienen un principio activo en su composición. Los resultados obtenidos se clasifican en tres categorías: la primera incluye los ensayos de caracterización de las principales propiedades del hormigón, la segunda corresponde a los ensayos de determinación de lixiviación del principio activo y por último, en la tercera fase se realizaron los ensayos microbiológicos.

Los ensayos físicos mediante los que se evalúan las principales propiedades del hormigón permiten conocer la influencia que tiene sobre las mismas la adición de un agente antimicrobiano determinado. Dentro de esta categoría se miden los siguientes parámetros: consistencia, densidad en estado fresco y en estado endurecido y por último, resistencia a 1, 7 y 28 días. Los ensayos mecánicos, tanto la resistencia a compresión como a flexotracción, se realizaron a 5° y 20° C, con el fin de evaluar la posible influencia del producto antimicrobiano en el desarrollo de las resistencias en condiciones de temperatura distintas. En todos los resultados de las medidas de las resistencias, tanto a compresión como a flexotracción, se proporciona el valor medio de dos medidas.

La segunda fase de ensayos, la determinación de lixiviación del principio activo, solamente se realizó con los formulados que no alteraron de forma significativa las prestaciones mecánicas del hormigón.

Por último, únicamente los formulados que superaron la fase de ensayo de determinación de lixiviación fueron sometidos a la fase de ensayos microbiológicos. Esta fase de ensayos se divide en dos etapas: ensayos microbiológicos iniciales y finales. Los primeros corresponden a una primera fase de ensayos antes de someter a las muestras de hormigón al proceso de envejecimiento descrito en el capítulo 3, mientras que la segunda fase se realiza una vez realizado este proceso y sólo fue realizada con las muestras de hormigón que presentaron actividad antimicrobiana en la primera fase de ensayos microbiológicos.

4.2. RESULTADOS ENSAYOS DE LABORATORIO

4.2.1. Formulado BXT/AB

El primer formulado empleado fue el denominado BXT/AB, cuyo principio activo es el 2,4,4'-Tricloro-2' hidroxidifeniléter, de nombre comercial IRGASAN DP 300®. En este formulado, siguiendo las indicaciones del fabricante del principio activo, se utilizó el propilenglicol como disolvente, ya que es el producto que garantiza una mejor solubilización del IRGASAN DP 300®, puesto que al ser un producto altamente insoluble en agua, el formulado no puede contener dicha base. Según la experiencia con el uso de este biocida para otras aplicaciones como por ejemplo conservante para pinturas, es conocido que el empleo de este principio activo conlleva una mayor generación de espuma, por oclusión de aire en el hormigón.

Con el fin de mantener los valores de densidad del hormigón dentro de unos niveles similares a la densidad del hormigón de referencia, se adicionan dos agentes desaireantes al formulado, BUBLEX® y TIBP. El primero es un desaireante no iónico que facilita la eliminación de las burbujas ocluidas que se forman durante las operaciones de fabricación del hormigón. Por su parte, el triisobutil fosfato (TIBP) es un compuesto derivado del fósforo, que también tiene función desaireante/ antiespumante.

Con el formulado BXT/AB se ensayaron cuatro dosificaciones diferentes, que fueron desde 0,01% a 0,15% spms, que son las dosis mínima y máxima respectivamente que recomienda el fabricante. En la Tabla 4.1 se presentan los datos de identificación del formulado empleado en primer lugar, el BXT/AB, incluyendo sus características, las dosificaciones empleadas, así como los resultados obtenidos en los ensayos físicos. En ella, la nomenclatura spms de las dosificaciones representa el porcentaje sobre peso de masa seca. Los ensayos con los que se ha hecho cada una de las determinaciones se ha presentado en el capítulo 3. Estas observaciones sirven para el resto de tablas que se incluyen en el presente capítulo.

Formulado BXT / AB	Composición				
	PROPILENGLICOL IRGASAN DP 300®			TIBP BUBLEX®	
Principio activo	2,4,4'-Tricloro-2'-hidroxi-difenil-éter				
Características físicas	Producto líquido solubilizado en propilenglicol				
Propiedades	Bactericida fungicida				
Dosificaciones ensayos (% spms)	0	0,01	0,05	0,1	0,15
Resultados ensayos físicos					
Consistencia (mm)	117	120	125	128	124
Densidad en estado fresco (g/l)	2389	2420	2395	2467	2397
Densidad en estado endurecido (g/l)	2359	2320	2335	2365	2342

Tabla 4.1.- Datos de identificación y características del formulado BXT/AB

Los resultados físicos muestran que la adición del formulado BXT/AB produce un ligero aumento de la consistencia del material, si bien es una variación inferior al 5 % que puede ser debida a los errores asociados al proceso de medida o a la función surfactante del compuesto. Se aprecia así mismo que la adición de este formulado no varía significativamente la densidad del material, tanto en estado fresco como en estado endurecido, de modo que los primeros resultados indican que este formulado no modifica de manera significativa las propiedades físicas del material.

Los resultados de los ensayos mecánicos realizados en las muestras del formulado BXT/AB se muestran en la Figura 4.1, tanto las medidas de resistencia a la compresión (Figura 4.1a), como las medidas de resistencia a la flexotracción (Figura 4.1b), obtenidos a las edades de 1, 7 y 28 días, para diferentes temperaturas: temperatura ambiente (20° C) y temperaturas a 5° C.

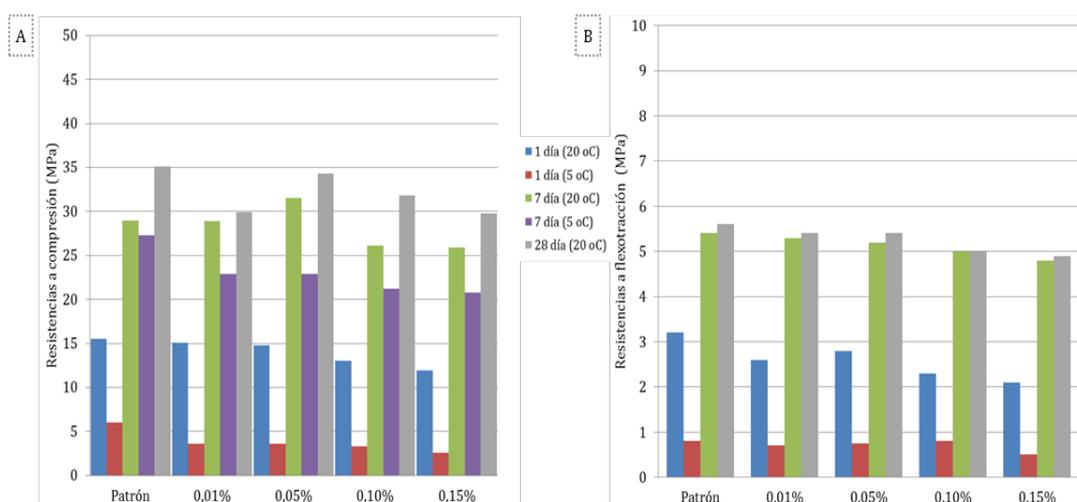


Figura 4.1.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT/AB: a) compresión y b) flexotracción

En dicha figura se puede apreciar que la adición del formulado BXT/AB afecta a las propiedades mecánicas del material, específicamente a las resistencias a compresión de edades tempranas; se aprecia que, con respecto al patrón, a 1 y 7 días se da una bajada de un 33% y un 20%, respectivamente, en la adquisición de resistencias. Este comportamiento a edades tempranas puede ser debido a la interferencia en el proceso de hidratación del cemento por parte del IRGASAN DP 300®, afectando a la velocidad de la reacción cemento-agua. Este hecho se acentúa en los ensayos realizados a baja temperaturas, ya que la mayor diferencia en esta serie de ensayos se da a 5° C y a la máxima dosificación, llegando ésta a ser un 55% menor.

Por su parte, las resistencias obtenidas a 28 días muestran una ligera recuperación, si bien son ligeramente inferiores al valor de referencia, con una disminución de hasta un 18 %, por lo que se puede afirmar que no sólo afecta a la velocidad del proceso de hidratación del cemento, sino que también afecta a eficiencia del proceso.

Del mismo modo que sucede con las resistencias a compresión, las resistencias a flexotracción tras la adición del formulado BXT/AB son menores a las obtenidas con hormigón patrón, si bien, las diferencias son menores. La máxima diferencia se encuentra 1 día y a 20° C, llegando a ser de un 35%. En cambio, que a edades iniciales y a baja temperatura la diferencia es mínima, pudiendo ser debida a la variabilidad del ensayo. Por su parte, los valores de resistencias a flexotracción de los hormigones que contienen el formulado BXT/AB a 7 y 28 días se mantienen muy próximos a los del hormigón de referencia, dándose una diferencia máxima del 10 y 11% respectivamente.

Debido a los descensos observados en las resistencias mecánicas del material y a que el formulado es una solución inestable, éste no ha sido considerado apto. Por lo tanto, no se realizaron el resto de ensayos posteriores

4.2.2. Formulado BXT/11

En la Tabla 4.2 se presentan los datos de identificación del formulado BXT/11, incluyendo sus características, las dosificaciones empleadas, así como los resultados físicos obtenidos. Los ensayos se realizaron de forma paralela y como ensayos complementarios a los realizados con el formulado BXT/AB, ya que en ambos casos se utiliza el mismo principio activo, IRGASAN DP 300®.

En ambos formulados la concentración de principio activo se mantuvo constante, pero en el caso del formulado BXT/11 se buscaba reducir la proporción de propilenglicol, sustituyéndolo por agua con el fin de mejorar la estabilidad del formulado. La solución planteada fue formular el principio activo mezclando el propilenglicol con agua, dando lugar al formulado BXT/11. En este formulado, al usar menos propilenglicol, se redujo la proporción de desaireante, utilizándose solamente TIBP. Las dosificaciones empleadas en esta serie de ensayos fueron mayores con el fin de evaluar de un mayor rango de dosificación de principio activo.

Formulado BXT / 11	Composición (%)				
	PROPILENGLICOL IRGASAN DP 300®	TIBP AGUA			
Principio activo	2,4,4'-Tricloro-2'-hidroxi-difenil-eter				
Características físicas	Producto líquido solubilizado en propilenglicol y agua				
Propiedades	Bactericida fungicida				
Dosificaciones ensayos (% spms)	0	0,15	0,18	0,2	0,22
Resultados ensayos físicos					
Consistencia (mm)	117	118	122	121	124
Densidad en estado fresco (g/l)	2389	2005	2044	2122	2174
Densidad en estado endurecido (g/l)	2359	1993	2124	2054	2123

Tabla 4.2.- Datos de identificación y características del formulado BXT/11

En el formulado BXT/11 es muy significativo el descenso en la densidad con respecto al hormigón patrón, tanto en estado fresco como en estado endurecido; este hecho, junto con el incremento en la consistencia, hace suponer que la adición del formulado BXT/11 favorece la presencia de aire ocluido en el hormigón. Por lo tanto, si comparamos los datos de densidades obtenidos en la serie de BXT/AB, se puede afirmar que la adición de IRGASAN DP 300® produce la oclusión de aire en el hormigón y se hace necesaria una mayor cantidad de desaireante en el formulado.

Otro aspecto destacable es que el incremento en la dosificación del agente antimicrobiano no produzca una mayor disminución de la densidad, sino todo lo contrario; según aumenta el contenido se produce un aumento en la densidad. Una posible explicación a este fenómeno es que a medida que aumenta la dosificación de formulado también aumenta la proporción de agente desaireante que se incorpora al hormigón, reduciendo de este modo la oclusión de aire.

Los resultados de los ensayos mecánicos se presentan en la Figura 4.2, tanto los correspondientes a la resistencia a compresión (Figura 4.2a), como a flexotracción (Figura 4.2b), para tres edades diferentes (1,7 y 28 días) y tanto a temperatura ambiente como a 5° C. Al igual que pasaba con los valores de densidad, se aprecia un fuerte descenso en las resistencias de los hormigones fabricados con el formulado BXT/11, con respecto a las resistencias obtenidas por el material de referencia, a todas las edades y sin diferenciación en función de la temperatura.

Los valores de resistencias a compresión siguen la misma tendencia que los valores de densidad, aumentando la resistencia a medida que se aumenta la dosificación del formulado. Otro aspecto remarcable es la gran influencia que conlleva el empleo de BXT/11 sobre el desarrollo de resistencias iniciales, especialmente a bajas temperaturas, reproduciéndose de nuevo el mismo comportamiento que con el formulado BXT/AB. Las resistencias iniciales se ven reducidas de manera significativa, especialmente en los ensayos realizados a 5° C donde la reducción de las resistencias alcanza el 70%.

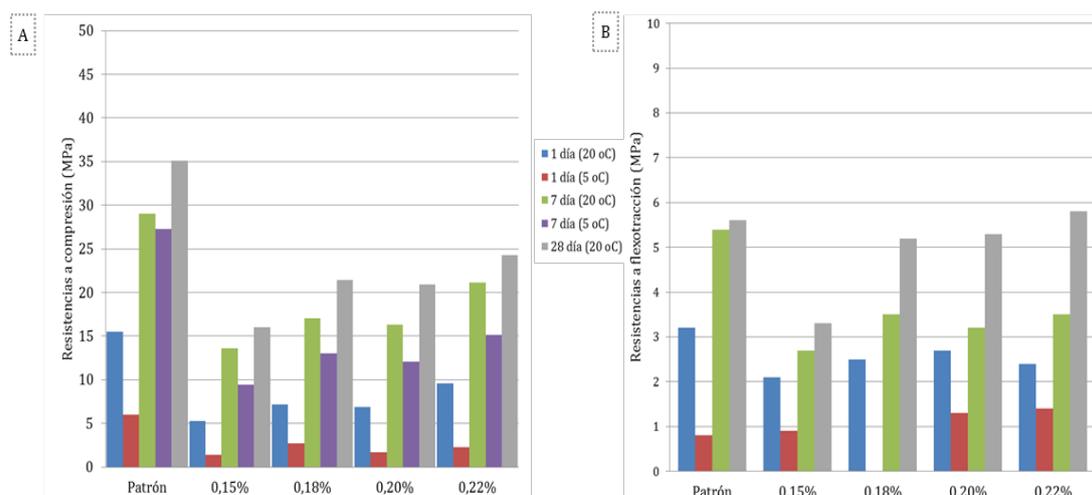


Figura 4.2.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT/11: a) compresión y b) flexotracción

Respecto a los valores de resistencias a flexotracción, se puede observar que, si bien los valores de resistencias obtenidos en el hormigón patrón son superiores al resto, las diferencias son mucho menos sensibles que en el caso de las resistencias a compresión. Cabe comentar el escaso crecimiento que se observa en el hormigón referencia de 7 a 28 días y es atribuible a un error propio del ensayo, debido a que en el resto de ensayos de la serie no se repite este hecho. Del mismo modo que sucede en la serie anterior, la influencia de la temperatura en el desarrollo de las resistencias a flexotracción a edades tempranas es mucho menor que la observada en los valores de resistencias a compresión, donde los valores son muy similares.

Parece claro concluir que el formulado BXT/11 no se considera un producto válido para el fin diseñado, debido a la gran merma de resistencias que conlleva su adición al hormigón y su inestabilidad como solución líquida. Por lo tanto, se desestima la realización del resto de ensayos

4.2.3. Formulado ACTICIDE MBP®

El ACTICIDE MBP® es un agente antimicrobiano que permitirá estudiar otro de los principios activos disponibles en el mercado. Siguiendo las indicaciones del fabricante se realizaron las pruebas adicionando el producto sin formular, es decir, sin diluirlo en ningún disolvente. La concentración de principio activo (1,2-bencilisotiazolin-3-ona+2-metil-4-isotiozolin-3-ona) es del 11%.

En la Tabla 4.3 se presentan los datos de caracterización del formulado ACTICIDE MBP®, incluyéndose las características físicas, las dosificaciones empleadas, así como los resultados físicos obtenidos. En esta serie de ensayos tampoco se le añade ningún agente desaireante al formulado, por lo que se podrá evaluar la posible influencia que tiene este producto en la oclusión de aire en el hormigón.

Formulado ACTICIDE MBP®	Composición			
	ACTICIDE MBP®			
Principio activo	1,2-bencilisotiazolin-3-ona + 2-metil-4-isotiozolin-3-ona			
Características físicas	Producto sólido			
Propiedades	Bactericida fungicida			
Dosificaciones ensayos (% spms)	0	0,1	0,4	0,8
Resultados ensayos físicos				
Consistencia (mm)	157	155	154	153
Densidad en estado fresco (g/l)	2526	2473	2500	2473
Densidad en estado endurecido (g/l)	2472	2400	2427	2397

Tabla 4.3.- Datos de identificación y características del formulado MBP

De los resultados de los ensayos realizados con el formulado ACTICIDE MBP® muestran que la influencia de este sobre la consistencia es prácticamente nula, dándose una pérdida máxima de 3 mm. Lo mismo sucede con la densidad del hormigón donde el efecto del formulado es mínimo, observándose unas diferencias alrededor al 3%, tanto en densidades en fresco como en estado endurecido.

En referencia a los valores de resistencias, en la Figura 4.3 se muestran los valores de las resistencias a compresión (Figura 4.3a) y flexotracción (Figura 4.3b), a las edades y temperaturas consideradas en el resto de formulados.

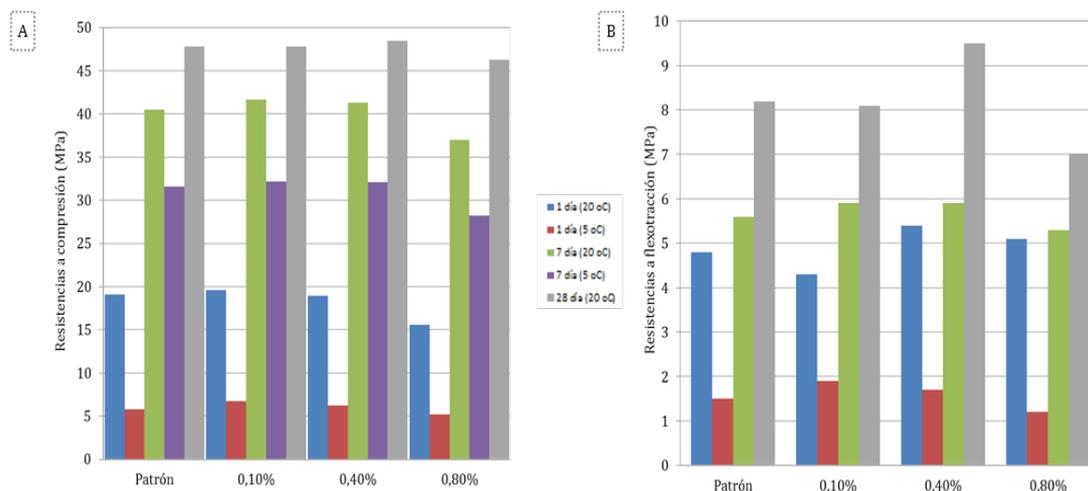


Figura 4.3.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado ACTICIDE MBP®: a) compresión y b) flexotracción

En ella se puede apreciar que la adición del formulado ACTICIDE MBP no tiene un efecto significativo en las resistencias del material, si se compara con la resistencia del material patrón. Este resultado es congruente con los valores obtenidos para consistencia y densidades en estado fresco y endurecido.

Los valores de resistencias a compresión no se ven afectados en gran medida por la incorporación del agente antimicrobiano, manteniéndose dentro de un mismo rango, siendo la máxima diferencia de un 8% en las resistencias a 1 día a 20° C a la mayor dosis, y destacando la escasa diferencia observada en los valores de resistencias a 28 días.

En términos generales, se puede afirmar que, del mismo modo que sucede con los valores de resistencias a compresión, los valores de resistencia a flexotracción no se ven afectados cuando se dosifica el agente antimicrobiano, si bien hay que remarcar que a altas dosificaciones del formulado, se observan unos valores de resistencias a 28 días un 12% menores que el hormigón referencia. Este fenómeno no es algo proporcional a la dosis, ya que, a dosis intermedias se obtienen valores de resistencia a flexotracción incluso superiores al patrón (15%). En cuanto a la influencia del producto en la velocidad de desarrollo de resistencia a edades iniciales a bajas temperaturas, se puede decir es nula, puesto que los valores se mantienen dentro del mismo orden.

Tras evaluar los resultados de los ensayos mecánicos y concluir que el efecto que tiene el formulado no altera las propiedades del hormigón de manera notable, se realizó el ensayo para la determinación de lixiviación del principio activo.

Determinación de la lixiviación del principio activo

En la Tabla 4.4 se muestran los resultados obtenidos tras la realización del ensayo de lixiviación, llevado a cabo tal y como se describe en el capítulo 3. En ella se muestran los resultados, expresados en mg/m²·día, de cada uno de los 9 días en los que se analizó la concentración de isotiazolinona mediante HPLC, así como, la cantidad total lixiviada durante el ensayo completo, como resultado de la suma de las determinaciones realizadas a cada una de las edades. Esta determinación se realiza con cada una de las muestras de cada dosificación además del patrón.

Dosis (%)	Concentración de principio activo en el disolvente (mg/m ² ·día)									
	Duración del proceso de lixiviación (días)									
	1	3	7	9	14	16	18	22	24	ΣTOTAL
Patrón	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,1	0,09	0,04	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,25
0,4	0,08	0,07	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04	0,03	0,00	0,42
0,8	0,31	0,20	0,19	0,18	0,16	0,16	0,14	0,14	0,14	1,62

Tabla 4.4.- Determinación de la lixiviación del principio activo, formulado ACTICIDE MBP®.

Tal y como se puede observar, la cantidad total de producto eluído después del proceso de lixiviación aumenta en función de la dosis empleada, es decir, a mayor dosis mayor cantidad de producto se libera. Cabe destacar que esta cantidad disuelta es mínima, incluso a la dosis más elevada, ya que 1,62 mg/m²·día equivaldrían a una lixiviación acumulada de 0,3 ppm, cantidad muy por debajo del nivel que puede considerarse tóxico

(LD₅₀ > 1200 mg/kg). Por lo tanto, se puede considerar que el formulado MBP es suficientemente insoluble para el uso deseado y se continuó con la fase de ensayos microbiológicos.

Evaluación de las propiedades antimicrobianas

En la Figura 4.4 se presentan los resultados de los ensayos microbiológicos realizados con el formulado ACTICIDE MBP®; se muestran las imágenes de los cultivos microbiológicos realizados con las tres dosificaciones estudiadas (0,1%, 0,4% y 0,8%) y con los tres microorganismos indicadores empleados: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger*. A partir de estas imágenes se han obtenido los índices de desarrollo de los microorganismos que se muestran en la Tabla 4.5.

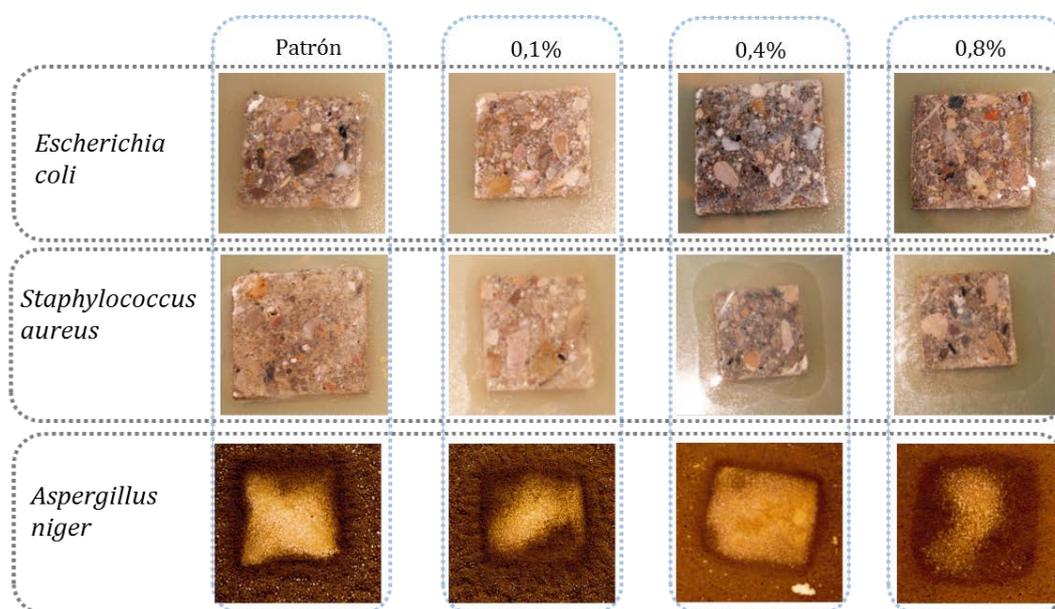


Figura 4.4.- Ensayos microbiológicos realizados con el formulado ACTICIDE MBP®

Microorganismo	Índice de desarrollo			
	Patrón	Dosis (%)		
		0,1	0,4	0,8
<i>Escherichia coli</i>	2	2	2	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	2	2	2	2

Tabla 4.5.- Interpretación de los ensayos microbiológicos realizados con el formulado ACTICIDE MBP®.

En lo que respecta al crecimiento de *Escherichia coli*, el formulado ACTICIDE MBP® no presenta actividad inhibidora de crecimiento. Para todas las dosificaciones se aprecia crecimiento en superficie y ausencia de halo de inhibición (ver Figura 4.4), presentando un índice de desarrollo de 2 a todas las dosis empleadas (ver Tabla 4.5). Se aprecia un

comportamiento similar frente al crecimiento de *Aspergillus niger*, sin que el formulado presente actividad antimicrobiana frente a este microorganismo.

En cuanto a la actividad del formulado ACTICIDE MBP® frente al *Staphylococcus aureus*, cabe remarcar que presenta un buen comportamiento a todas las dosificaciones (índice de desarrollo de 0), impidiendo tanto el crecimiento en superficie como creando un halo de inhibición de desarrollo alrededor de la muestra; este halo de crecimiento se ve con mayor claridad a medida que se aumenta el contenido del formulado en la dosificación del hormigón (ver Figura 4.4).

La conclusión de esta serie es que el formulado no presenta actividad frente a dos de los tres microorganismos ensayados y, en consecuencia, se considera no apto, y por lo tanto, no será sometido a la fase de envejecimiento y a la posterior fase de ensayos microbiológicos.

4.2.4. Formulado Biopol D212

El Biopol D212 fue escogido para evaluar su potencial como agente fungicida y en función de los resultados obtenidos formularlo en combinación con productos bactericidas para conseguir un rango de acción más amplio (Ver Tabla 4.6). Del mismo modo que el formulado anterior, no se utilizaron productos adicionales según las indicaciones del suministrador, ya que la capacidad de dispersión del producto es suficientemente alta sin necesidad de diluirlo en un disolvente; del mismo modo, el suministrador también indica que la utilización de este principio activo no conlleva la oclusión de aire en el hormigón.

Formulado BIOPOL D211®	Composición			
	BIOPOL D 212®			
Principio activo	1,2,36-tetrahidro-N-tricolorometilo-ftalamida			
Características físicas	Producto sólido			
Propiedades	Fungicida			
Dosificaciones ensayos (% spms)	0	0,1	0,2	0,3
Resultados ensayos físicos				
Consistencia (mm)	155	153	156	157
Densidad en estado fresco (g/l)	2389	2351	2361	2357
Densidad en estado endurecido (g/l)	2361	2290	2317	2315

Tabla 4.6.- Datos de identificación y características del formulado Biopol D 212®.

En la citada Tabla 4.6 se representan las características físicas y dosificación del formulado Biopol D 212®, así como las propiedades físicas de los hormigones fabricados. Según las especificaciones del producto, el rango de acción se encuentra entre el 0,1% y 0,3%, seleccionando tres dosificaciones comprendidas dentro de este rango. Tanto los valores de consistencia como los valores de densidad no se ven afectados de forma notable

por la adición del formulado Biopol D 212®, observándose diferencias en las densidades menores al 2% y de menos de 3 mm en la consistencia, respecto al hormigón referencia. Estos resultados muestran que la influencia del formulado en las propiedades físicas del hormigón es, en primera instancia, mínima.

La evolución de las propiedades mecánicas para las diferentes dosificaciones del formulado Biopol D 212® se detallan en la Figura 4.5, mostrándose los resultados tanto de resistencia a compresión (Figura 4.5a), como a flexión (Figura 4.5b). Se puede observar que los valores obtenidos empleando una dosis del 0,2% muestran un comportamiento anómalo, puesto que tanto a una dosificación mayor (0,3%) como a una dosificación menor (0,1%), las resistencias a compresión son incluso mayores que el patrón, de tal modo que no serán tenidos en cuenta en el análisis al poder ser un error experimental. Por su parte, en el resto de dosificaciones la influencia del formulado Biopol D 212® es mínima, llegando a alcanzarse resistencias superiores a las obtenidas en el hormigón patrón a los 28 días de curado.

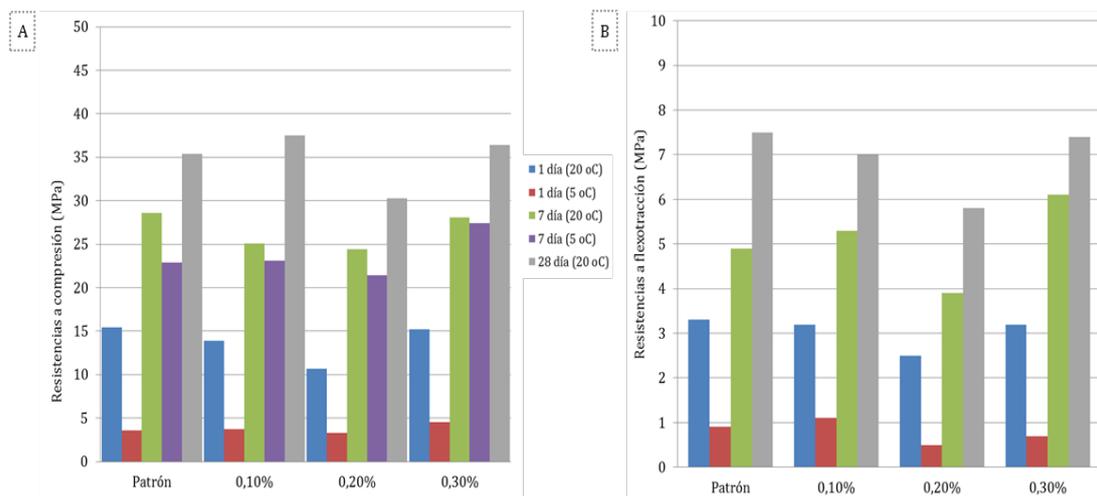


Figura 4.5.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado Biopol D 212®: a) compresión y b) flexotracción

En referencia a las resistencias a flexotracción, observando los valores de la Figura 4.5b se ve claramente que se reproduce la misma tendencia que en las resistencias a compresión, obteniéndose valores inferiores al patrón usando la dosificación 0,2%, mientras que en el resto de la serie los valores de resistencia a compresión se mantienen al mismo nivel que la referencia. En cuanto a la influencia del formulado Biopol D 212® en el desarrollo de resistencias, se puede afirmar que no es un hecho notable, puesto los valores de resistencias iniciales, tanto a 5° C como a 20° C, se mantienen dentro del mismo orden durante toda la serie. Dado

Determinación de la lixiviación del principio activo

En vista de que el formulado Biopol D 212® no modifica las propiedades físicas del hormigón, se procedió a realizar los ensayos de lixiviación del principio activo. Los datos obtenidos (ver Tabla 4.7), expresados en mg/m²-día, se obtuvieron de la misma manera

que para el formulado ACTICIDE MBP®, en el que se determina la concentración de ftalamida en el disolvente mediante HPLC, después de cada uno de los nueve ciclos de lixiviación. La determinación se realiza para cada una de las dosificaciones estudiadas además del patrón.

Concentración de principio activo en el disolvente (mg/m ² -día)										
Dosis (%)	Duración del proceso de lixiviación (días)									
	1	3	7	9	14	16	18	22	24	ΣTOTAL
Patrón	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,1	6,75	2,80	2,65	2,10	1,50	1,35	0,75	0,40	0,25	18,55
0,2	12,25	5,00	4,62	3,92	2,70	2,43	1,15	0,95	0,45	33,46
0,3	21,60	8,96	8,48	6,72	4,80	4,32	2,40	1,28	0,80	59,36

Tabla 4.7.- Determinación de la lixiviación del principio activo, formulado Biopol D212®.

El formulado Biopol D 212® es un producto mucho más soluble en agua que el formulado MBP, y aunque los niveles liberados en la dosis máxima no suponen un peligro (LD50 > 9000 mg/kg), su solubilidad tan elevada podría provocar una pérdida de eficiencia biostática en un corto periodo de tiempo. Consecuentemente, el formulado Biopol D 212® se considera un producto excesivamente soluble y no se considera apto, por lo que no se realizaron los ensayos de eficacia biostática.

4.2.5. Formulado Vantocil IB®

El Vantocil IB® fue escogido por pertenecer a la familia de las biguanidas, familia de bactericidas-fungicidas ampliamente conocida y empleada en numerosos campos de aplicación. El producto se suministra en forma de solución acuosa al 20% de materia activa y se añade al hormigón directamente, sin adicionarle agentes desaireantes.

En la Tabla 4.8 se detallan los datos del formulado Vantocil IB®, sus características físicas, el principio químico, las dosificaciones empleadas en los ensayos de laboratorio y los resultados físicos obtenidos. En esta serie, igual que en las anteriores series, las dosificaciones empleadas fueron determinadas teniendo en cuenta el rango de dosificaciones recomendadas por el fabricante, ensayándose en este caso 3 dosificaciones entre el 0,3% y el 1% spms.

Formulado VANTOCIL IB®	Composición			
	VANTOCIL IB®			
Principio activo	Clorhidrato de poli-hexametilen-biguanida			
Características físicas	Solución acuosa			
Propiedades	Bactericida fungicida			
Dosificaciones ensayos (% spms)	0	0,3	0,6	1
Resultados ensayos físicos				
Consistencia (mm)	155	130	125	130
Densidad en estado fresco (g/l)	2389	2348	2356	2345
Densidad en estado endurecido (g/l)	2359	2292	2316	2399

Tabla 4.8.- Datos de identificación y características del formulado Vantocil IB.

Como principal aspecto a destacar de esta serie de ensayos es la pérdida de consistencia que provoca la adición de este producto; durante la fabricación del hormigón se apreció un aumento en su viscosidad, lo cual puede justificar el menor escurrimiento apreciado. Referente a las densidades, se descarta que el principio tenga ninguna influencia sobre este parámetro, puesto que los valores obtenidos en el hormigón patrón son muy similares a los del resto de valores de la serie, tanto en estado fresco como en estado endurecido.

Los resultados de los ensayos mecánicos muestran de nuevo poca influencia de la adición del formulado Vantocil IB®. La evolución de las resistencias a compresión, presentada en la Figura 4.6a, muestra claramente que la adición de este principio químico no altera estos valores a ningún nivel de dosificación, sin bien se aprecia una reducción de las resistencias a 1 día y 5°C (-20%) en los hormigones tratados respecto al patrón. El resto de valores de resistencias a compresión se mantienen dentro de un mismo orden.

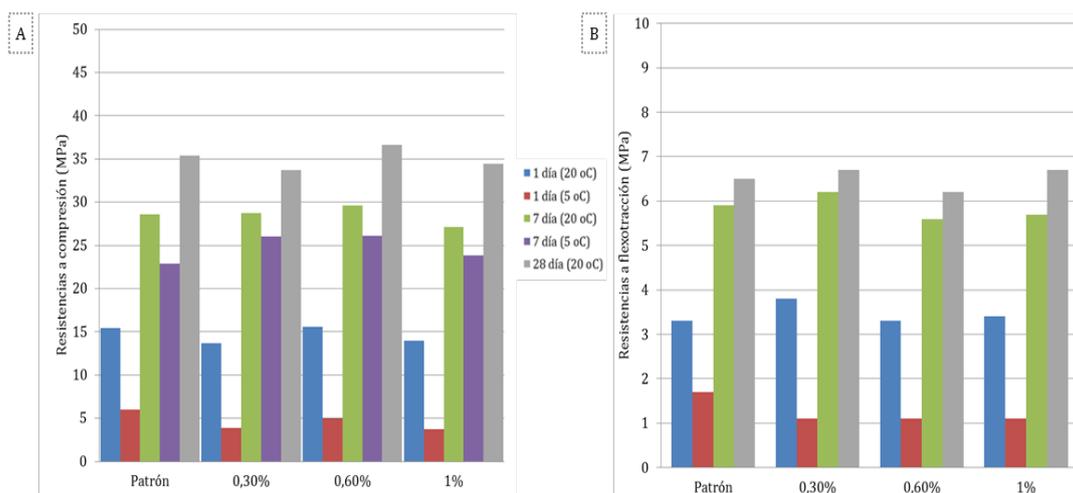


Figura 4.6.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado Vantocil IB®: a) compresión y b) flexotracción.

Uno de los puntos a destacar de esta serie es que los datos de resistencias a compresión a 28 días más elevados se alcanzan con la dosificación 0,6%, que corresponde al ensayo en el que el hormigón tiene un menor escurrimiento. Este comportamiento confirma que la adición del producto provoca una pérdida de consistencia pero no una reducción en las resistencias finales. Con respecto a las resistencias a flexotracción (Figura 4.6b), destacar que se produce el mismo fenómeno que en las resistencias a compresión, donde sólo se aprecian diferencias entre hormigón con Vantocil IB® y hormigón patrón en edades tempranas a bajas temperaturas.

Determinación de la lixiviación del principio activo

En vista de los resultados de caracterización de las propiedades físicas, se procedió a realizar los ensayos de lixiviación del principio activo, de manera análoga a las anteriores muestras, mostrándose los resultados en la Tabla 4.9.

Dosis (%)	Concentración de principio activo en el disolvente (mg/m ² -día)									
	Duración del proceso de lixiviación (días)									
	1	3	7	9	14	16	18	22	24	ΣTOTAL
Patrón	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,3	11,16	5,08	4,56	3,11	2,93	2,68	1,39	0,87	0,38	32,15
0,6	16,90	10,55	9,18	8,60	5,51	4,05	1,90	1,61	0,59	58,89
1	33,96	13,88	13,51	10,51	8,86	6,66	3,84	2,55	1,25	95,02

Tabla 4.9.- Determinación de la lixiviación del principio activo formulado Vantocil IB®.

Del mismo modo que sucede en los ensayos de lixiviación realizados con el formulado Biopol D 212®, el formulado Vantocil IB®, también muestra unos resultados de lixiviación superiores a los observados en los ensayos realizados con el formulado ACTICIDE MBP®. Estos valores eran esperables puesto, que se trata de una solución acuosa y por lo tanto fácilmente lixiviable en agua. Por lo tanto, el formulado Vantocil IB®, se considera un producto excesivamente soluble y no se considera apto.

A pesar de que todos los parámetros evaluados no se han visto alterados por el empleo de Vantocil IB®, no se realizaron los ensayos de eficacia biostática debido a la alta solubilidad del producto. Aunque el nivel de solubilidad del producto en agua no es extremadamente elevado, se descarta para evitar riesgos potenciales y una posible disminución del efecto biostático con el tiempo.

4.2.6. Formulado Vanquish 100®

El Vanquish 100® es un bactericida fungicida perteneciente a una de las familias de agentes antimicrobianos más utilizados, las isotiazolinonas. Se presenta en forma de solución acuosa, con una concentración de materia activa del 95% - 97%. Del mismo modo que en el caso del formulado ACTICIDE MBP®, Biopol D 211® y el Vantocil IB®, el Vanquish 100® se adiciona al hormigón sin agregar agentes desaireantes.

En la Tabla 4.10 se muestra la información sobre el producto químico, características físicas, principio activo, así como sus propiedades como agente antimicrobiano y las dosificaciones recomendadas por el fabricante que fueron empleadas. Debido a su alta concentración, las dosificaciones de uso recomendadas de este producto son mucho menores que en con los anteriores formulados, situándose su rango de dosificación entre el 0,002% y el 0,05% spms.

Formulado VANQUISH - 100®	Composición					
	VANQUISH 100®					
Principio activo	N-Butil-1,2-Benzisotiazolin-3-ona					
Características físicas	Producción acuosa					
Propiedades	Bactericida fungicida					
Dosificaciones ensayos (% spms)	0	0,002	0,013	0,025	0,037	0,05
Resultados ensayos físicos						
Consistencia (mm)	155	152	152	153	156	150
Densidad en estado fresco (g/l)	2450	2392	2401	2417	2439	2427
Densidad en estado endurecido (g/l)	2385	2376	2344	2393	2396	2360

Tabla 4.10.- Datos de identificación y características del formulado Vanquish 100®.

La adición del formulado Vanquish 100® no tiene ninguna influencia notable en la consistencia o en la densidad del hormigón, ya sea en estado fresco o en endurecido. En cuanto a la consistencia, se puede apreciar que los valores oscilan entre los 156 mm y los 150 mm, considerando esta dispersión atribuible a la variabilidad del ensayo. Del mismo modo, los resultados de densidades obtenidos en estado fresco o endurecido se mantienen durante toda la serie dentro del mismo orden, alcanzando una diferencia máxima de 2% respecto al valor referencia.

En lo que respecta a los ensayos mecánicos (Figura 4.7), se aprecian diferencias significativas entre las muestras patrón y los hormigones fabricados con el formulado Vanquish 100®, llegando a presentar estas últimas una pérdida del 20% a 28 días. En cambio a 7 días estas diferencias se minimizan llegando en algún caso a superar los valores de resistencias de la referencia, tanto 5° C como a 20° C.

Por otro lado, en cuanto a las resistencias iniciales, la presencia de Vanquish 100® ralentiza la adquisición de resistencias a baja temperatura, viéndose disminuidas hasta en un 50%, si bien este comportamiento no se ve incrementado con el incremento de concentración del principio activo.

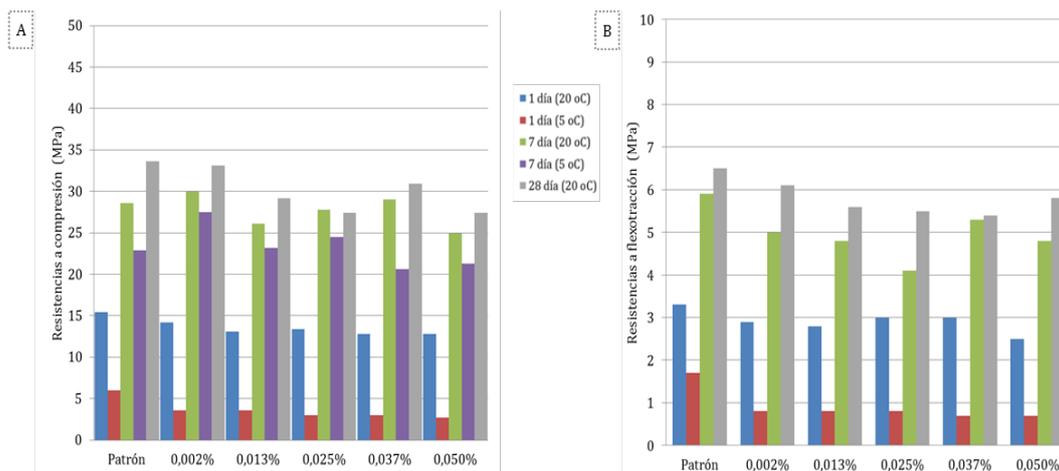


Figura 4.7.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado Vanquish 100®: a) compresión y b) flexotracción

En cuanto a los valores de las resistencias a flexotracción, tal y como se puede observar en la Figura 4.7, siguen la misma tendencia que en el caso de las resistencias a compresión, provocando una disminución de las resistencias a todas las edades. Del mismo modo, también se observa la gran influencia que tiene la presencia del Vanquish 100® en las resistencias iniciales a baja temperatura, con una reducción de resistencias frente a la muestra patrón de casi un 50%.

Una vez estudiados los efectos que tiene añadir Vanquish 100® al hormigón y considerando las consecuencias que provoca en los valores de resistencias iniciales, se considera un agente antimicrobiano no apto, y por lo tanto, no se realizaron los ensayos posteriores

4.2.7. Formulado Densil P®

El Densil P® es un producto líquido, con una concentración del 25% de principio activo, que se adiciona al hormigón puro. Al igual que otros principios activos estudiados, el Densil P® es un producto que combina la acción bactericida con la actividad fungicida. Las dosificaciones escogidas se encuentran dentro del rango de dosificación sugerido por el suministrador, entre el 0,2% -2% spms. En la Tabla 4.11 se especifican los datos de caracterización sobre el formulado Densil P, detallando las dosificaciones empleadas en la serie de ensayos, además de los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos muestran que el empleo de Densil P®, en las dosificaciones estudiadas, no tiene ningún tipo de repercusión, ni en la consistencia, donde las diferencias no llegaron al 4%, ni en la densidad del hormigón, donde se dieron diferencias entre el 1% y el 2% en estado fresco y endurecido respectivamente, si bien se aprecia una ligera tendencia a reducir la densidad del material, de manera más evidente en el estado endurecido, aunque con unos valores que pueden considerarse dentro del error experimental.

Formulado DENSIL P®	Composición				
	DENSIL P®				
Principio activo	Ditio-2-2'bis-benzometilamida				
Características físicas	Producto acuoso				
Propiedades	Bactericida fungicida				
Dosificaciones ensayos (% spms)	0	0,2	0,5	1	2
Resultados ensayos físicos					
Consistencia (mm)	154	154	155	155	159
Densidad en estado fresco (g/l)	2450	2435	2435	2435	2422
Densidad en estado endurecido (g/l)	2415	2400	2410	2391	2395

Tabla 4.11.- Datos de identificación y características del formulado Densil P®.

Los valores de resistencias mostrados en la Figura 4.8 ponen de manifiesto que a medida que se aumenta la dosis de Densil P® las resistencias del hormigón se ven claramente reducidas. Este efecto es especialmente claro en las resistencias a compresión (Figura 4.8a) a edades tempranas y a bajas temperaturas, llegando al extremo en las dosificaciones 1% y 2% en el que las probetas de hormigón no se pueden desmoldar.

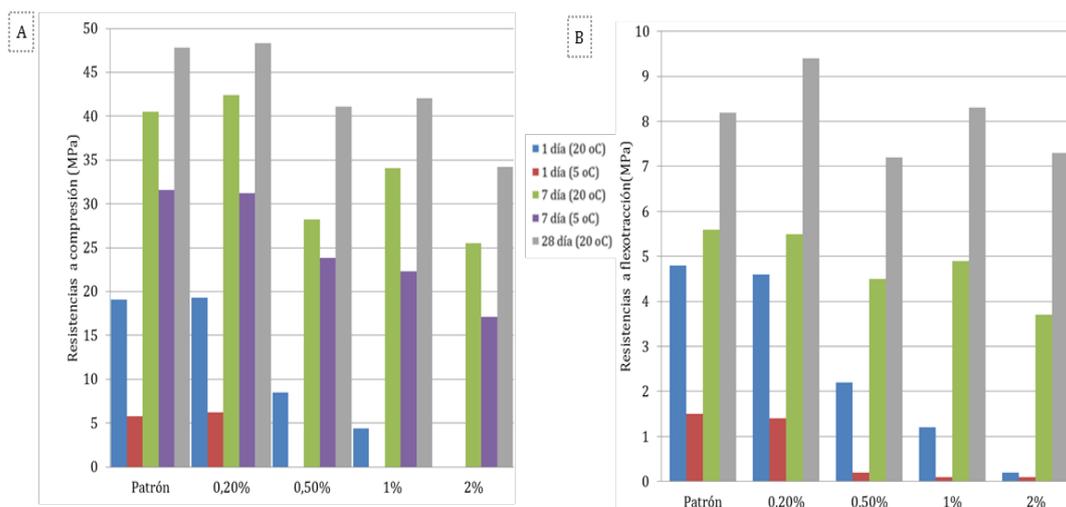


Figura 4.8.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado Densil P®: a) compresión y b) flexotracción

Puesto que las densidades del hormigón no presentaban una variación significativa, como se ha comentado anteriormente, la razón por la que se da esta disminución en los valores de las resistencias a compresión, puede ser debida a una posible interacción del principio activo en el proceso de endurecimiento del hormigón. Tan sólo las muestras con la menor dosis del principio activo (0,2%) presentan unas resistencias que son similares a las de la muestra patrón

Con respecto a las resistencias a flexotracción (Figura 4.8b), la tendencia es la misma que la observada en los valores de resistencia compresión, apreciándose una gran

influencia del aumento de la concentración del principio activo en el desarrollo de resistencias a bajas temperaturas. De nuevo, tan sólo la muestra con menor dosificación presenta un comportamiento mecánico aceptable. Tras evaluar los descensos observados en las resistencias mecánicas del material, este no ha sido considerado apto y no se realizaron el resto de ensayos.

4.2.8. Formulador P 24-81

El formulador P 24-81 contiene dos principios activos, por una parte piritionato de sodio y por otra benzoisotiazolona, ambos compuestos se utilizan en diversos campos, de forma separada, o como en este caso juntos. Ambos principios activos se encuentran a una concentración del 5%, sumando por tanto un 10% de principio activo total. El P 24-81 es un producto experimental, desarrollado específicamente para esta aplicación, por lo que sólo se estudiará una dosificación, de acuerdo a lo indicado por el fabricante. En la Tabla 4.12 se muestran las principales características del formulador P 24-84, incluyendo el principio activo, las características físicas del producto, las dosificaciones empleadas, y los resultados de la caracterización física.

Formulador P 24-81	Composición	
	P 24-81	
Principio activo	2-piridintiol-1-oxido Na + 1,2 benzoisotiazol-3(2H)ona	
Características físicas	Producto sólido	
Propiedades	Bactericida	
Dosificaciones ensayos (% spms)	0	0,3
Resultados ensayos físicos		
Consistencia (mm)	150	135
Densidad en estado fresco (g/l)	2432	2402
Densidad en estado endurecido (g/l)	2375	2359

Tabla 4.12.- Datos de identificación y características del formulador P 24-81.

A partir de los datos obtenidos se puede deducir que la adición del formulador P24-81, en la dosis estudiada, produce una reducción de la consistencia significativa. Este hecho puede justificarse porque la adición del bactericida modifica la reología del hormigón haciéndolo más viscoso. Desde el punto de vista de las densidades, se puede observar que la presencia de este producto en el hormigón produce una pequeña reducción en las densidades tanto en estado fresco como en estado endurecido, posiblemente por oclusión de aire, situándose las diferencias entre las densidades del hormigón patrón y la del hormigón tratado, por debajo del 1,5% en ambos casos.

En la Figura 4.9 se muestran los resultados obtenidos en la caracterización de las propiedades mecánicas de los hormigones fabricados con el formulador P 24-81. De forma general se puede apreciar que la adición del principio activo no afecta de forma clara a los

valores de resistencia a compresión (Figura 4.9a), salvo los obtenidos a edades tempranas (1 días), donde se dan diferencias del 25% en los ensayos realizados a una temperatura de 20° C y del 20% en los realizados a 5° C. Los valores de resistencias a compresión tanto a 7 días como a 28 días son muy similares a los obtenidos en la muestra patrón.

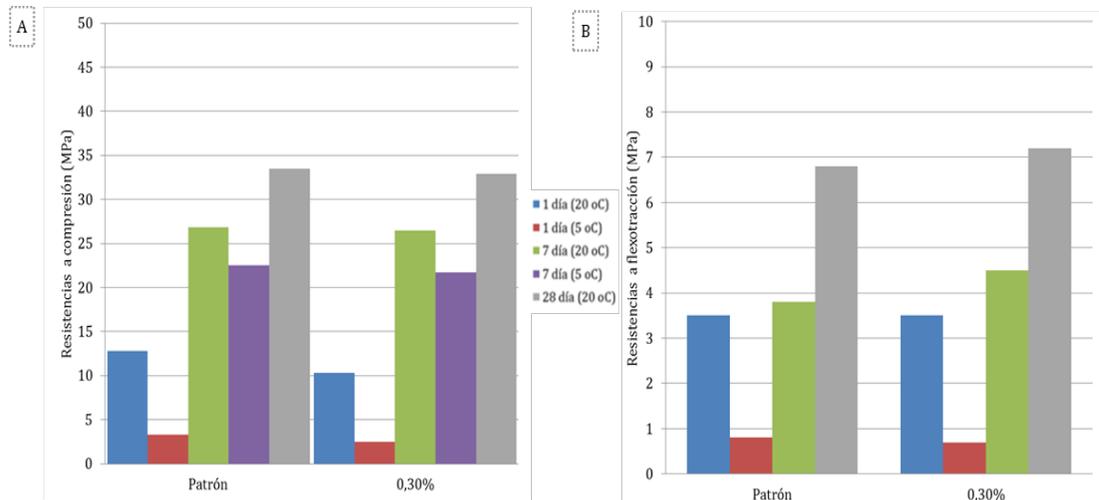


Figura 4.9.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado P 24-81: a) compresión y b) flexotracción

Así mismo se puede apreciar que la adición del formulado P24-81 apenas tiene influencia en la resistencia a flexotracción (Figura 4.9b), presentando unos valores muy similares a los obtenidos con el hormigón patrón prácticamente a todas las edades temperaturas estudiadas, llegando incluso a superar las resistencias patrón a 28 días. Una vez considerado como válido el agente antibacteriano P 24-81, se procedió a realizar la fase de ensayos de determinación de lixiviación del principio activo.

Determinación de la lixiviación del principio activo

En la Tabla 4.13 se muestran los resultados obtenidos tras la realización del ensayo de lixiviación, analizándose la variación de la concentración de los principios activos en el disolvente así como la cantidad total lixiviada durante el ensayo completo. La cantidad total de principio activo eluído se mantiene dentro de unos niveles muy bajos, debido a la baja concentración de los principios en el formulado (5% de cada principio activo) y por otra a la baja solubilidad del producto en agua; es destacable la diferente solubilidad de ambos principios activos. Otro aspecto a destacar es que a medida que van pasando los ciclos de inmersión, la cantidad lixiviada va disminuyendo, sin llegar a ser una cantidad toxica ($LD_{50} > 415$ mg/kg). Una vez conocidos los resultados de lixiviación se puede afirmar que el formulado P 24-81 es suficientemente insoluble para el uso deseado.

Concentración de principio activo en el disolvente (mg/m ² -día)											
Dosis (%)	PA	Duración del proceso de lixiviación (días)									
		1	3	7	9	14	16	18	22	24	ΣTOTAL
Patrón	NaP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	BIT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,3	NaP	0,09	0,06	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,03	0,00	0,42
	BIT	1,60	1,18	1,14	0,90	0,77	0,71	0,45	0,25	0,00	7,00

Tabla 4.13.- Determinación de la lixiviación del principio activo, formulado P 24-81

Evaluación de las propiedades antimicrobianas

En la Figura 4.10 se muestran los resultados de los ensayos microbiológicos realizados con el formulado P 24-81. En la imagen se aprecian las imágenes de los cultivos microbiológicos realizados con los tres microorganismos indicadores (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*). Se debe aclarar que en los cultivos de *Escherichia coli* y de *Staphylococcus aureus*, el color del medio de cultivo de las placas que contienen el hormigón patrón es diferente debido a una contaminación microbiológica externa.

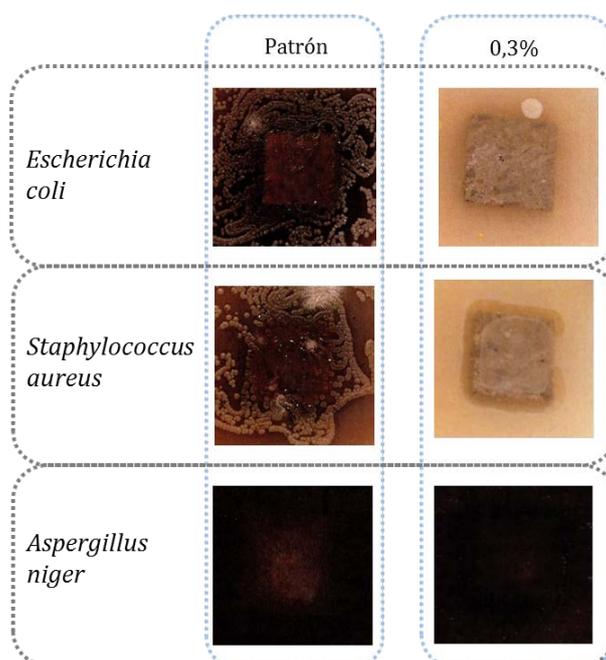


Figura 4.10.- Ensayos microbiológicos realizados con el formulado P-24-81.

Los resultados obtenidos (Figura 4.10 y Tabla 4.14) muestran que el formulado P 24-81 no presenta actividad inhibitoria de crecimiento frente a los microorganismos evaluados (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*), ya que no evita el crecimiento en superficie ni crea un halo de inhibición de desarrollo microbiano alrededor de la probeta. El índice de desarrollo obtenido con el empleo de P 24-81 es 2 para todos los microorganismos indicadores (Tabla 4.14). De acuerdo con los resultados obtenidos, se

descarta el formulado P 24-81 al no considerarlo apto, por lo que no será sometido a la fase de envejecimiento y a la posterior fase de ensayos microbiológicos.

Índice de desarrollo		
Microorganismo	Dosis (%)	
	Patrón	0,3
<i>Escherichia coli</i>	2	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	2
<i>Aspergillus niger</i>	2	2

Tabla 4.14.- Interpretación de los ensayos microbiológicos realizados con el formulado P 24-81.

4.2.9. Formulado BC 98-56

El formulado BC 98-56, al igual que el P 24-81, tiene como principio activo una sal de piritionato, pero en este caso se trata de piritionato de zinc y no se combina con ningún otro principio activo. La concentración del principio activo en el formulado es del 95%. Mediante este ensayo podremos evaluar que formulado es más eficiente, si una combinación de piritionato y benzoisotiazolona o una mayor concentración de principio activo en el producto.

Con el fin de poder comparar los resultados de esta serie de ensayos con los de la serie P 24-81, la dosis utilizada fue la misma, 0,3% spms. La Tabla 4.15 muestra los datos del formulado BC 98-56, propiedades físicas, principio activo y dosificación empleada, así como los resultados obtenidos en los ensayos físicos realizados.

Formulado BC 98-56	Composición	
	BC 98-56	
Principio activo	Piritionato de zinc	
Características físicas	Producto sólido	
Propiedades	Bactericida	
Dosificaciones ensayos (% spms)	0	0,3
Resultados ensayos físicos		
Consistencia (mm)	150	135
Densidad en estado fresco (g/l)	2432	2465
Densidad en estado endurecido (g/l)	2375	2343

Tabla 4.15.- Datos de identificación y características del formulado BC 98-56.

Los datos de consistencia muestran que, del mismo modo que sucedía con en el formulado anterior, la adición del formulado BC 98-56 produce una pérdida de consistencia significativa, por lo que se puede afirmar que este producto también produce un aumento en la viscosidad del hormigón. En cuanto a las densidades, tanto en estado fresco como en endurecido, se observan pocas diferencias, si bien llama la atención el

incremento de densidad en estado fresco. Este incremento de la densidad en estado fresco puede estar relacionado con la mayor viscosidad del material, lo cual condicione una menor capacidad para desalojar el aire ocluido en su interior.

Los resultados de la caracterización de las propiedades mecánicas del hormigón fabricado con el formulado BC 98-56 se muestran en la Figura 4.11. Las resistencias a compresión (Figura 4.11a) muestran que la adición del principio activo tiene una influencia clara en las resistencias a 24 horas, tanto a 5° C como a 20° C, llegando a no poderse desmoldar las probetas. Este hecho se debe a la influencia que este compuesto tiene sobre el proceso de hidratación del cemento y la adquisición de resistencias a cortas edades.

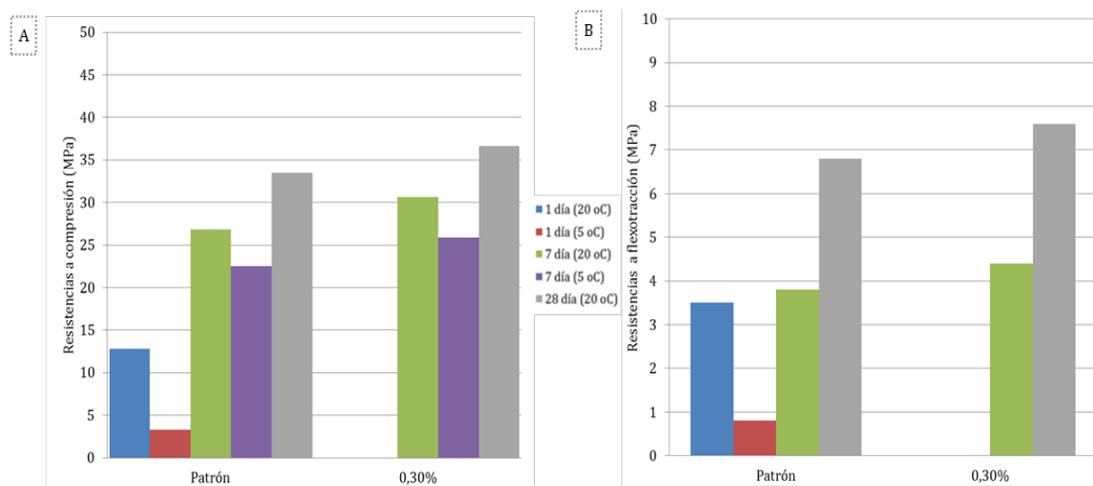


Figura 4.11.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BC 98-56: a) compresión y b) flexotracción.

Teniendo en cuenta que el formulado BC 98-56 y el P 24-81 son de la misma familia de agentes antimicrobianos, pero con diferente concentración, se puede afirmar que la alta concentración de piritionato presente en el formulado BC 98-56 condiciona las resistencias iniciales del hormigón. Las resistencias a compresión (Figura 4.11a) a 7 y 28 días del hormigón fabricado con el formulado BC 98-56 son un 14% y un 9% superiores al patrón, respectivamente.

Este comportamiento puede deberse a que un proceso de cristalización más lento provoca que los cristales formados sean menores pero más numerosos produciendo unas resistencias a largo plazo mayores. En cuanto a las resistencias a flexotracción (Figura 4.11b), de forma análoga a lo observado en las resistencias a compresión, tenemos un menor desarrollo de resistencias iniciales y a bajas temperaturas al adicionar el formulado BC 98-56, presentando unas resistencias a 7 y 28 días mayores. Debido a los descensos observados en las resistencias iniciales del hormigón, tanto a compresión como a flexotracción, este formulado no se considera apto. Por lo tanto, no se realizan los ensayos de lixiviación.

4.2.10. Formulado BXT

Del mismo modo que los formulados P 24-81 y el B 98-56, el BXT tiene como principio activo el ACTICIDE SR 1288® al 80% de concentración, siendo un derivado del piritionato, concretamente una sal de piridintiol de zinc. En esta ocasión, siguiendo las recomendaciones del suministrador, con el fin de mejorar la dispersión del principio activo en la masa de hormigón, el ACTICIDE SR 1288® se adicionó en estado sólido utilizando como base filler calizo, dando lugar al formulado BXT. En la Tabla 4.16 se presentan los datos de identificación del formulado BXT, incluyendo sus características, las dosificaciones empleadas, así como los resultados físicos obtenidos. En esta serie se estudiaron las propiedades del formulado usándolo a una dosis de 0,05% y 0,15% spms.

Formulado BXT	Composición		
		ACTICIDE SR 1288® FILLER CALIZO	
Principio activo	2-Piridintiol-1-óxido de Zinc		
Características físicas	Producto sólido		
Propiedades	Bactericida fungicida		
Dosificaciones ensayos (% spms)	0	0,05	0,15
Resultados ensayos físicos			
Consistencia (mm)	140	135	160
Densidad en estado fresco (g/l)	2427	2467	2450
Densidad en estado endurecido (g/l)	2379	2293	2301

Tabla 4.16.- Datos de identificación y características del formulado BXT.

A bajas dosificaciones, el formulado BXT no tiene ninguna repercusión sobre la consistencia, pero a dosificaciones más altas la consistencia se ve aumentada en 20 mm. Ello puede responder a la mayor dosificación del formulado en el hormigón, dado que aumenta también el contenido de filler calizo añadido. Por su parte, los valores de densidades de los hormigones que contienen BXT, tienen valores similares al hormigón referencia, tanto en estado endurecido como en estado fresco, obteniéndose diferencias máximas del 2% y el 3%, respectivamente.

En la Figura 4.12 se muestran los resultados obtenidos de los ensayos mecánicos realizados con el formulado BXT. De forma general se puede apreciar que la adición del formulado BXT no afecta de forma clara a los valores de resistencia a compresión (Figura 4.12a). En los valores obtenidos a 1 día se puede observar que no hay grandes diferencias entre los valores de toda la serie, llegando a ser incluso ligeramente superiores, tanto en los ensayos realizados a 5° C como los realizados a 20° C, por lo que se puede afirmar que este formulado no incide sobre las resistencias iniciales. Por su parte, en los resultados obtenidos a 7 días, se dan diferencias de hasta un 30% en los ensayos realizados tanto a 20°C como a 5° C, si bien se observa un incremento de resistencias hasta 28 días en los hormigones tratados con el formulado, llegando a alcanzar casi la resistencia obtenida con la muestra patrón.

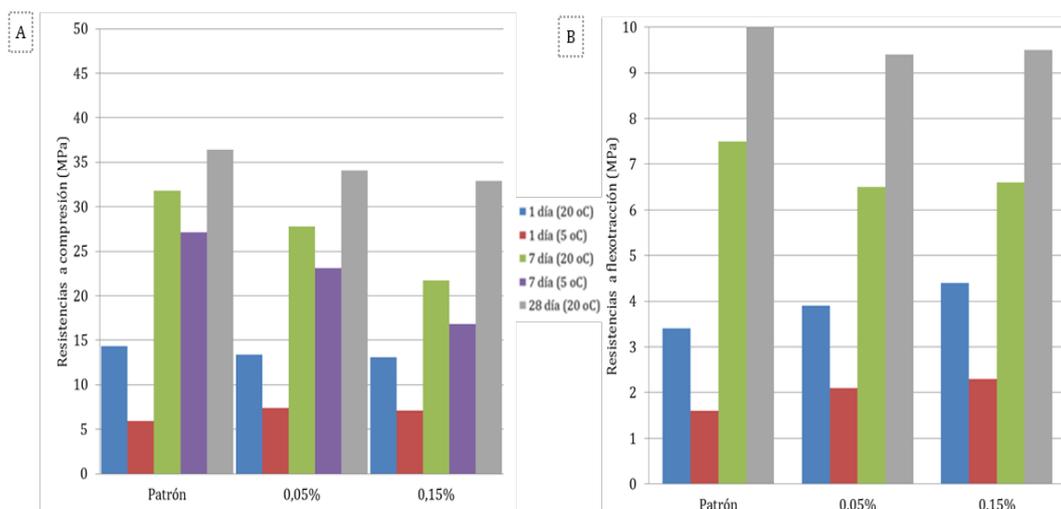


Figura 4.12.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT: a) compresión y b) flexotracción

Por otro lado, tras estudiar los valores de resistencias a flexotracción (Figura 4.12b) se puede observar que hay dos tendencias claramente diferentes, cortas edades (1 día), los hormigones tratados muestran valores superiores al patrón, mientras a edades mayores el patrón muestra resistencias ligeramente superiores, si bien debe aclararse que las diferencias en todos los casos no son significativas.

Este comportamiento, que sucede a todas las dosis evaluadas, puede deberse a que la adición del formulado acelera el proceso de fraguado y el desarrollo de resistencias iniciales, teniendo como consecuencia una ligera penalización a edades finales. Durante toda la serie no se aprecia ninguna influencia entre la temperatura de curado de las probetas y los valores de resistencias. Una vez considerados como aceptables los resultados de resistencias se procedió a realización de los ensayos de determinación de lixiviación.

Determinación de la lixiviación del principio activo

En la Tabla 4.17 se muestran los resultados obtenidos del ensayo de lixiviación, del formulado BXT. Del mismo modo que ocurrió con los formulados ACTICIDE MBP, P24-81, las concentraciones de principio activo en el disolvente se mantienen dentro de unos valores bajos. Si bien cabe destacar que los resultados obtenidos en esta serie son más elevados a los obtenidos en la serie correspondiente al formulado P 24-81, debido principalmente a la mayor concentración de principio activo en el formulado. En esta serie de ensayos también se observó que a medida que van pasando los ciclos de inmersión la cantidad lixiviada va disminuyendo.

Dosis (%)	Concentración de principio activo en el disolvente (mg/m ² -día)									
	Duración del proceso de lixiviación (días)									
	1	3	7	9	14	16	18	22	24	ΣTOTAL
Patrón	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,05	0,20	0,18	0,16	0,17	0,13	0,11	0,09	0,09	0,03	1,16
0,15	0,69	0,51	0,48	0,40	0,37	0,36	0,39	0,24	0,08	3,52

Tabla 4.17.- Determinación de la lixiviación del principio activo, formulado BXT

Una vez conocidos los resultados de lixiviación se puede afirmar que el formulado BXT es suficientemente insoluble para el uso deseado y no tóxico, ya que está muy lejos de niveles perjudiciales ($LD_{50} > 415$ mg/kg), por lo que se realizaron los ensayos de evaluación de propiedades antimicrobianas.

Evaluación de las propiedades antimicrobianas

En la Figura 4.13 y en la Tabla 4.18, se muestran los resultados obtenidos tras la realización de los ensayos microbiológicos con las dos dosificaciones del formulado BXT. En la citada Figura 4.13 se aprecian las imágenes de los cultivos microbiológicos realizados con los tres microorganismos indicadores, apreciándose que el formulado BXT presenta actividad antimicrobiana frente a *Escherichia Coli* y *Staphylococcus aureus* con las dos dosificaciones empleadas (índice de desarrollo de 0), si bien el efecto frente a *Aspergillus niger* únicamente sólo alcanza un nivel aceptable con la dosificación de 0,15% (índice de desarrollo de 1), consiguiendo inhibir el crecimiento en superficie aunque no un halo de inhibición del mismo

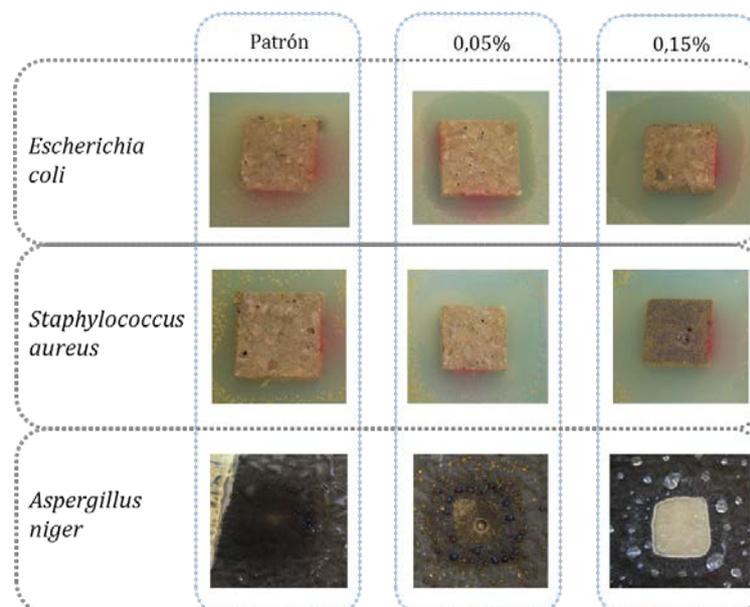


Figura 4.13.- Ensayos microbiológicos realizados con el formulado BXT

Índice de desarrollo			
Microorganismo	Dosis (%)		
	Patrón	0,05	0,15
<i>Escherichia coli</i>	2	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	2	2	1

Tabla 4.18.- Interpretación de los ensayos microbiológicos realizados con el formulado BXT.

Tras los resultados obtenidos en la primera fase de ensayos microbiológicos, el formulado BXT fue considerado apto, y por lo tanto, fue sometido a la fase de envejecimiento y posteriormente, a la segunda fase de ensayos microbiológicos, cuyos resultados se muestran en la Figura 4.14 y en la tabla 4.19. Tal y como se realizó en la primera fase de ensayos microbiológicos, a las muestras analizadas en esta segunda fase se les había adicionado el BXT a las mismas dosis, 0,05 % y 0,15 %. Del mismo modo que en la primera fase de ensayos microbiológicos, se evalúa el efecto del formulado BXT frente a los mismos microorganismos indicadores, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger*.

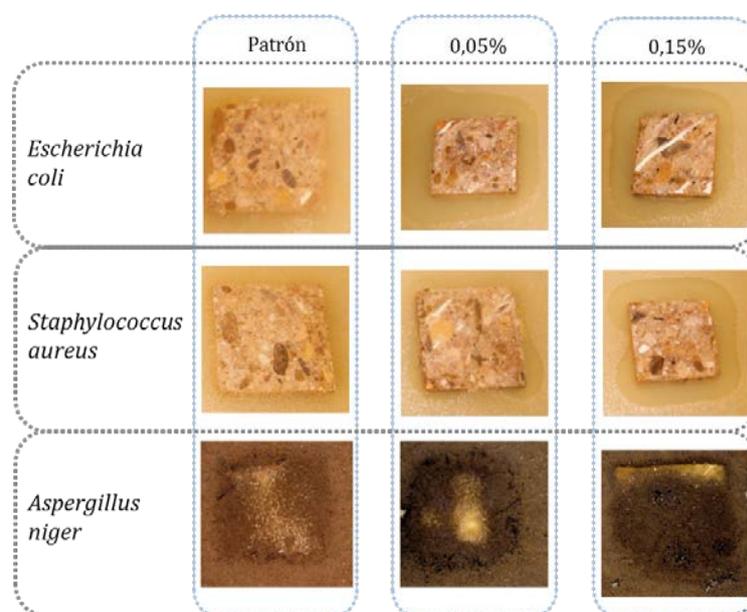


Figura 4.14.- Segunda fase de ensayos microbiológicos realizados con el formulado BXT.

Índice de desarrollo			
Microorganismo	Dosis (%)		
	Patrón	0,05	0,15
<i>Escherichia coli</i>	2	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	2	2	2

Tabla 4.19.- Interpretación de segunda fase de ensayos microbiológicos realizados con formulado BXT.

Los resultados obtenidos muestra que el formulado BXT conserva el efecto antimicrobiano frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* tras el proceso de envejecimiento, con las dos dosificaciones empleadas. En cambio, el efecto frente el *Aspergillus niger* no se conserva tras el este proceso (índice de desarrollo de 2), debido a que durante el periodo de envejecimiento el formulado BXT ha perdido parte de su efectividad, lo que hace que no sea lo suficientemente activo para inhibir el crecimiento del hongo estudiado.

4.3. CONCLUSIONES

Tras la realización de la fase de ensayos con los agentes antimicrobianos monocomponente, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La adición de algunos de los formulados evaluados compromete algunas de las prestaciones mecánicas del hormigón como por ejemplo la densidad y desarrollo de resistencias. El empleo del formulado BXT/11 produce una reducción significativa de los valores de densidad lo que hace que sus resistencias, a todas las edades, se vean afectadas. Por su parte, la incorporación de los formulados BXT/AB, Vanquish 100®, Densil P® y BC-98-56 al hormigón provoca una disminución notable en los valores de resistencias obtenidos manteniéndose el resto de parámetros, densidad y consistencia, en niveles similares al hormigón referencia.
- Los ensayos de evaluación de lixiviación del principio activo de los formulados evaluados demuestran que el Vantocil IB® y el Biopol D211®, son productos solubles o parcialmente solubles, siendo, por lo tanto, inválidos para esta aplicación.
- De todos los formulados monocomponente evaluados, solamente P-24-81, ACTICIDE MBP® y BXT no perjudican las prestaciones fundamentales del hormigón y no son considerados como lixiviables. Los dos primeros no presentan un efecto antimicrobiano aceptable, y son descartados. Por su parte, el formulado BXT sí que se presenta como un agente inhibidor del crecimiento microbiano válido en los ensayos microbiológicos iniciales, pero la capacidad de inhibición frente al *Aspergillus niger* desaparece tras el proceso de envejecimiento.
- La obtención de un efecto antimicrobiano duradero, que no comprometa las propiedades mecánicas del hormigón con un formulado no lixiviable, pasa por desarrollar un producto que combine diferentes principios activos.

5. AGENTES ANTIMICROBIANOS MULTICOMPONENTE

5.1 INTRODUCCIÓN

Una vez realizados los ensayos mecánicos y microbiológicos con los formulados monocomponente y concluyendo que ninguno de ellos posee el comportamiento esperado, se procedió a la realización de los ensayos empleando formulados multicomponente.

El objetivo del presente capítulo es evaluar la efectividad de los formulados multicomponente, entendiendo como tales aquellos formulados que poseen más de un principio activo en su composición. Del mismo modo que los ensayos realizados con los agentes antimicrobianos monocomponente, estos se clasifican en tres categorías, la primera engloba al conjunto de ensayos que evaluaron las propiedades principales del hormigón, la segunda categoría corresponde a los ensayos de determinación de lixiviación del principio activo y por último, en la tercera fase se realizaron los ensayos microbiológicos.

Los ensayos físicos mediante los que se evalúan las principales propiedades del hormigón permiten conocer la influencia que tiene sobre las mismas la adición de un agente antimicrobiano determinado. Dentro de esta categoría se miden los siguientes parámetros: consistencia, densidad en estado fresco y en estado endurecido y, por último, resistencias mecánicas a 1, 7 y 28 días. Los ensayos mecánicos, tanto la resistencia a compresión como a flexotracción, se realizaron a 5° y a 20° C, con el fin de evaluar la influencia del producto antimicrobiano en el desarrollo de las resistencias en condiciones

de temperatura distintas. En todos los resultados de las medidas de las resistencias, tanto a compresión como a flexotracción, se proporciona el valor medio de dos medidas.

La fase de ensayos de determinación de lixiviación del principio activo se realizó con los formulados que no alteraron de forma significativa las prestaciones mecánicas del hormigón. En último lugar, sólo los formulados que superaron la fase de ensayos de determinación de lixiviación, pasaron a la fase de ensayos microbiológicos. Esta fase de ensayos se divide en dos etapas, ensayos microbiológicos iniciales y finales. Los primeros corresponden a una primera fase de ensayos antes de someter a las muestras de hormigón al proceso de envejecimiento descrito en el capítulo 3, mientras que la segunda fase se realiza una vez realizado este proceso. La segunda fase de ensayos microbiológicos sólo fue realizada con las muestras de hormigón que presentaron actividad antimicrobiana en la primera fase de ensayos microbiológicos.

5.2 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE LABORATORIO

5.2.1 Formulado BXT/12C

El formulado BXT/12C busca dotar al hormigón de una protección antimicrobiana lo más amplia posible, por lo que se optó por combinar dos principios activos, Irgasan DP 300® (5,12%) y Acticide SR 1228® (5%). Estos principios activos fueron estudiados anteriormente y se busca ahora estudiar un posible comportamiento sinérgico entre ambos principios activos. Con el fin de evitar que la oclusión del aire suponga una pérdida en las prestaciones mecánicas del hormigón, este formulado contiene un sistema desaireante (TIBP + BUBLEX®). En esta ocasión se optó por utilizar como disolventes propilenglicol y polietilenglicol para conseguir un producto líquido. En la Tabla 5.1 se presentan los datos de identificación del formulado BXT/12C.

Formulado	Composición		
	PROPILENGLICOL IRGASAN DP 300® TIBP	BUBLEX® POLIETILENGLICOL ACTICIDE SR 1288®	
BXT / 12C			
Principio activo	2,4,4'-Tricloro-2' hidroxí-difenil-eter Piritionato de zinc		
Características físicas	Producto líquido solubilizado en propilenglicol y polietilenglicol		
Propiedades	Bactericida-fungicida		
Dosificaciones ensayos (% spms)	0	0,6	1
Resultados ensayos físicos			
Consistencia (mm)	119	120	122
Densidad en estado fresco (g/l)	2425	2405	2409
Densidad en estado endurecido (g/l)	2333	2335	2332

Tabla 5.1.- Datos de identificación y características del formulado BXT/12C.

La adición del formulado BXT/12C no tiene ninguna repercusión sobre la consistencia del hormigón, dándose una diferencia máxima de 3 mm (2,5%) con la dosis de 1% spms. En cuanto a los valores de densidad se puede observar una ligera disminución en la densidad en estado fresco de los hormigones tratados con el formulado, a ambas dosificaciones, no llegando a superar esta diferencia el 1%. En cuanto a la densidad en estado endurecido, del mismo modo que sucede que con la densidad en estado fresco, los valores se mantienen dentro del mismo nivel en toda la serie, observándose una diferencia máxima inferior al 1%, atribuible a la variabilidad propia del ensayo.

Con respecto a los resultados de los ensayos mecánicos (Figura 5.1), se aprecia claramente como la adición del formulado BXT/12C tiene una marcada influencia en el desarrollo de las propiedades mecánicas. Los valores de resistencias a compresión (Figura 5.1a) se ven claramente afectados por la adición del formulado BXT/12C, viéndose disminuidas estas en todas las edades y en ambos rangos de temperaturas estudiados. La tendencia que se observa en los resultados de las roturas a compresión es inversamente proporcional a la dosis añadida del formulado.

La diferencia máxima, respecto al patrón, observada en la serie es la obtenida a una dosis de 1%, a un 1 día y a 5° C, por lo que se puede afirmar que, este producto perjudica de manera especial el desarrollo de resistencias iniciales y a bajas temperaturas, dándose una disminución superior al 60%. Las diferencias entre las resistencias del hormigón con formulado y el hormigón patrón a 28 días disminuyen, si bien éstas superan el 30%.

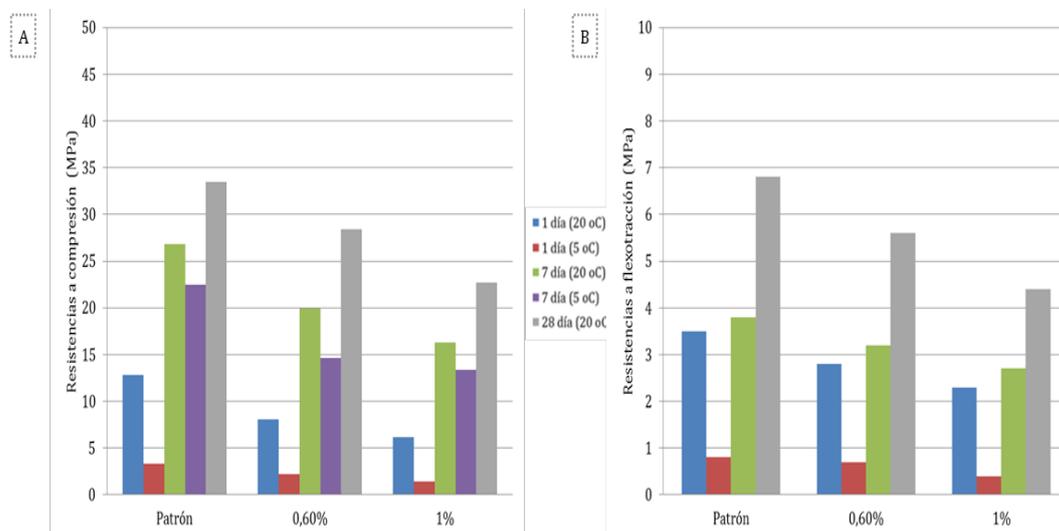


Figura 5.1.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT/12C: a) compresión y b) flexotracción

En cuanto, a los valores de resistencias a flexotracción, tal y como se muestra en la Figura 5.1b, siguen la misma tendencia que los valores correspondientes a las resistencias a compresión, a mayor dosificación mayor disminución de resistencia. Otra similitud entre

ambos ensayos es que también se ven afectadas las prestaciones a edades tempranas y bajas temperaturas.

Cabe destacar que este comportamiento, con pérdida de resistencias manteniéndose los valores densidad, fue observado con anterioridad en la serie BXT/AB, formulado que, del mismo modo que el BXT 12/C, contiene Irgasan DP 300, por lo que se puede afirmar que este principio activo reduce las prestaciones mecánicas del hormigón.

Tras el estudio de los resultados obtenidos de los ensayos mecánicos, donde se observó una gran pérdida de resistencias, tanto a compresión como a flexotracción, a todas las edades y en ambos rangos de temperatura, no se consideró necesario la realización del ensayo para la determinación de la lixiviación de principio activo.

5.2.2 Formulado BXT/10P

El formulado BXT/10P combina dos productos utilizados en ensayos anteriores, el IRGASAN DP 300® y el ACTICIDE MBP®. Este formulado, a diferencia del anterior, es un producto sólido que utiliza como base el filler calizo, ya que no se consiguió obtener una suspensión líquida estable con las proporciones de materia activa que contiene el producto.

El mayor inconveniente que presenta la utilización de productos sólidos es la dificultad de conseguir distribuir una cantidad tan pequeña de producto en el total de la masa de hormigón. En la composición de este formulado se incluyó un agente desaireante para evitar un descenso en las densidades del hormigón debido a que, tal y como se ha podido observar en ensayos anteriores, la presencia de IRGASAN DP 300® produce una oclusión de aire en el hormigón. En la Tabla 5.2 se presentan los datos de identificación del formulado BXT/10P incluyendo sus características, las dosificaciones empleadas, así como los resultados físicos obtenidos.

Formulado BXT/10P	Composición		
	ACTICIDE MBP® IRGASAN DP 300®	MOUSSEX® FILLER CALIZO	
Principio activo	2,4,4'-Tricloro-2' hidroxi-difenil-eter 1,2-bencilisotiazolin-3-ona 2-metil-4-isotiozolin-3-ona		
Características físicas	Producto sólido		
Propiedades	Bactericida-fungicida		
Dosificaciones ensayos (% spms)	0	0,8	1
Resultados ensayos físicos			
Consistencia (mm)	125	117	120
Densidad en estado fresco (g/l)	2473	2266	2200
Densidad en estado endurecido (g/l)	2400	2184	2164

Tabla 5.2.- Datos de identificación y características del formulado BXT/10P

Los resultados obtenidos de la densidad, tanto en estado fresco como endurecido obtenidos con el formulado BXT/10P, muestran claramente que la incorporación provoca un descenso muy importante en los valores de densidad, tanto a una dosificación de 0,8% spms como a 1% spms, si bien este efecto se acentúa en la dosis más elevada, llegando en este caso a superar el 10% de diferencia respecto al hormigón referencia. Por su parte, los valores de consistencia, se mantienen dentro de un mismo nivel en toda la serie, observándose diferencias por debajo del 7%, que corresponde a 8 mm de consistencia, pudiendo considerar este valor como una diferencia mínima.

En la Figura 5.2 se muestran los valores de resistencia medidos con las probetas tratadas con el formulado BXT/10P. Se puede apreciar que la adición del formulado BXT/10P tiene un efecto notable en las resistencias del material, si se compara con la resistencia del material referencia. Este resultado es congruente con los valores obtenidos de consistencia y densidad. En cuanto a las resistencias a compresión, la disminución más acusada de la serie se da en las resistencias a un 1 día, en ambos rangos de temperatura evaluados, viéndose reducida la resistencia en más de un 80% en los ensayos realizados a 5° C y en hasta un 55% en el caso de los realizados a 20° C, poniendo de manifiesto la influencia que tiene la presencia del formulado en el desarrollo de resistencias a bajas temperaturas. A 7 días también se aprecia una disminución de resistencias, que es aproximadamente de un 40% a 20° C y de un 15% a 5° C que el hormigón referencia.

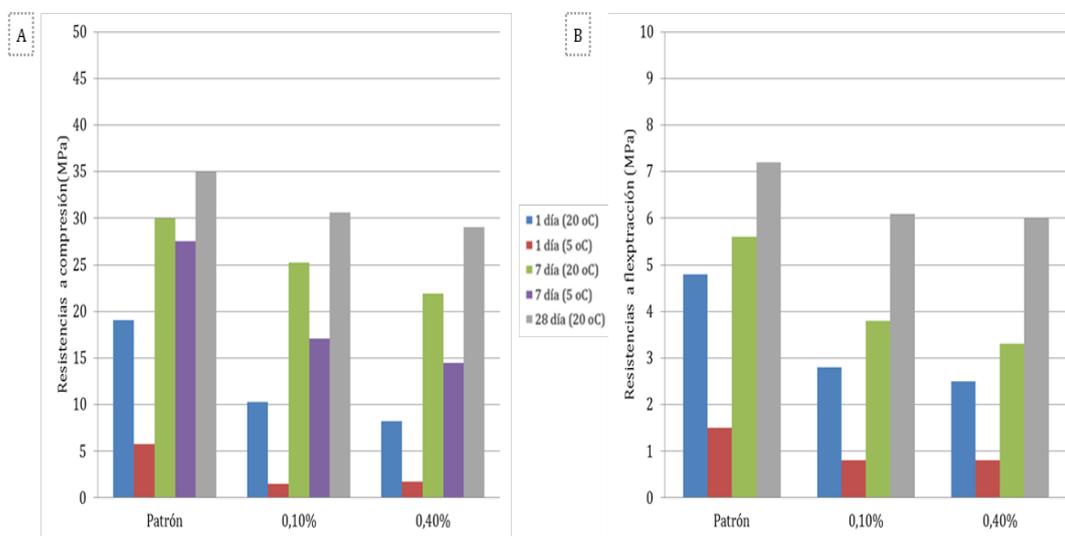


Figura 5.2.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT/12C: a) compresión y b) flexotracción

En el caso de las roturas de las probetas a 28 días se puede apreciar que la máxima diferencia observada es de un 18%, para la dosis máxima de BXT10/P. De nuevo, a medida que aumenta la dosis de formulado se produce un menor desarrollo de resistencias a edades iniciales, si bien a medida que el proceso de desarrollo de resistencias avanza las diferencias entre el hormigón patrón y los hormigones tratados va disminuyendo.

En relación a los valores de resistencias a flexotracción (Figura 5.2b), del mismo modo que sucede en los valores de resistencias a compresión, se ve claramente, que la presencia de BXT/10P produce una caída importante de las resistencias, haciéndose más evidente a bajas temperaturas y a edades iniciales, donde las pérdidas respecto a los valores del hormigón patrón pueden llegar a superar el 50%. Estas diferencias disminuyen en los resultados obtenidos a 7 y 28 días. Considerando las repercusiones que posee la adición de este producto en las propiedades mecánicas del hormigón se considera innecesaria la realización del ensayo de determinación de lixiviación del formulado BX/10P.

5.2.3 Formulado BXT 1

El formulado BXT 1 combina dos agente biocidas, ACTICIDE SR 1288® y ACTICIDE SR 1453®, que tienen propiedades bactericidas, fungicidas y alguicidas. El ACTICIDE SR 1453® es un nuevo biocida que se incorpora a la fase de estudio debido a que por sus propiedades puede complementar la acción del biocida ACTICIDE SR 1288®, que tal y como se vio en el ensayo correspondiente al formulado BXT, ofreció una alta efectividad frente a los microorganismos indicadores, si bien no superó el proceso de envejecimiento acelerado.

A diferencia del formulado BXT 10/P, el BXT 1 fue formulado en base acuosa e por la mayor capacidad de dispersión del ACTICIDE SR 1453® en agua. La cantidad de materia activa utilizada fue un 75% y en esta ocasión se utilizó una alta proporción del nuevo biocida, ACTIDICE SR 1453®, debido a su mejor efectividad. Las dosificaciones empleadas (0,4%, 0,45% y 0,5% spms) también fueron superiores a las utilizadas en la serie BXT, con el propósito de alcanzar un índice de efectividad antimicrobiana prolongado. En la Tabla 5.3 se representan las características y la dosificación del formulado BXT 1, así como las propiedades físicas de los hormigones fabricados.

Formulado BXT/1	Composición (%)			
	ACTICIDE SR 1288®	ACTICIDE SR 1453®	MOUSSEX®	AGUA
Principio activo	2-Piridintiol-1-Óxido de Zinc 2-Octil-2H-isotiazol-3-one+terbutrin			
Características físicas	Producto líquido solubilizado en agua			
Propiedades	Bactericida-fungicida-alguicida			
Dosificaciones ensayos (% spms)	0	0,4	0,45	0,5
Resultados ensayos físicos				
Consistencia (mm)	157	150	153	149
Densidad en estado fresco (g/l)	2426	2465	2439	2468
Densidad en estado endurecido (g/l)	2372	2385	2367	2393

Tabla 5.3.- Datos de identificación y características del formulado BXT 1

Los datos de consistencia muestran que la adición del formulado BXT 1 produce una ligera pérdida de consistencia, alcanzando una reducción máxima de consistencia de 8 mm (5%) a la máxima dosificación. En cuanto a las densidades, tanto en estado fresco como en endurecido se observa que los valores obtenidos en toda la serie son muy similares a los obtenidos en el hormigón de referencia, dándose diferencias máximas inferiores al 2%, atribuibles a la dispersión propia del ensayo.

Los resultados de la caracterización de las propiedades mecánicas del hormigón fabricado con el formulado BXT 1 se muestran en la Figura 5.3. Las resistencias a compresión (Figura 5.3a) muestran que la adición tiene una influencia clara en las resistencias a 24 horas, tanto a 5° como a 20° C, llegando a no poderse desmoldar las probetas en ninguno de los ensayos de toda la serie. Este hecho se debe a la influencia que este compuesto tiene sobre el proceso de hidratación del cemento y la adquisición de resistencias a cortas edades. Este comportamiento no se observó cuando se empleó el formulado BXT, por lo que, teniendo en cuenta que el formulado BXT 1 también contiene ACTICIDE SR 1288® podemos atribuirlo al ACTICIDE SR 1453®.

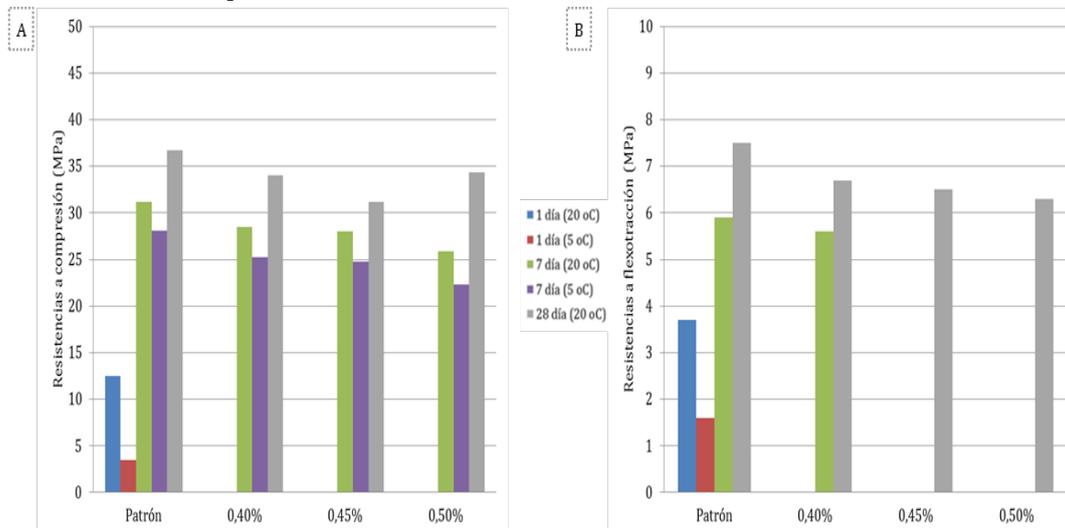


Figura 5.3.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT 1: a) compresión y b) flexotracción

Por su parte, las resistencias a 7 y 28 días del hormigón fabricado con el formulado BXT1 son un 18% y un 14% inferior al patrón, respectivamente, que si bien es una diferencia notable, queda lejos de las diferencias observadas en los valores obtenidos a un día. Este comportamiento era esperable, puesto que es común que se dé un mayor desarrollo de resistencias a largo plazo, tras un desarrollo inicial de resistencias lento se observa un desarrollo de resistencias finales notable. En cuanto a las resistencias a flexotracción (Figura 5.3b), de forma análoga a lo observado en las resistencias a compresión, se observa un menor desarrollo de resistencias iniciales y a bajas temperaturas al adicionar el formulado BXT 1, presentando unas resistencias a 7 y 28 días más cercanas a los valores referencia.

Debido a los descensos observados en las resistencias iniciales del hormigón, tanto a compresión como a flexotracción, este formulado no se considera apto. Por lo tanto, no se realizan los ensayos de lixiviación posteriores.

5.2.4 Formulado BXT 5

El formulado BXT 5 incluye los mismos agentes antimicrobianos que el formulado BXT 12/C, el ACTICIDE SR 1288® y el IRGASAN DP 300®, pero con diferentes proporciones. En esta ocasión se añadió un 8% y un 5,12% respectivamente de cada principio activo. En este formulado se redujo la proporción de IRGASAN DP 300® con el fin de reducir la influencia de este producto en el desarrollo de resistencias del hormigón, tal y como se observó en la serie de ensayos realizado con el formulado BXT 12/C.

Otra de las particularidades que presenta la composición de este formulado es la incorporación de OPTIGEL CK®, agente gelificante que ayuda a conseguir que el producto sea estable en medio líquido, permitiendo además la incorporación de agua al formulado, disolvente que no interferirá en el proceso de hidratación del cemento. En esta serie de ensayos, el formulado se evaluó a 4 dosificaciones diferentes (0,08%, 0,15%, 0,3% y 0,4% spms), siendo la cantidad de materia activa empleada similar a la empleada en el formulado BXT 12/C. En la Tabla 5.4 se presentan los datos de caracterización del formulado BXT 5, donde se incluyen las características del formulado, las dosificaciones empleadas y los resultados físicos obtenidos.

Formulado BXT/5	Composición (%)				
	ACTICIDE SR 1288® IRGASAN DP300® PROPILENGLICOL POLIETILENGLICOL	TIBP OPTIGEL CK® AGUA			
Principio activo	2,4,4'-Tricloro-2' hidroxidifenil-eter Piritionato de zinc				
Características físicas	Producto líquido solubilizado en agua y glicoles				
Propiedades	Bactericida fungicida alguicida				
Dosificaciones ensayos (% spms)	0	0,08	0,15	0,2	0,4
Resultados ensayos físicos					
Consistencia (mm)	165	170	167	165	168
Densidad en estado fresco (g/l)	2343	2337	2381	2330	2327
Densidad en estado endurecido (g/l)	2406	2441	2418	2360	2357

Tabla 5.4.- Datos de identificación y características del formulado BXT 5

Los resultados de consistencia y de densidad muestran que la adición del formulado BXT 5 no tiene ninguna influencia importante en la consistencia, puesto que la máxima diferencia observada en toda la serie respecto a la consistencia del hormigón patrón es de 3 mm (5%), pudiendo considerarse un valor similar en todos los casos. En

cuanto a la densidad, ya sea en estado fresco o en endurecido, se dan diferencias en ambos parámetros inferiores al 2%, pudiendo ser atribuibles a la variabilidad propia del ensayo.

Los resultados obtenidos de los ensayos mecánicos para las diferentes dosificaciones del formulado BXT 5 se detallan en la Figura 5.4. Se puede observar que los valores de resistencias a compresión obtenidos en toda la serie se mantienen dentro de un mismo orden, si bien el hormigón patrón presenta unos valores ligeramente superiores, tal y como se aprecia en la Figura 5.4a. En el caso concreto de los valores de resistencias a 1 día es donde se aprecia una diferencia menor entre los hormigones tratados con el formulado BXT 5 y el hormigón patrón, sin llegar a superar el 10%. Este comportamiento se reproduce en todas las dosificaciones empleadas y en los dos rangos de temperatura estudiados, lo que nos hace pensar en que este formulado no interviene de forma notable en el desarrollo de resistencias del hormigón.

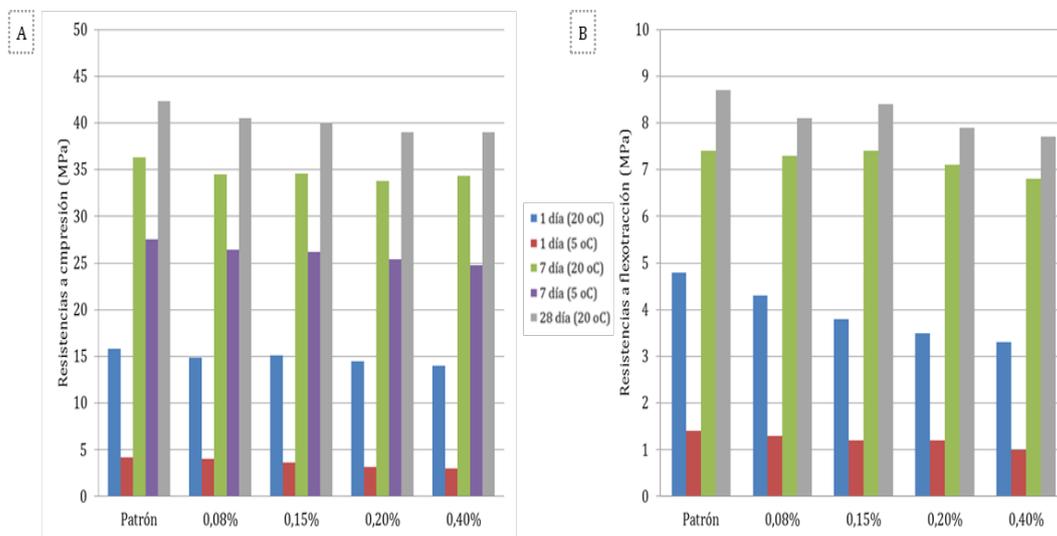


Figura 5.4.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT 5: a) compresión y b) flexotracción

En cuanto a los resultados de resistencias a 7 días, se observa que todos los hormigones que contienen el formulado desarrollan resistencias muy similares a todas las dosificaciones aunque ligeramente menores (5%) a las del hormigón de referencia, tanto a 5° C como a 20° C. Las resistencias a 28 días siguen la misma tendencia que las observadas en roturas anteriores.

Por su parte, los resultados de resistencias a flexotracción (Figura 5.4b) muestran que la adición del formulado BXT 5 produce una disminución en los valores obtenidos, la cual se incrementa a medida que aumenta la dosis. La máxima diferencia se observa en el valor de resistencia obtenido a 1 día en el ensayo realizado a la máxima dosificación (0,4%) y a una temperatura de 20°C. Por lo tanto, podemos afirmar que las resistencias a flexotracción son más sensibles a la presencia del formulado que las resistencias a compresión.

Después de evaluar los resultados de los ensayos mecánicos y concluir que el formulado BXT 5 es un producto que no altera las prestaciones mecánicas del hormigón, se procedió a realizar la fase de ensayos microbiológicos. En esta ocasión no se realizó la determinación de la lixiviación del principio activo puesto que los principios activos que lo componen se sometieron a esta valoración en ensayos anteriores (formulados BXT y ACTICIDE MBP®).

Evaluación de las propiedades antimicrobianas

En la serie de ensayos microbiológicos realizados con el formulado BXT 5, además de los cultivos ensayados inicialmente (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*), se incluyeron dos microorganismos nuevos, concretamente las algas *Stichococcus bacillaris* y *Scenedesmus vaculatus*. Estos dos nuevos microorganismos se incorporan a la fase de ensayos microbiológicos para poder evaluar las prestaciones de los agentes antimicrobianos utilizados frente a algas, ya que en los ensayos de campo, que se mostraran en el capítulo 6, están directamente relacionados con el control del crecimiento de algas.

En la Figura 5.5 y en la Tabla 5.5 se muestran los resultados obtenidos de los ensayos microbiológicos realizados con el formulado BXT 5, donde puede apreciarse las imágenes de los cultivos microbiológicos realizados con los cinco microorganismos indicadores (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Stichococcus bacillaris* y *Scenedesmus vaculatus*).

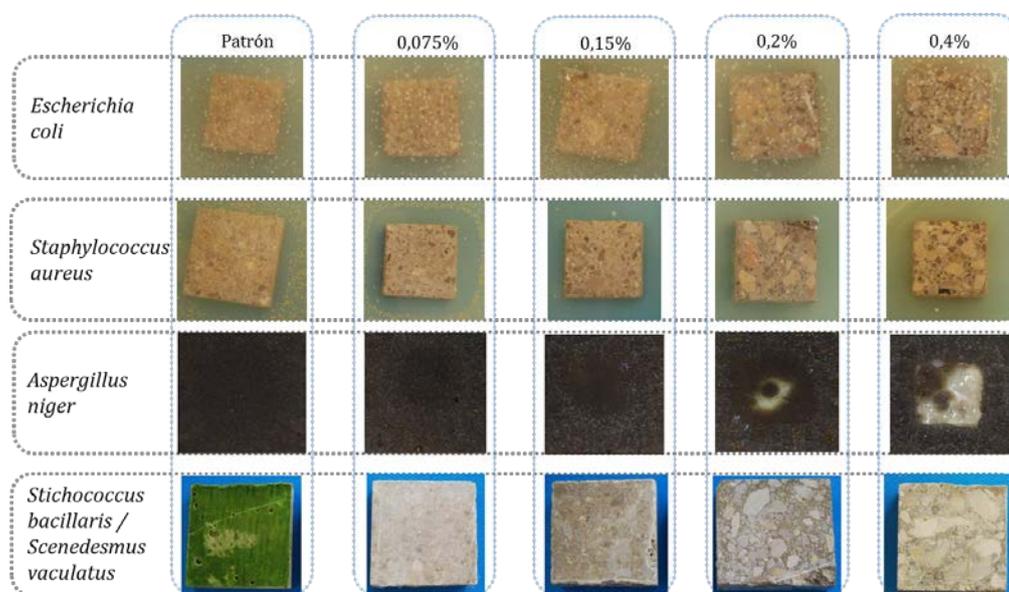


Figura 5.5.- Ensayos microbiológicos realizados con el formulado BXT 5

Se puede apreciar que el formulado BXT 5 no presenta actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, a ninguna de las dosificaciones empleadas, presentado un índice

de crecimiento 2, al igual que el hormigón de referencia. Este hecho puede responder a la baja cantidad de ACTICIDE SR 1288® empleada en el formulado, puesto que en los ensayos microbiológicos realizados con el formulado BXT sí que presentó actividad frente a este microorganismo, si bien la cantidad de ACTICIDE SR 1288® en el formulado BXT es muchísimo mayor que en el BXT 5.

Microorganismo	Índice de desarrollo				
	Patrón	Dosis (%)			
		0,08	0,15	0,2	0,4
<i>Escherichia coli</i>	2	2	2	2	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	2	2	2	2	1
<i>Stichococcus bacillaris / Scenedesmus vacuolatus</i>	2	0	0	0	0

Tabla 5.5.- Interpretación de los ensayos microbiológicos realizados con el formulado BXT 5

El formulado BXT 5 tiene una alta efectividad frente a *Staphylococcus aureus*, como se puede observar en la Figura 5.5, a todas las dosificaciones empleadas, impidiendo tanto el crecimiento en la superficie del hormigón como alrededor de la muestra. Por su parte, del mismo modo que sucede en ensayos anteriores (formulado BXT, formulado P24-81), el efecto del formulado BXT 5 frente a *Aspergillus niger* sólo alcanza un nivel aceptable a la más alta dosificación, obteniendo un índice de crecimiento de 1 (Tabla 5.5), ya que sólo inhibe parcialmente el crecimiento en superficie. Por lo tanto, se vuelve a confirmar, la dificultad de controlar el crecimiento de este microorganismo.

En referencia a actividad del BXT 5 sobre el crecimiento de algas, se puede afirmar que presenta una alta efectividad frente a ambas especies evaluadas, ya que se obtienen excelentes resultados a todas las dosificaciones estudiadas. Con el formulado BXT 5 se consigue impedir el crecimiento de las algas a nivel superficial, además de crear un halo de inhibición alrededor de la muestra de hormigón, obteniendo un índice de crecimiento de 0.

Tras el estudio de los ensayos microbiológicos realizados con el formulado BXT 5, al no presentar actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* no se le considera apto, y por lo tanto, no será sometido a la fase de envejecimiento y a la posterior fase de ensayos microbiológicos.

5.2.5 Formulado PL-UV-H-2B

La composición del formulado PL-UV-H-2B contiene dos principios activos, el IRGASAN DP 300® y el ACTICIDE SR 1453®, a una concentración del 15% y el 30% de materia activa respectivamente. A diferencia del formulado BXT 5, en esta ocasión el formulado se presenta en estado sólido, debido a la gran dificultad que supone conseguir una solución estable con una alta concentración de principio activo. Con el fin de evitar

una posible oclusión de aire, como ha sucedido en ensayos anteriores, el formulado PL-UV-H-2B cuenta en su composición con un agente desaireante (MOUSSEX®).

En esta serie de ensayos se evaluó el comportamiento del formulado a tres dosificaciones elevadas (0,15%, 0,2% y 0,3%), teniendo en cuenta la concentración de agentes antimicrobianos presentes en su composición, intentando conseguir unas mejores prestaciones antimicrobianas, especialmente contra el *Aspergillus niger* y *Escherichia coli*.

En la Tabla 5.6 se presentan los datos de identificación del formulado PL-UV-H-2B, incluyendo sus características, las dosificaciones empleadas, así como los resultados físicos obtenidos.

Formulado PL-UV-H-2B	Composición			
	IRGASAN DP 300® ACTICIDE SR 1453®	MOUSSEX® FILLER CALIZO		
Principio activo	2,4,4'-Tricloro-2' hidroxí-difenil-eter 2-Octil-2H-isotiazol-3-one + terbutrin			
Características físicas	Producto sólido			
Propiedades	Bactericida-fungicida-algucida			
Dosificaciones ensayos (% spms)	0	0,15	0,2	0,3
Resultados ensayos físicos				
Consistencia (mm)	148	152	145	150
Densidad en estado fresco (g/l)	2523	2501	2479	2484
Densidad en estado endurecido (g/l)	2476	2465	2430	2449

Tabla 5.6.- Datos de identificación y características del formulado PL-UV-H-2B.

Se puede apreciar que la adición del formulado PL-UV-H-2B no altera la consistencia de éste de forma significativa a ninguna de las dosificaciones empleadas. Por su parte las densidades del hormigón tanto en estado endurecido como en estado fresco se mantienen dentro de un mismo orden en toda la serie de ensayos, dándose diferencias menores al 2 %.

Los resultados de la caracterización de las propiedades mecánicas se muestran en la Figura 5.6. De forma general se puede apreciar que la adición del formulado afecta al desarrollo de las resistencias a compresión y a flexotracción. En el caso en el que se hace más evidente la influencia del formulado es en las resistencias a compresión (Figura 5.6a) a 1 día y en especial cuando el proceso de curado se realizó a 5° C, donde se da una diferencia máxima de un 20% entre el hormigón patrón y el hormigón con una dosis de formulado de 0,3%, hecho que lleva a pensar que del mismo modo que ha sucedido en ensayos anteriores, la presencia de agentes antimicrobianos ralentiza el desarrollo de resistencias iniciales. Cuando las probetas son curadas a 20° C las diferencias son menores, alcanzando un máximo de 15% a una dosis de 0,2%.

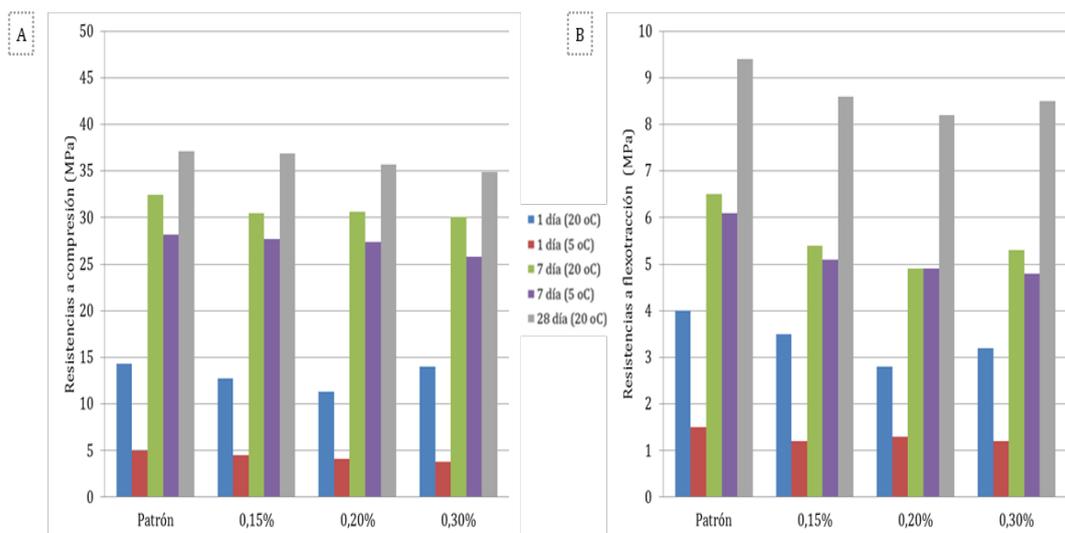


Figura 5.6.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado PL-UV-H-2B: a) compresión y b) flexotracción

Los valores de resistencias a compresión a 7 días se mantienen en niveles muy próximos a los valores de referencia, dándose diferencias máximas por debajo de 7%. Lo mismo sucede en los valores de resistencias a 28 días, manteniéndose dentro de un mismo orden en toda la serie, observándose una variación máxima del 5%, valor que puede considerarse que está dentro de la dispersión de resultados propia del ensayo.

En cuanto al efecto que tiene la presencia del formulado en los resultados de resistencias a flexotracción (Figura 5.6b), se aprecia una disminución de resistencias a todas las edades y a todas las dosis, si bien no de una forma notable. Este hecho se hace más evidente en la dosis 0,2% y en la rotura a 1 día y a 20° C, donde se observa la diferencia máxima del 25%. Una vez aceptado como válido el formulado PL-UV-H-2B, debido a que no perjudica de manera significativa las prestaciones mecánicas del hormigón, se procedió a realizar la fase de ensayos de determinación de lixiviación del principio activo.

Determinación de la lixiviación del principio activo

En la Tabla 5.7 se muestran los resultados obtenidos tras la realización del ensayo de lixiviación. Como tendencia general se puede observar que la cantidad de producto liberada va aumentando en función de la dosis empleada, si bien la cantidad disuelta es mínima, incluso a la dosis más elevada, ya que 1,58 mg/m² equivaldrían a una lixiviación acumulada inferior a 0,3 ppm, cantidad, muy por debajo del nivel que puede considerarse tóxico (LD₅₀ > 2360 mg/kg). Por lo tanto, se puede afirmar que el formulado PL-UV-H-2B, es suficientemente insoluble y apto para el uso deseado, pasando por tanto a la fase de ensayos microbiológicos.

		Concentración de principio activo en el disolvente (mg/m ² -día)										
Dosis (%)	PA	Duración del proceso de lixiviación (días)										
		1	3	7	9	14	16	18	22	24	ΣTOTAL	
Patrón	OIT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	TER	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,15	OIT	0,05	0,04	0,03	0,02	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,16
	TER	0,06	0,07	0,03	0,02	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,26
0,20	OIT	0,06	0,06	0,05	0,05	0,45	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,73
	TER	0,08	0,06	0,06	0,04	0,04	0,04	0,03	0,02	0,00	0,00	0,37
0,30	OIT	0,30	0,21	0,19	0,16	0,14	0,15	0,13	0,13	0,11	0,11	1,40
	TER	0,29	0,22	0,17	0,18	0,15	0,16	0,15	0,14	0,12	0,12	1,58

Tabla 5.7.- Determinación de la lixiviación del principio activo, formulado PL-UV-H-2B.

Evaluación de las propiedades antimicrobianas

En la Figura 5.7 y la Tabla 5.8 se muestran las imágenes obtenidas tras la realización de los ensayos microbiológicos realizados con el formulado PL-UV-H-2B. Del mismo modo que con el formulado BXT 5, en esta serie se evaluó también la eficacia del formulado frente al crecimiento de algas (*Stichococcus bacillaris* y *Scenedesmus vacuolatus*).

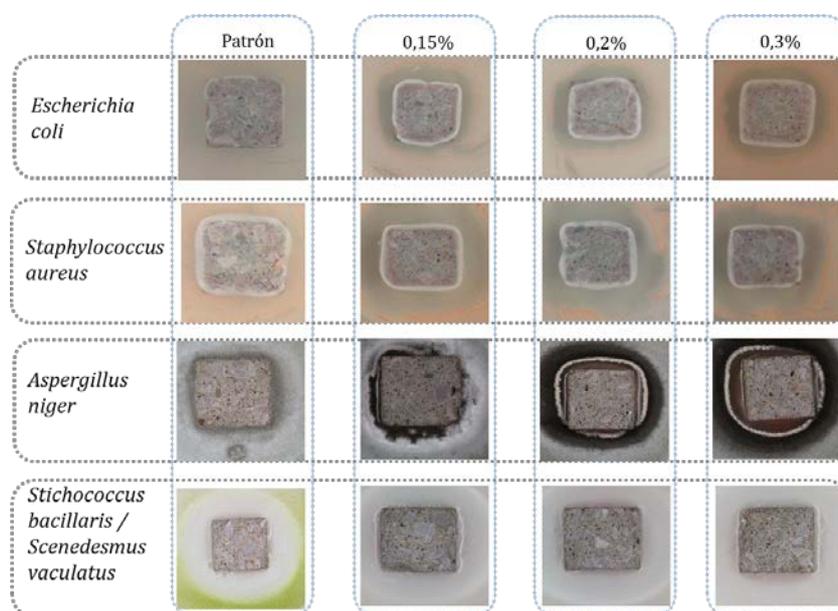


Figura 5.7.- Ensayos microbiológicos realizados con el formulado PL-UV-H-2B

El primer microorganismo frente al que se evalúa la eficacia del formulado PL-UV-H-2B es *Escherichia coli*. Este formulado presenta un nivel de actividad inhibitora de crecimiento alto a todas las dosificaciones evaluadas, creándose un halo de inhibición alrededor de todas las muestra de hormigón. El formulado presenta así mismo un buen comportamiento frente al *Staphylococcus aureus*, a todas las dosificaciones empleadas

(índice de desarrollo de 0), impidiendo tanto el crecimiento en superficie como creando un halo de inhibición de desarrollo alrededor de la muestra. Frente al *Aspergillus niger* son precisas mayores dosificaciones del formulado para que se presente un halo de inhibición (índice de desarrollo de 0), si bien el empleo del formulado inhibe el crecimiento en superficie a todas las dosificaciones.

Microorganismo	Índice de desarrollo			
	Dosis (%)			
	Patrón	0,15	0,2	0,3
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	2	1	0	0
<i>Stichococcus bacillaris</i> / <i>Scenedesmus vaculatus</i>	2	0	0	0

Tabla 5.8.- Interpretación de los ensayos microbiológicos realizados con el formulado PL-UV-H-2B.

En cuanto a la eficiencia del PL-UV-H-2B como agente inhibidor del crecimiento de algas, se puede afirmar que presenta una alta efectividad frente a ambas especies evaluadas, ya que se obtienen resultados aceptables a todas las dosificaciones estudiadas, consiguiendo impedir el crecimiento de las algas a nivel superficial y crear un halo de inhibición alrededor de la muestra de hormigón, obteniendo un índice de crecimiento de 0. Por tanto, se puede concluir que el formulado PL-UV-H-2B presenta actividad frente a los microorganismos ensayado y se le considera apto. Por ello, será sometido a la fase de envejecimiento y a la posterior fase de ensayos microbiológicos.

En la Figura 5.8 se muestran las imágenes de los cultivos microbiológicos realizados tras el proceso de envejecimiento empleando el formulado PL-UV-H-2B en las mismas dosificaciones que en los ensayos microbiológicos iniciales (0,15, 0,2 y 0,3%). Por su parte, en la Tabla 5.9 se muestran los índices de crecimiento observados. Tras el proceso de envejecimiento se puede concluir que el formulado PL-UV-H-2B mantiene las prestaciones como agente antimicrobiano frente a *Escherichia coli* a todas las dosificaciones, si bien la dosis de formulado más alta permite obtener un halo de inhibición mayor. Este buen comportamiento puede ser también observado frente a *Staphylococcus aureus*, *Stichococcus bacillaris* y *Scenedesmus vaculatus*, con las tres dosificaciones empleada. En cambio, frente el *Aspergillus niger* el formulado pierde parte de su efectividad, dado que no posibilita la formación del halo de inhibición, si bien no se observa crecimiento en superficie.

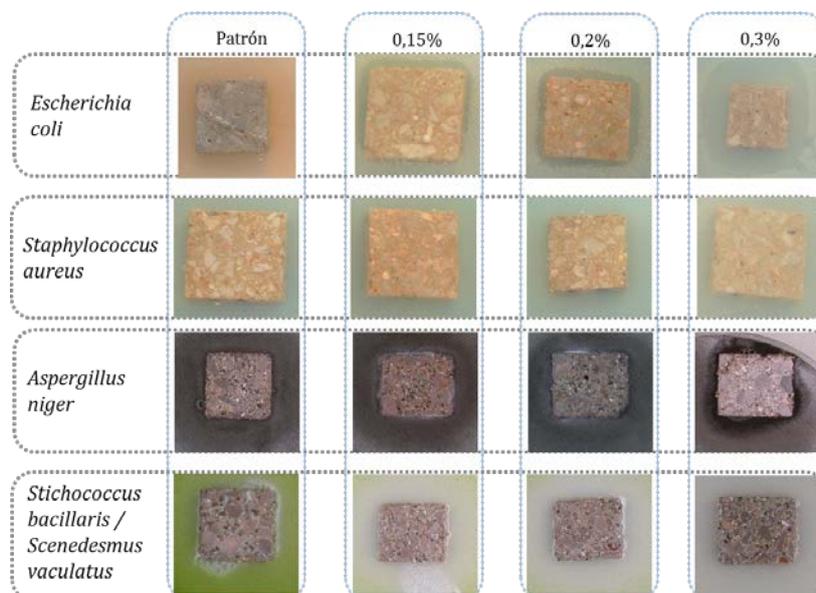


Figura 5.8.- Segunda fase de ensayos microbiológicos realizados con el formulado PL-UV-H-2B

Microorganismo	Índice de desarrollo			
	Dosis (%)			
	Patrón	0,15	0,2	0,3
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	2	1	1	1
<i>Stichococcus bacillaris / Scenedesmus vaculatus</i>	2	0	0	0

Tabla 5.9.- Interpretación de la segunda fase de ensayos microbiológicos realizados con el formulado PL-UV-H-2B

5.3 CONCLUSIONES

Una vez realizada la fase de ensayos con los 5 formulados multicomponente, las conclusiones extraídas fueron:

- Los formulados BXT/12C, BXT/10P y BXT/1 perjudican de forma clara algunas de las propiedades mecánicas del hormigón. En los tres casos, la presencia de los formulados afecta al desarrollo de las resistencias del hormigón y en el caso concreto del BXT/10P también provoca una reducción en los valores de densidad del material.
- En el caso del formulado BXT 1, no afecta a ninguna de las propiedades mecánicas del hormigón si bien su efecto antimicrobiano frente al *Aspergillus niger* es totalmente insuficiente.

- Solamente el formulado PL-UV H-2B presenta efectividad frente a todas las especies de microorganismos evaluadas durable, sin perjudicar propiedades fundamentales del hormigón y mostrándose como un producto totalmente insoluble, por lo tanto cabe afirmar que el formulado cumple todos los requisitos planteados.

6. ENSAYOS DE CAMPO

6.1 INTRODUCCIÓN

El objetivo del capítulo 6 es presentar los resultados obtenidos en los ensayos de campo, realizados en las instalaciones de la Federación Catalana de Vela, localizadas en el puerto de Barcelona.

En la rampa de bajada desde el embarcadero al mar, en la zona donde rompen las olas, crecen de manera generalizada algas que provocan graves problemas a los usuarios y a los responsables del embarcadero. Las algas hacen que la rampa de hormigón se convierta en un firme extremadamente deslizante, haciendo que la acción de bajar la embarcación al mar sea un acto peligroso. Para mitigar este problema en la época de mayor desarrollo de las algas, estas son eliminadas mediante agua a presión, si bien este proceso, junto al desarrollo de las algas, provoca un deterioro de esta parte del puerto deportivo.

Los ensayos de campo que se muestran en este capítulo consistieron en la ubicación de varias series de probetas en la rampa de descenso al mar, para estudiar el efecto de diversos tratamientos antialgas.

En el primer ensayo realizado se evaluó la efectividad del formulado PL-UV-H-2B, que proporcionó los mejores resultados en los ensayos realizados en el laboratorio. Tal y como se describe en el capítulo 3, se confeccionaron 6 placas de hormigón con 3 niveles de

rugosidad superficial, de las cuales solamente 3 placas contenían formulado, para de este modo evaluar la influencia la rugosidad superficial en el crecimiento de las algas.

En primera instancia se determinó la porosidad de las seis probetas y, posteriormente se fijó la placa que las contiene en la rampa de descenso al mar del club de vela. Durante un periodo de 5 meses se evaluó el crecimiento de las algas en cada una de las placas mediante seguimiento fotográfico. Una vez finalizado el periodo de 5 meses se retiró la placa y se realizaron ensayos microbiológicos en el laboratorio para comprobar la eficacia del formulado en condiciones reales de uso.

La segunda fase de ensayos de campo consistió en comprobar la eficacia del formulado PL-UV-H-3B, que contiene únicamente un agente antialgas en su composición, para abaratar los costes del tratamiento. Del mismo modo que en la primera fase de ensayos de campo se evaluó el crecimiento de las algas mediante seguimiento fotográfico, durante 2 meses.

6.2 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE CAMPO

6.2.1 Formulador PL-UV-H-2B

El formulador evaluado en esta fase, PL-UV-H-2B, se adicionó a 0,3% spms, que fue la dosis con la que se obtuvieron mejores prestaciones en los ensayos de laboratorio. En primera instancia se evaluó la absorción de agua en la superficie de las placas, como se describió en el capítulo 3, obteniendo las curvas de absorción de agua mostradas en la Figura 6.1. Se puede apreciar que la absorción de agua por parte del hormigón varía en función de la rugosidad superficial de las muestras, si bien cabe destacar que no se observa diferencia alguna entre los valores obtenidos de las placas que contienen PL-UV-H+M-2B y las que no lo contienen.

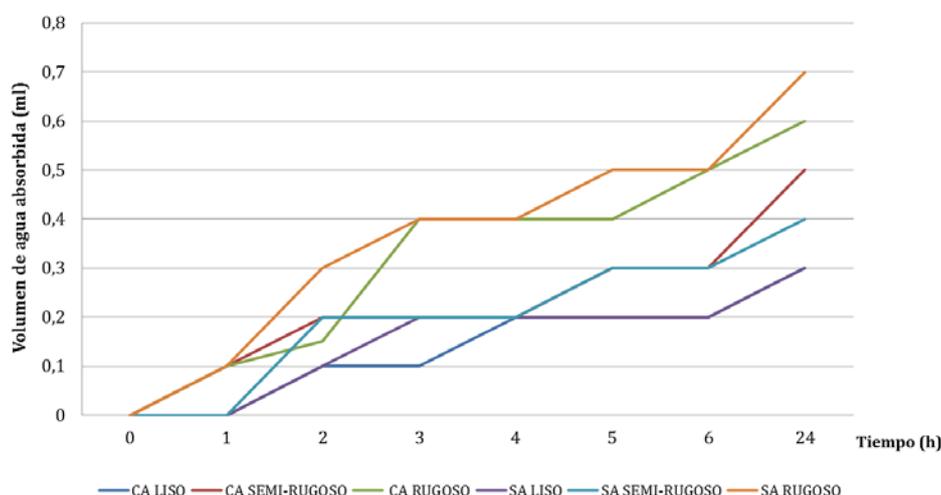


Figura 6.1.- Variación del volumen de agua absorbido con el tiempo de las probetas fabricadas

Por otra parte, es importante destacar las importantes diferencias que se dan en los valores de absorción, dependiendo del nivel de rugosidad superficial; la absorción de agua de las probetas que presentan el acabado superficial liso es de 0,3 ml a las 24h, y de 0,5 ml y 0,7 ml para los acabados semi-rugoso y rugoso, respectivamente. Estos resultados evidencian la influencia del acabado superficial en las propiedades del material. Consecuentemente, cabe esperar que la capacidad de colonización del hormigón por parte de las algas será mayor cuanto más rugosa sea la superficie de éste, debido a su mayor porosidad superficial, aspecto que facilitará el desarrollo microbiano superficial (Guillite and Dreesen, 1995; Gaylarde, 2001; Tiano, 2002; Barberousse et al., 2007; De Belie, 2010).

Evolución del crecimiento de las algas en las placas

Una vez determinados los valores de porosidad superficial en el laboratorio se situaron las placas en el puerto. Éstas permanecieron en el puerto durante 16 semanas, desde el 5/12/2011 hasta el 30/3/2012. Durante este periodo se registró la temperatura del mar (Figura 6.2), para evaluar su influencia en el crecimiento de las algas, así como se realizó un seguimiento fotográfico de la superficie de las placas, para evaluar el crecimiento de algas en las mismas. Durante la duración del ensayo la temperatura del mar varió entre los 12,5° y los 17° C (ver Figura 6.2); al ser unos valores de temperatura bajos, cabe esperar un crecimiento bastante limitado de las algas, independientemente del tratamiento antialgas empleado.

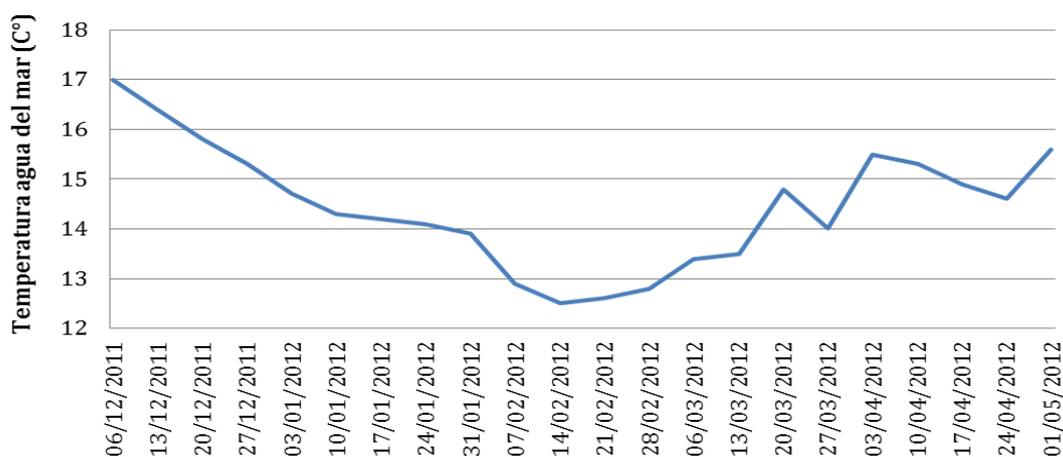


Figura 6.2.- Variación de la temperatura del mar durante el primer ensayo de campo

En la Figura 6.3 se puede apreciar que probeta con acabado liso y sin tratamiento antialgas (probeta 1) no es colonizada por parte de las algas hasta la semana 12, cuando aparece crecimiento de algas en aproximadamente un 5% de la superficie de la probeta. A partir de la semana 16 este crecimiento se hace más evidente, alcanzando la superficie cubierta el 15%. Cabe destacar que la superficie ocupada por las algas, tanto en la semana 12 como en la semana 16, no aumenta en gran medida, si bien se aprecia que las algas muestran un color verde muy vivo, que indica que las algas van desarrollándose en la superficie ya colonizada.

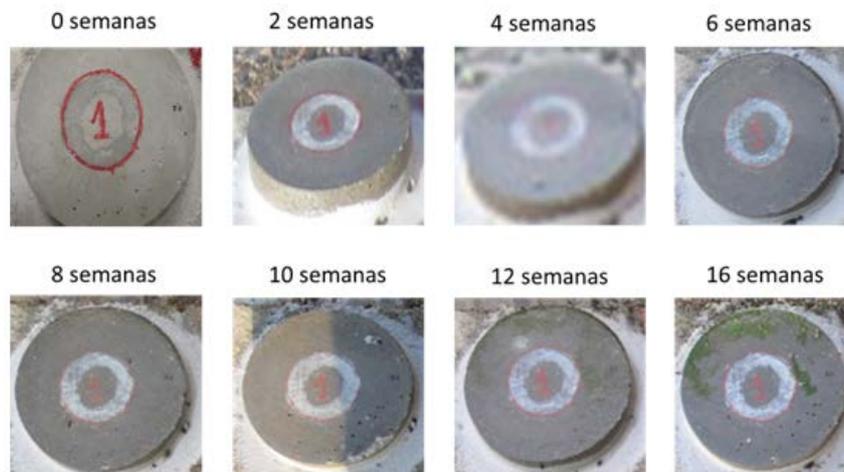


Figura 6.3.- Evolución de la superficie de las probetas no tratadas con acabado liso

Del mismo modo que sucede en el caso de las probetas con acabado liso, en las probetas con acabado semi rugoso y sin tratamiento antialgas (Figura 6.4), se aprecia que el proceso de colonización comienza entre la semana 10 y la 12, donde se observa de forma clara la presencia de algas.



Figura 6.4.- Evolución de la superficie de las probetas no tratadas con acabado semi-rugoso

La superficie colonizada a las 12 semanas alcanzó el 25% de la superficie total, aumentando hasta el 40% a las 16 semanas. A diferencia del caso anterior, en la probeta con acabado semi rugoso sí que se observa un mayor crecimiento de las algas sobre la superficie, además de presentar un verde más intenso que demuestra una mayor actividad. Este hecho se debe a que este acabado más rugoso hace que la fijación de las algas sobre el soporte sea más fácil y por lo tanto, un entorno más propicio para su colonización y desarrollo.

El crecimiento de algas en la probeta con acabado rugoso y sin tratamiento antialgas (Figura 6.5), al igual que en los anteriores casos tiene lugar a partir de la semana

12, ocupando alrededor de un 10% de la superficie total de la probeta. Lo más destacable en esta caso es que, a diferencia de lo que cabía esperar, la colonización de la superficie por parte de las algas ha sido menor que los observados con acabados liso y semi rugoso. Una posible explicación a este hecho puede ser que a pesar de que el acabado superficial sea más rugoso y tenga una mayor porosidad, este acabado no es el que posee una mayor superficie específica, que haría que la colonización fuera mayor.



Figura 6.5.- Evolución de la superficie de las probetas no tratadas con acabado rugoso

En el caso de la probeta con acabado liso y tratamiento antialgas (Figura 6.6), se observa que no hay colonización durante las 16 semanas que dura el ensayo. Resultados similares se aprecian en las otras probetas con tratamiento antialgas, tanto en el caso de acabado semi-rugoso (Figura 6.7) como en el caso del acabado rugoso (Figura 6.8).

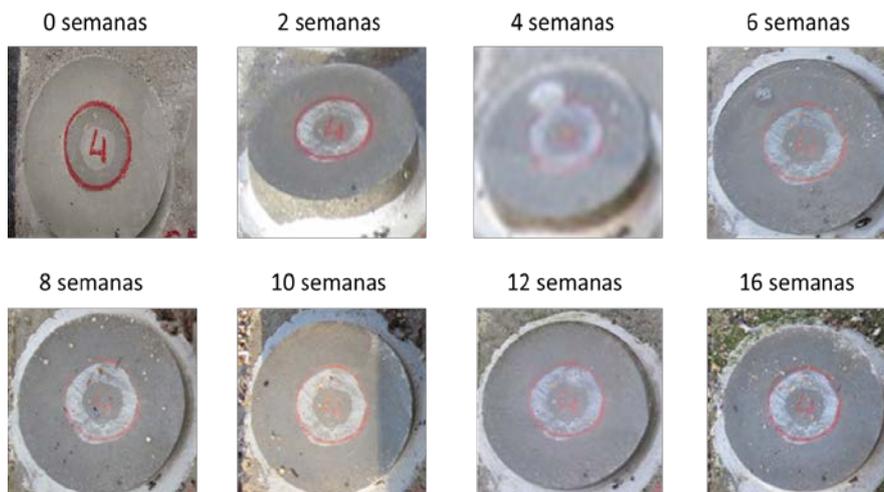


Figura 6.6.- Evolución de la superficie de las probetas tratadas con acabado liso

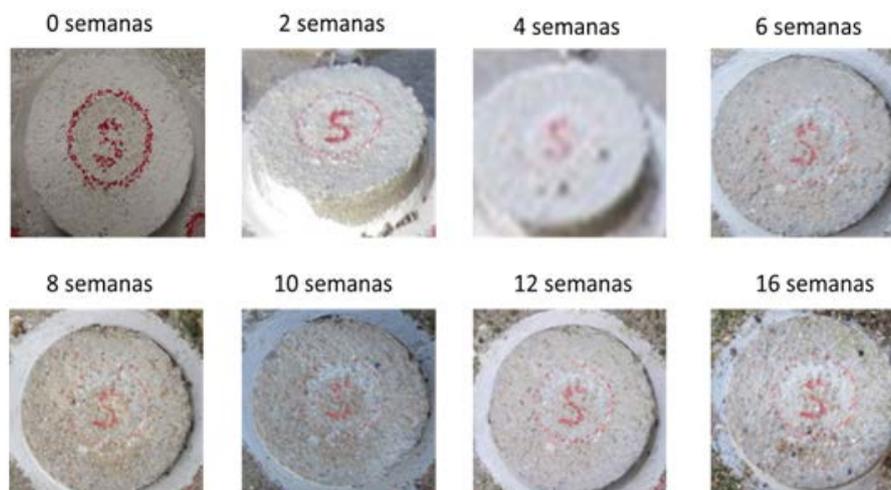


Figura 6.7.- Evolución de la superficie de las probetas tratadas con acabado semi-rugoso

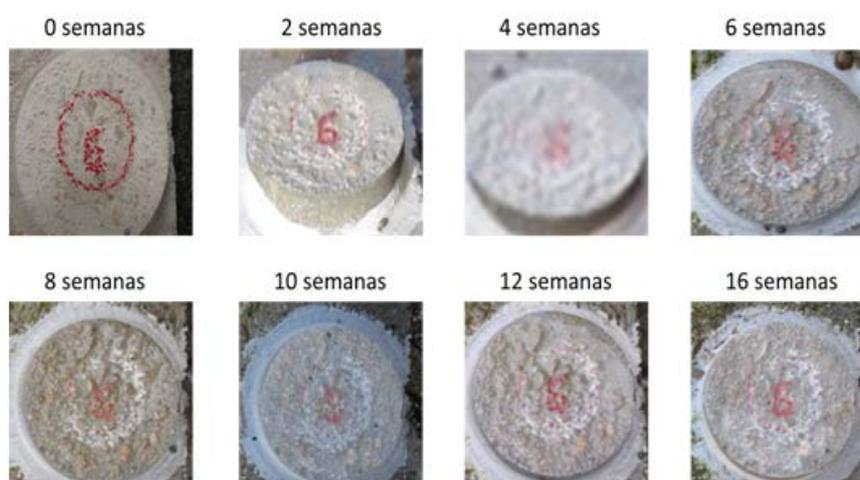


Figura 6.8.- Evolución de la superficie de las probetas tratadas con acabado rugoso

La conclusión que se puede extraer tras esta fase de ensayos de campo es que, a pesar de las bajas temperaturas del agua del mar, las algas tienen capacidad de colonizar una superficie de hormigón, independientemente del nivel de rugosidad de esta, si bien un acabado semi-rugoso es el más propicio para que ello suceda. Con ello se pone de manifiesto que una superficie que presente una mayor capacidad de absorción de agua no tiene necesariamente más superficie específica, y por lo tanto, no ha de ser la superficie más fácil de colonizar, hecho que lleva a pensar que la determinación de la absorción de agua no es el método más indicado para determinar la susceptibilidad de colonizar el material por parte de microorganismos.

Así mismo, cabe destacar que la presencia del formulado PL-UV-H-2B es un eficaz tratamiento antialgas, puesto que las probetas tratadas no presentaron crecimiento en su superficie en ninguno de los tres casos estudiados (liso, semi-rugoso y rugoso) durante los 4 meses que duró el ensayo.

Comprobación de la durabilidad del efecto biostático mediante ensayos de laboratorio

Una vez evaluadas las propiedades antifúngicas del formulado en los ensayos de campo, se estimó oportuno comprobar la durabilidad del efecto del biocida tras el periodo de ensayo, mediante ensayos microbiológicos en laboratorio. La metodología seguida para la realización de los ensayos de laboratorio fue la misma que la empleada en las fases de ensayos microbiológicos anteriores. En esta ocasión sólo se evaluó el efecto frente a algas, puesto que es el microorganismo que se pretende controlar para la aplicación estudiada, empleando como indicadores las especies *Stichococcus bacillaris* y *Scenedesmus vacuolatus*. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.9 y la Tabla 6.1.

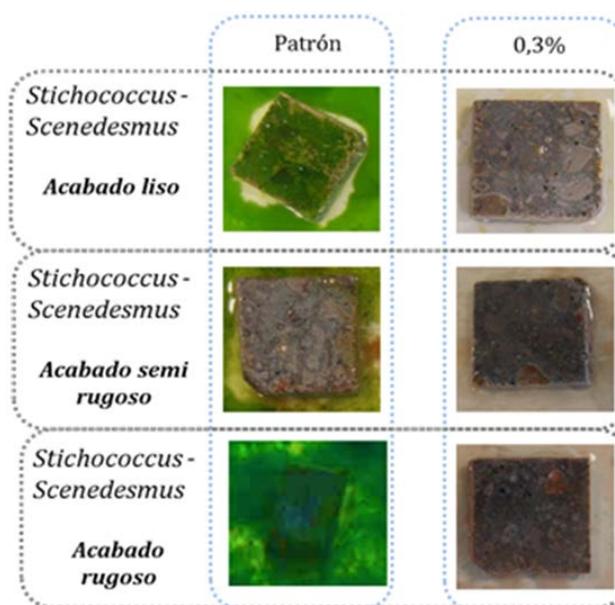


Figura 6.9.- Resultados microbiológicos del formulado PL-UV-H-2 B tras los ensayos de campo

Tipo de acabado	Índice de desarrollo	
	Dosis (%)	
	Patrón	0,3
Liso	2	0
Semi-rugoso	1	0
Rugoso	2	0

Tabla 6.1.- Interpretación de los ensayos microbiológicos del formulado PL-UV-H-2B tras los ensayos de campo

Los resultados muestran que el formulado PL-UV-H-2B presenta una alta efectividad de inhibición del crecimiento de las algas evaluadas, incluso tras el periodo de ensayo de campo, obteniéndose excelentes resultados en todas las muestras ensayadas independientemente del nivel de rugosidad superficial. El empleo de este formulado permite inhibir la colonización superficial del hormigón por parte del alga, además de

producir un halo de inhibición alrededor de la muestra de hormigón, obteniendo un índice de crecimiento de 0.

6.2.2 Formulador PL-UV-H-3B

La segunda fase de los ensayos de campo tuvo como objetivo evaluar la efectividad como agente antialgas del formulador PL-UV-H-3B, el cual, a diferencia del PL-UV-H-2B, no contiene en su composición ningún agente bactericida, puesto que los microorganismos a controlar en este ensayo son únicamente algas. En la Tabla 6.2 se muestran las características físicas y dosificación del formulador PL-UV-H-3B. Tal y como se realizó con el resto de formuladores, antes de realizar la prueba de campo se comprobó que el formulador no perjudicara de forma notable ninguna de las propiedades fundamentales del hormigón.

Formulador PL-UV-H-3B	Composición	
	ACTICIDE SR 1453	MOUSSEX FILLER CALIZO
Principio activo	2-Octil-2H-isotiazol-3-ona + terbutrin	
Características físicas	Producto sólido	
Propiedades	Fungicida antialgas	
Dosificación (%spms)	0	0.3
Resultados ensayos mecánicos		
Consistencia (mm)	149	151
Densidad en estado fresco (g/l)	2526	2514
Densidad en estado endurecido (g/l)	2478	2469

Tabla 6.2.- Datos de identificación y características del formulador PL-UV-H-3B.

La influencia del formulador PL-UV-H-3B sobre la consistencia es prácticamente nula, dándose una diferencia máxima de 2 mm. Lo mismo sucede con la densidad del hormigón, donde la influencia del formulador es mínima, observándose unas diferencias menores al 2%, tanto en densidades en fresco como en estado endurecido.

En la Figura 6.10 se muestran los resultados de los ensayos mecánicos, a las edades y temperaturas consideradas en el resto de formuladores. Se puede apreciar que la adición del formulador PL-UV-H-3B no tiene un efecto significativo en las resistencias del material, si se compara con la resistencia del material patrón. En referencia a los valores de resistencias a compresión (Figura 6.10a), cabe decir que no se ven afectados en gran medida por la incorporación del agente antialgas, manteniéndose dentro de un mismo orden de magnitud, dándose una diferencia máxima de un 5% en las resistencias a 28 días.

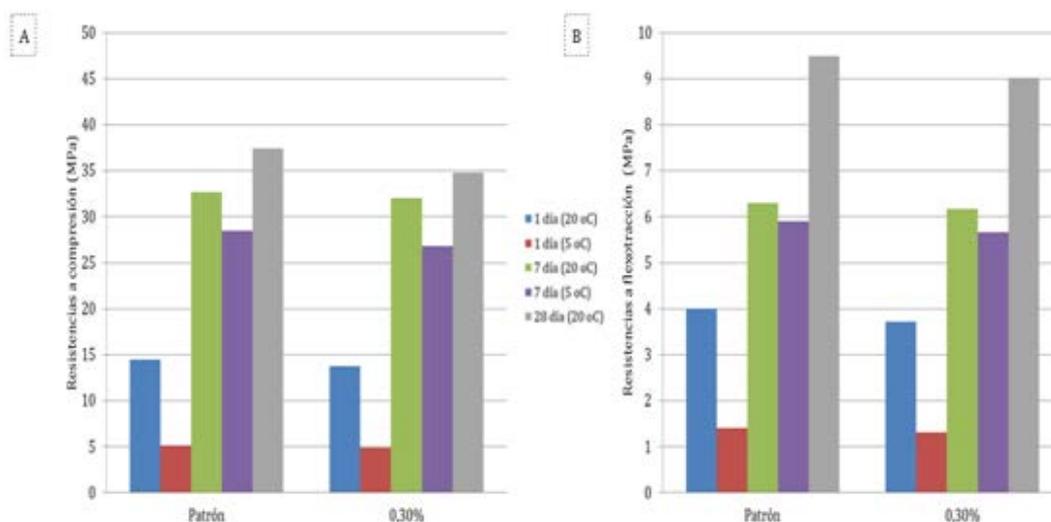


Figura 6.10.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado PL-UV-H-3B: a) compresión y b) flexotracción

En términos generales, se puede afirmar que, del mismo modo que sucede con los valores de resistencias a compresión, los valores de resistencia a flexotracción (Figura 6.10b) no se ven afectados cuando se dosifica el agente antialgas, observándose una diferencia máxima menor al 7% entre los valores obtenidos a 28 días del hormigón referencia y el tratado. Tampoco se aprecia una influencia significativa de la adición del formulado en el desarrollo de las resistencias. Por tanto, se puede concluir que el formulado no altera las propiedades del hormigón de manera significativa.

Determinación de la lixiviación del principio activo

Debido a la escasa diferencia existente entre los formulados PL-UV-H-3B y el PL-UV-H-2B (presencia de IRGASAN DP300®), no se considera necesaria la realización del ensayo para la determinación del nivel de lixiviación con el formulado PL-UV-H-3B, ya que los ensayos realizados con el formulado PL-UV-H-2B son extrapolables.

Evolución del crecimiento de las algas en las placas

Del mismo modo que en el anterior ensayo de campo, se hizo un seguimiento fotográfico de dos probetas de hormigón colocadas en el puerto de Barcelona, de las que solamente una contenía el formulado PL-UV-H-3B. Este segundo ensayo de campo duró 8 semanas, desde el 13/07/2012 hasta 31/08/2012, controlándose como en el ensayo anterior la temperatura del agua y tomando fotografías de la superficie de las probetas semanalmente. Este periodo de ensayos tuvo una duración menor, dado que en esa época del año el crecimiento de las algas es muy rápido, tanto por el mayor número de horas de luz como por la mayor temperatura del agua.

En la Figura 6.11 se muestra la variación de temperatura durante el periodo que duró el segundo ensayo de campo. La diferencia de temperaturas es casi 10° C superior a

la registrada en el primer ensayo de campo, con lo que cabe esperar un crecimiento de algas más rápido. Este mayor crecimiento se evidencia en las imágenes tomadas durante el segundo ensayo de campo (Figura 6.12). Se eligió un intervalo semanal para poder acompañar el crecimiento más rápido de las algas. La muestra que no tenía tratamiento (probeta de la derecha) es muy fácilmente colonizable por las algas, presentando crecimiento a la semana de su colocación (Figura 6.12b).

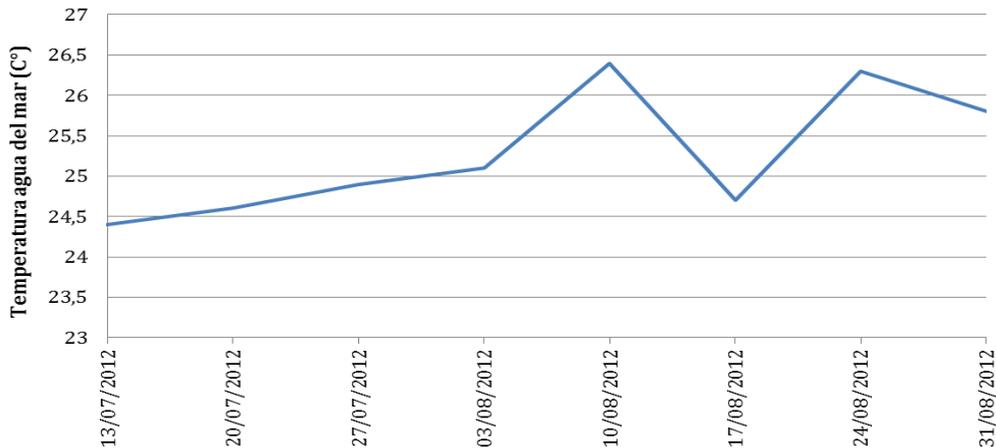


Figura 6.11.- Variación de la temperatura del mar durante el segundo ensayo de campo

La muestra tratada con el formulado PL-UV-H-3B retrasa de manera clara la colonización por parte de las algas durante 4 semanas (Figura 6.12e). A partir de este momento el desarrollo de las algas sobre la muestra tratada va en aumento hasta alcanzar la totalidad de la superficie de la probeta en la semana 8 (Figura 6.12h), si bien en la muestra sin tratar fue totalmente colonizada por las algas sólo dos semanas después de su colocación en el puerto (Figura 6.12c).



Figura 6.12.- Evolución de la superficie de las probetas durante el segundo ensayo (izquierda, probeta tratada; derecha, probeta sin tratar)

La conclusión extraída tras la realización del segundo estudio de campo es que el formulado PL-UV-H-3B tiene un claro efecto inhibitor del crecimiento de las algas sobre el hormigón, si bien tras un periodo de tiempo la superficie se cubre de una capa de biofilm formada por células microbiológicas, activas y no activas, y metabolitos de microorganismos (Saad, 2004), siendo esta capa un soporte que permite a las algas fijarse y desarrollarse.

Por lo tanto, para poder conservar una superficie totalmente protegida contra el crecimiento de algas por un amplio periodo de tiempo se debe evitar la formación de la capa de biofilm mediante un proceso de limpieza preventiva. En el caso de que el hormigón esté tratado con un sistema antialgas, el proceso de limpieza podrá ser mucho menos frecuente y menos agresivo, reduciendo de una manera notable el mantenimiento de la estructura y la degradación por este proceso.

Comprobación de la durabilidad del efecto biostático mediante ensayos de laboratorio

Tras finalizar el segundo ensayo de campo, se retiraron las probetas y se sometieron a una segunda fase de ensayos microbiológicos, para evaluar la durabilidad del efecto biostático del formulado tras el ensayo de campo. En la Figura 6.13 se observan las imágenes de los cultivos obtenidos con las especies de algas *Stichococcus bacillaris* y *Scenedesmus vacuolatus* en partes de las probetas ensayadas. Se puede apreciar que el formulado PL-UV-H-3B presenta una alta actividad de inhibición de crecimiento de algas evaluadas y desarrolla un halo de inhibición alrededor de la muestra, incluso después de permanecer dos meses en condiciones reales de uso.

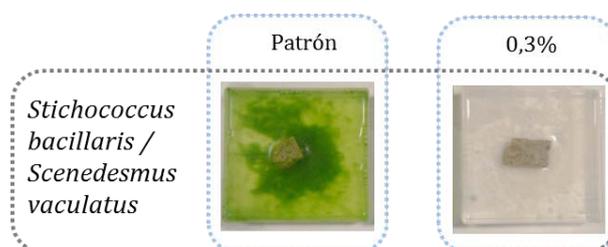


Figura 6.13.- Resultados microbiológicos del formulado PL-UV-H-3 B tras los ensayos de campo

6.3 CONCLUSIONES

Tras la fase de ensayos de campo, en las que se pretende evaluar las prestaciones de los formulados PL-UV-H-2B y PL-UV-H-3B en condiciones reales de uso, se puede afirmar que:

- En condiciones reales de uso (puerto de Barcelona), la presencia del formulado PL-UV-H-2B retrasa el crecimiento de algas sobre la superficie de hormigón hasta en

16 semanas mostradas en el laboratorio confirmando los excelentes resultados obtenidos en los ensayos de laboratorio.

- Otro aspecto que se pone de manifiesto en la fase experimental de campo es que independientemente del nivel de rugosidad de la superficie del hormigón, el empleo del formulado PL-UV-H-2B, retrasa la aparición de las algas sobre el hormigón.
- El uso de un producto únicamente alguicida, como el formulado PL-UV-H-3B, permite retrasar claramente el crecimiento de las algas y reducir el coste de del tratamiento de forma sustancial.

7. ENSAYOS ATAQUE ÁCIDO SULFÚRICO BIOGÉNICO

7.1. INTRODUCCIÓN

De forma paralela a la realización de los ensayos de laboratorio descritos en los capítulos 4 y 5, en los que se evaluó la efectividad tanto de los agentes antimicrobianos monocomponente como de los multicomponente frente a los microorganismos indicadores (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus aureus* y *Scenedesmus vaculatus* y *Stichococcus bacillaris*), se desarrolló una fase de ensayos mediante la cual poder determinar la efectividad de un agente antimicrobiano como inhibidor del crecimiento del *Thiobacillus thiooxidans*.

Mediante esta fase de ensayos se buscó reproducir uno de los procesos de biodegradación más importantes y a su vez más conocidos, como es el producido por la acción del ácido sulfúrico biogénico procedente del metabolismo de bacterias sulfooxidantes. Tal y como se expuso en el capítulo 2 este proceso degenerativo del hormigón se produce en unas condiciones de muy determinadas de pH y de concentración de azufre, además de presencia de bacterias sulforeductoras y sulfooxidantes, por lo que principalmente se da en canalizaciones residuales y/o fecales.

El objetivo del presente capítulo es evaluar la efectividad del formulado BXT/I frente como inhibidor del de crecimiento de la bacteria *Thiobacillus thiooxidans*, mediante el empleo de dos métodos diferentes, descritos en el capítulo 3.

El primero de ellos, denominado ensayo por impregnación, nos permite evaluar la capacidad que tiene el formulado de impedir/reducir el crecimiento del microorganismo estudiado en un medio de cultivo aplicado en la superficie del hormigón tratado y posteriormente ser incubado en placa. Mediante este ensayo se puede observar el número de colonias viables que se forman una vez que el medio de cultivo inoculado con *Thiobacillus thiooxidans* tras haber estado en contacto con el hormigón tratado y sin tratar y poder analizar las diferencias.

Por su parte, el segundo ensayo tiene como objetivo reproducir el proceso de biodegradación que da en las tuberías de hormigón de desagüe, pudiéndose determinar la diferencia de peso que experimentan las probetas de hormigón, la evaluación de la concentración de Ca^{2+} y SO_4^{2-} en el medio de cultivo, así como la variación del pH.

7.2. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE LABORATORIO

El formulado BXT/I empleado para la realización de los ensayos de ataque con ácido sulfúrico de origen biogénico, contiene únicamente como principio activo un bactericida (Irgasan DP 300®) debido a que el microorganismo a controlar, *Thiobacillus thiooxidans*, es una bacteria. La concentración de materia activa en el formulado es del 25% y cuenta con un agente desaireante (TIBP) con el que se pretende garantizar que los valores de densidad en el hormigón tratado se mantengan dentro del mismo orden que en el hormigón patrón.

En esta serie de ensayos se evalúa el efecto del formulado a una única dosificación (0,17% spms) debido a la complejidad de los pruebas realizadas. Tras la experiencia en ensayos anteriores y con el fin de evitar pérdidas de consistencia y de resistencia y/o oclusiones de aire, se optó por utilizar como base del producto filler calizo. En la Tabla 7.1 se presentan los datos de identificación del formulado BXT/I, incluyendo sus características, las dosificaciones empleadas, así como los resultados mecánicos obtenidos.

Formulado BXT/I	Composición	
	IRGASAN DP 300	TIBP FILLER CALIZO
Principio activo	2,4,4'-Tricloro-2' hidroxí-difenil-eter	
Características físicas	Producto sólido	
Propiedades	Bactericida	
Dosificación (% spms)	0	0,17
Resultados ensayos físicos		
Consistencia (mm)	119	121
Densidad en estado fresco (g/l)	2425	2423
Densidad en estado endurecido (g/l)	2333	2335

Tabla 7.1.- Datos de identificación y características del formulado BXT/I.

Tal y como se observa en la Tabla 7.1, la adición del formulado BXT/I tiene una escasa repercusión sobre la consistencia del hormigón, dándose una diferencia máxima de 2 mm (1,7%) a una dosis de 1% spms. En cuanto a los valores de densidad se puede observar una ligera disminución en la densidad en estado fresco en el hormigón tratado con el formulado, si bien, la diferencia observada no superó el 1%. En cuanto a la densidad en estado endurecido, los valores se mantienen dentro del mismo nivel tanto en el hormigón tratado como en el hormigón referencia, observándose una diferencia máxima inferior al 1%, imputable a la variabilidad propia del ensayo.

En relación a los resultados de los ensayos mecánicos, los mismos se presentan en la Figura 7.1a, los correspondientes a la resistencia a compresión para tres edades diferentes (1, 7 y 28 días) y a temperaturas de 5 y 20° C, mientras que en la Figura 7.1b, se presentan los resultados a flexotracción en las mismas condiciones de temperatura y edades.

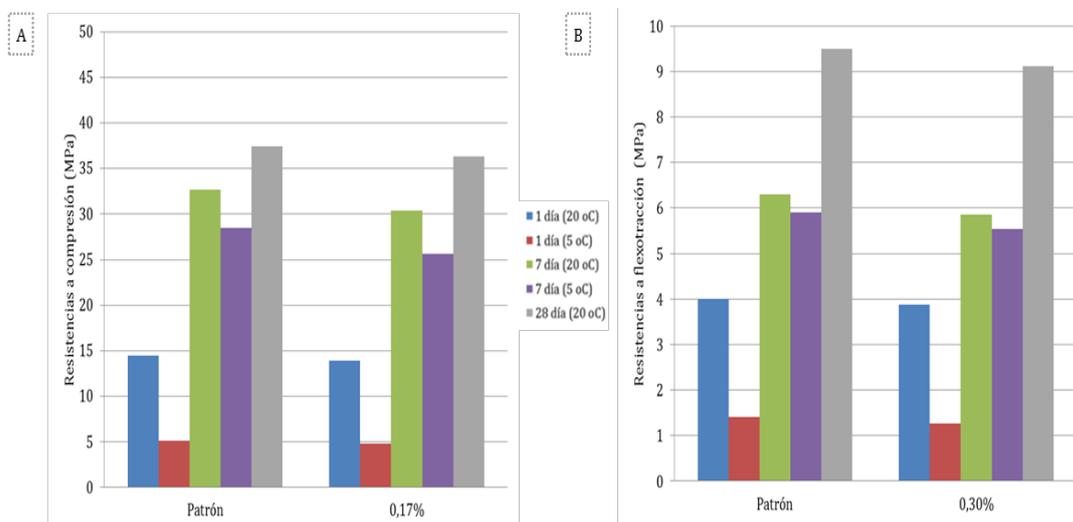


Figura 7.1.- Evolución de las resistencias mecánicas en función de la dosificación del formulado BXT/I: a) compresión y b) flexotracción

Tras estudiar los datos se puede apreciar que la adición del formulado BXT/I no afecta en gran medida al desarrollo de las resistencias a compresión y a flexotracción (Figura 7.1). Respecto a los valores de resistencias a compresión, cabe decir que no se ven afectados en gran medida por la incorporación del agente bactericida, manteniéndose dentro de un mismo orden de magnitud, dándose una diferencia máxima de un 8% en las resistencias a 7 días a 5° C. Por su parte, los valores obtenidos de resistencias a flexotracción del mismo modo que sucede con los valores de resistencias a compresión, dándose diferencias mínimas entre los valores obtenidos del hormigón el tratado y el patrón. En cuanto a la influencia del producto en el desarrollo de resistencias a edades iniciales a bajas temperaturas, se puede decir que no es significativa, puesto que los valores se mantienen dentro del mismo orden.

Tras evaluar los resultados de los ensayos mecánicos y concluir que el efecto que tiene el formulado BXT/I no altera las propiedades del hormigón de manera significativa,

se procede a la realización de los ensayos microbiológicos, mediante los cuales determinar las prestaciones antibacterianas del formulado.

7.2.1. Determinación de la lixiviación principio del activo

Considerando que las diferencias entre el formulado BXT/I y el formulado PL-UV-H+M-2B son mínimas, no se considera necesario la realización del ensayo para la determinación del nivel de lixiviación con el formulado BXT/I ya que el ensayos realizados con el formulado PL-UV-H+M-2B son extrapolables.

7.2.2. Evaluación de las propiedades antimicrobianas

En esta fase de ensayos se llevaron a cabo dos tipos de ensayos mediante los cuales se determinaron las prestaciones como inhibidor del crecimiento del *Thiobacillus thiooxidans* del formulado BXT/I: ensayo por impregnación y el ensayo por inmersión. A continuación se muestran los resultados de cada uno de ellos.

Resultados ensayos por impregnación

En la Figura 7.2 y la Figura 7.3 se pueden observar las imágenes de las placas de Petri donde se realiza el cultivo una vez éste ha estado en contacto con la superficie de hormigón, tratado y sin tratar. Este ensayo se realizó por duplicado y a dos concentraciones diferentes de *Thiobacillus thiooxidans* y durante un periodo de tiempo de 9 días y se toman cinco fotografías durante todo el proceso de incubación, en el momento inicial, a 1 día, a 4 días y 9 días.

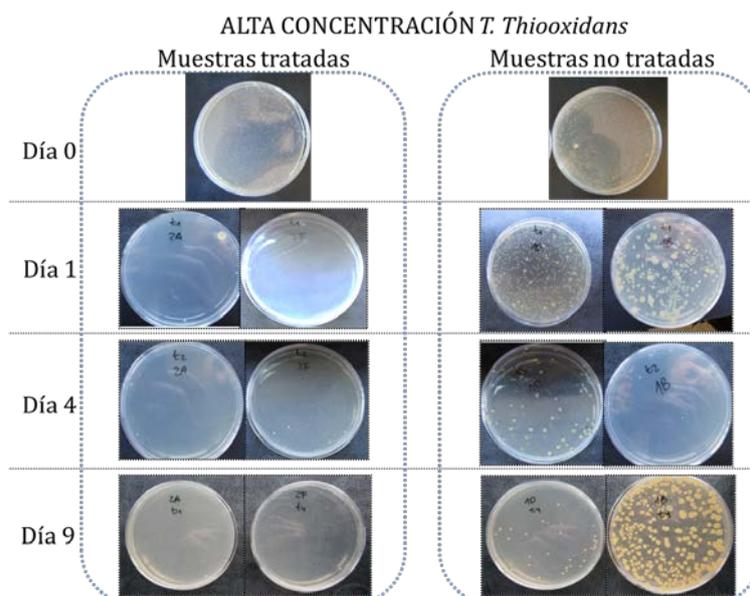


Figura 7.2.- Desarrollo de *Thiobacillus thiooxidans* a alta concentración en placa de Petri.

Tal y como se muestra en la Figura 7.2, el número de colonias formadas tras la incubación del medio de cultivo que contenía una alta concentración de *Thiobacillus thiooxidans*, que ha estado sobre la superficie de hormigón tratado es prácticamente inexistente, pudiendo observar que la superficie del medio queda perfectamente libre de cualquier tipo de formación. Este fenómeno sucede durante los 9 días que dura la incubación a excepción del momento inicial, como era de esperar, ya que la muestra se toma en el instante inmediatamente después de haber impregnado la superficie del hormigón (t_0) y por lo tanto, el agente antimicrobiano no ha tenido tiempo de reacción.

Por su parte las placas de Petri en las que se incuba el medio de cultivo que ha estado en contacto con la superficie de hormigón sin tratar experimenta una formación de colonias de *Thiobacillus thiooxidans* en su superficie en todos los estadios en los que se realiza la observación, si bien el número de colonias es muy variable. Esta diferencia en el número de colonias formadas es debida a la propia variabilidad que puede darse en el proceso de muestreo del medio de cultivo, número de microorganismo viables, además de tener en cuenta que en este ensayo se evalúa el crecimiento de un ser vivo, proceso en el que intervienen gran número de variables y por esa razón los resultados de los ensayos se evalúan de forma binaria, crece o no crece y con ello evaluar si el agente tiene actividad frente al crecimiento del *Thiobacillus thiooxidans* o no.

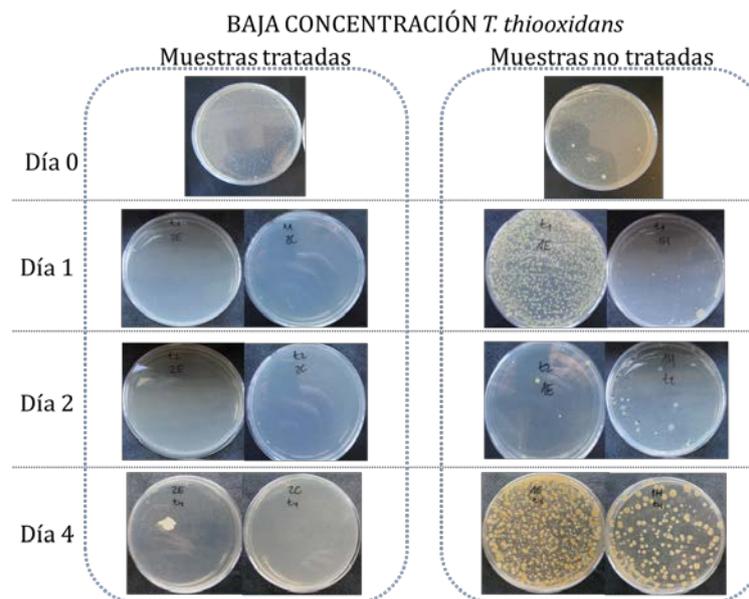


Figura 7.3.- Desarrollo de *Thiobacillus thiooxidans* a baja concentración en placa de Petri.

Del mismo modo que sucede en caso anterior, en el ensayo de impregnación con baja concentración *Thiobacillus thiooxidans* (Figura 7.3), las placas en las que se incuba el medio de cultivo con que ha estado en contacto con el hormigón tratado se observa una total inhibición del crecimiento del microorganismo durante los 9 días de incubación. El caso contrario se da en las placas en las que se incuban las muestras tomadas del medio de cultivo extraídas del hormigón que no está tratado, donde se observa crecimiento en todos los momentos en los que se realizó la observación. Asimismo, en este segundo ensayo por

impregnación también se observa una gran variabilidad en el nivel de desarrollo del *Thiobacillus thiooxidans* en las placas en las que se incubó el medio extraído del hormigón no tratado.

En la tabla 7.2 se muestran los resultados numéricos obtenidos tras el recuento de las colonias formadas en las placas de Petri, tanto de los ensayos en los que se utiliza un medio de cultivo con alta concentración de microorganismo como en los que se emplea una baja concentración.

Concentración <i>T.thiooxidans</i>	Tratamiento muestra	Repetición	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Baja	No	1	>10 ⁵	18	152	14	180
		2	>10 ⁵	>10 ⁵	7	3	177
	Sí	1	>10 ⁵	<10	<10	<10	<10
		2	>10 ⁵	<10	<10	<10	<10
Alta	No	1	>10 ⁵	60	728	<10	368
		2	>10 ⁵	30	46	49	35
	Sí	1	>10 ⁵	<10	<10	<10	<10
		2	>10 ⁵	<10	<10	<10	<10

Tabla 7.2.- Tabla resumen ensayos por impregnación obtenidos con el formulado BXT/I.

En la Tabla 7.2 se puede ver los valores del recuento de los cultivos realizados en placa de Petri llevados a cabo en el ensayo. Estos datos reflejan el comportamiento descrito anteriormente, las muestras tomadas del hormigón tratado no presentan crecimiento mientras que en las tomadas sobre el hormigón sin tratar sí lo hay, esto sucede a ambas concentraciones de microorganismo. Debe aclararse que cuando se indica el valor >10⁵, significa que el microorganismo muestra crecimiento, mientras que el valor <10, significa que no hay desarrollo microbiano.

Resultados por inmersión

En la fase de ensayos por inmersión se evaluaron 3 parámetros: *pérdida de peso de las probetas, la concentración de SO₄²⁻ y Ca²⁺ y el pH de los medios de cultivo*, con ello se pretende determinar la degradación sufrida por el hormigón provocada por el ataque de ácido sulfúrico biogénico.

Esta fase de ensayos tiene una duración de 54 días distribuidos en 3 ciclos de 17 días cada uno y empleando dos medios de cultivos diferentes, medio de cultivo Ringer (medio isotónico) y el medio de cultivo descrito por Vincke (*Vincke et al, 2000*). La razón por la que los ciclos tuvieron dicha duración y se realizaron por triplicado fue intentar maximizar el metabolismo del *Thiobacillus thiooxidans* transformando ácido sulfhídrico en ácido sulfúrico. La velocidad de este proceso metabólico será mayor en la fase inicial, puesto que habrá una mayor disposición de nutrientes en el medio y ácido sulfhídrico para

metabolizar, pasada esta fase la población del microorganismo irá disminuyendo debido a que las condiciones dejan de ser tan favorables y el efecto sobre el hormigón será menor.

Debido a que parte del ión Ca^{2+} , precipita en contacto con el CO_2 atmosférico los valores de concentración de calcio no responden a ningún comportamiento lógico por lo que no se expondrán los resultados obtenidos de los análisis.

En primer lugar se analizará la variación de peso de las muestras. En la Figura 7.4 se muestra gráficamente las variaciones de peso experimentadas por las probetas durante los tres ciclos utilizando una modificación del medio de cultivo propuesto por Vincke.

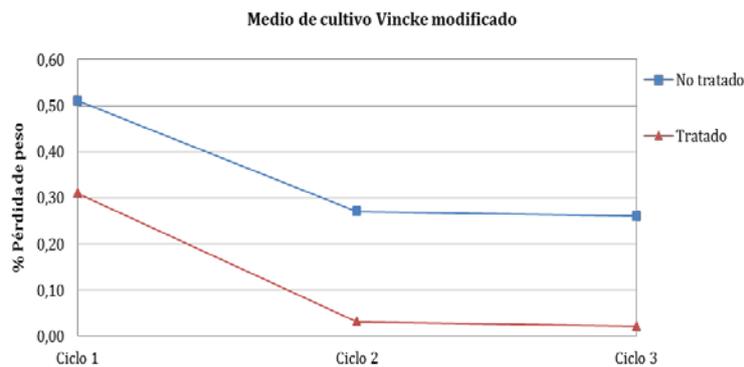


Figura 7.4.- Variación de peso de las probetas en medio de Vincke.

El análisis de los datos de la Figura 7.4, se puede afirmar que el ensayo pone de manifiesto que la presencia del *Thiobacillus thiooxidans* produce una degradación en el hormigón en presencia de ácido sulfhídrico, provocando una pérdida de peso tanto en la muestra tratada y la muestra no tratada, si bien en esta última la pérdida de masa es mayor. Este hecho pone de manifiesto la efectividad del agente antibacteriano empleado frente al *T.thiooxidans*.

Otro de los puntos a destacar es que en el primer ciclo es cuando se produce una mayor pérdida de peso, tanto en las muestras tratadas como las no tratadas, esto hecho puede explicarse a que en el momento inicial la probetas de hormigón presentan una mayor cantidad de mortero en su superficie y, por lo tanto, es más fácil de degradar que en los dos ciclos posteriores, cuando queda más árido en la superficie y las posibilidades de degradar la pasta de cemento son menores.

En la Figura 7.5 se representa la pérdida de peso acumulada tras los tres ciclos de ensayo, en el caso de las muestras de hormigón no tratadas con el agente antibacteriano se produce una pérdida de peso acumulada de 1,04% y de un 0,36% en las muestras tratadas, es decir, el tratamiento hace que esta pérdida sea casi tres veces menor.

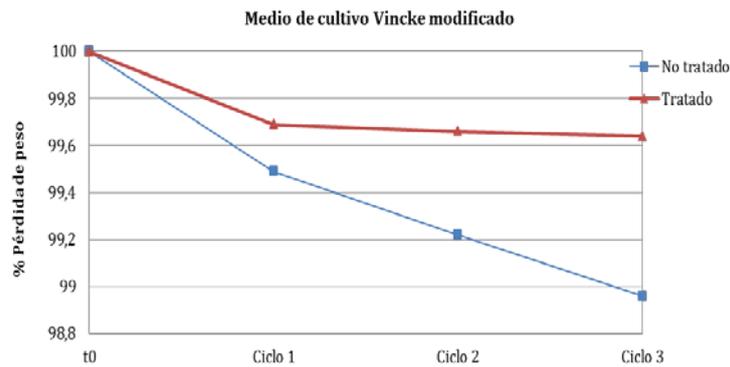


Figura 7.5.- Pérdida de peso acumulada de las probetas en medio de Vincke.

En la Figura 7.6 se representa la evolución de los pesos de las probetas durante los tres ciclos utilizando el medio de cultivo de Ringer.

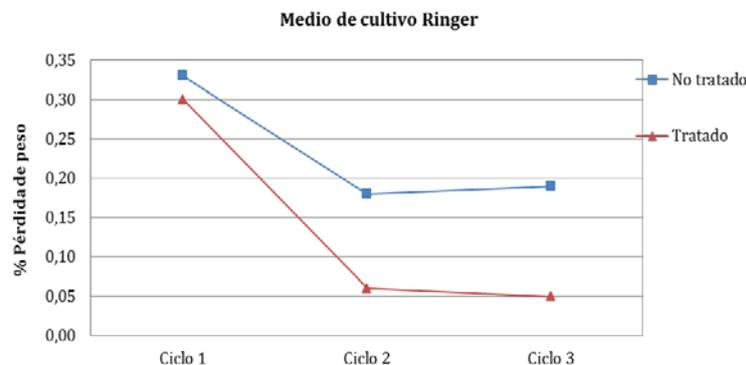


Figura 7.6.- Variación de peso de las probetas en medio de Ringer.

Del mismo modo que sucede en el ensayo anterior, cuando se utiliza en medio de cultivo de Ringer, la presencia del *T. thiooxidans* provoca una pérdida de peso en el hormigón usando el medio de cultivo de Ringer (ver Figura 7.6), si bien ésta es notablemente menor, esto se debe a que el medio utilizado en esta serie es un medio menos favorable para el crecimiento de la bacteria. Empleando el medio de cultivo de Ringer, también se observa que durante el primer ciclo se produce la mayor pérdida de peso por la misma razón expuesta anteriormente.

En la Figura 7.7 se representan los resultados de la pérdida de masa de forma acumulada, observándose en que las probetas no tratadas este valor alcanza el 0,7% mientras que en el caso de las tratadas la pérdida de masa supone un 0,41%, por lo que se puede afirmar que el tratamiento antibacteriano también presenta un efecto claro ante el microorganismo estudiado. Otra de las conclusiones extraídas tras la realización de las dos series de ensayos es que, el medio de cultivo propuesto por Vincke es especialmente apto para la simulación de este proceso de biodeterioro.

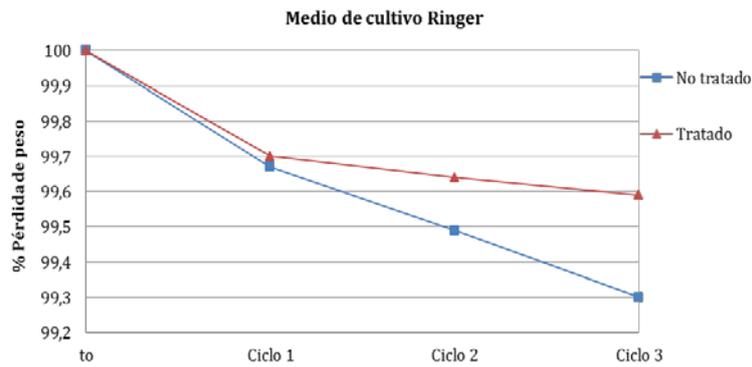


Figura 7.7.- Pérdida de peso acumulada de las probetas en medio de Ringer.

Mediante la evaluación de la variación de la concentración de sulfatos en el medio de cultivo, se pretende monitorizar el proceso de deterioro del hormigón provocado por el ácido sulfúrico procedente del metabolismo del ácido sulfhídrico por parte del *T. thiooxidans*. Una mayor cantidad de sulfatos en la solución supondrá una mayor actividad microbológica, que a su vez producirá, una mayor degradación del hormigón. En la Figura 7.8 se muestra un esquema en el que se representa la interfase hormigón–medio de cultivo donde tienen lugar las reacciones de este proceso.

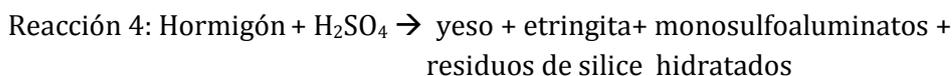
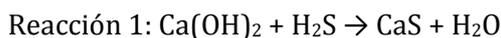
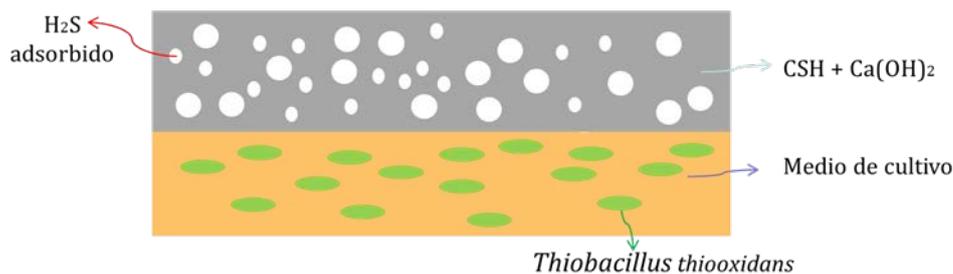


Figura 7.8.- Reacciones en el proceso de deterioro biogénico.

En la Figura 7.9 se muestran los valores obtenidos tras los tres ciclos de los que consta el ensayo con el medio de cultivo de Vincke. La primera conclusión clara que podemos extraer, es que las muestras tratadas con el sistema antibacteriano liberan al medio menos cantidad de sulfatos que las no tratadas, debido a una menor actividad metabólica del *T. thiooxidans*.

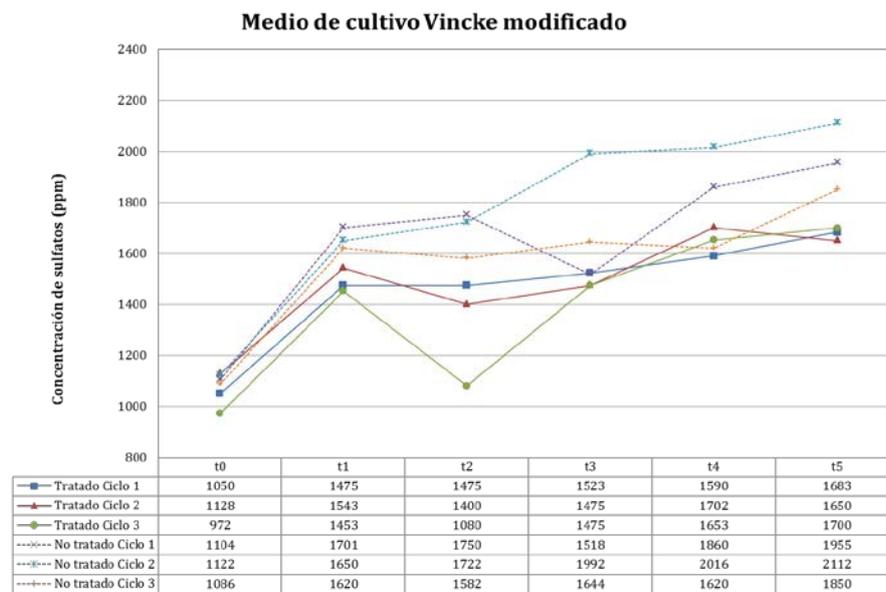


Figura 7.9.- Variación de la concentración de sulfatos en el medio Vincke.

Otro de los aspectos que cabe remarcar es que en todos los ciclos, tanto en el caso de las muestras tratadas como las muestras sin tratar, hay una mayor actividad bacteriana en la primera fase (t0-t1) y esto puede explicarse a que es cuando las condiciones de desarrollo del microorganismo son más favorables, mientras que en la fase final (t4-t5) generalmente la curva de concentración presenta una menor pendiente, poniendo de manifiesto su menor actividad.

Cabe remarcar que hay algunos de los valores de concentración de sulfatos obtenidos no responden a una lógica, como es el caso de los datos obtenidos en la muestra tratada durante el ciclo 3 en tiempo t2 y la muestra no tratada en el ciclo 1 en tiempo t3, pudiendo ser debido a un error en el proceso de análisis de la muestra debido a la dificultad que presenta la determinación de sulfatos.

En la Figura 7.10 por su parte, se muestran las diferencias en la concentración del sulfatos al inicio y al final de cada caso, pudiéndose afirmar la notable diferencia en el metabolismo de la bacteria, y por lo tanto en el biodeterioro del hormigón, entre las muestras tratadas y no tratadas. Otros de los aspectos que ponen de manifiesto los valores representados en la Figura 7.10 es que hay diferencias significativas entre los 3 ciclos realizados, esto puede ser debido a que en el proceso interviene un microorganismo y su comportamiento nunca es idéntico; o a la variabilidad propia del método de análisis. En cualquier caso, se puede decir que los valores medios en los tres ciclos de las probetas no tratadas liberan un 36% más de sulfatos a la solución que en el caso de las tratadas, hecho que se corresponde con la mayor pérdida de peso comentada en el punto anterior.

Medio de cultivo Vincke modificado

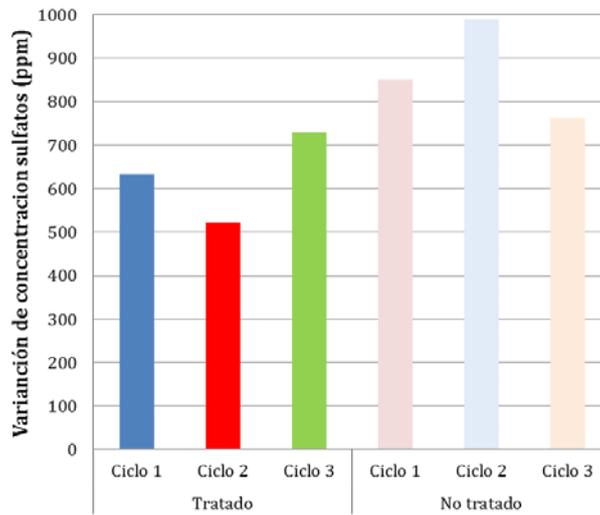


Figura 7.10.- Variación de la concentración total de sulfatos en el medio Vincke.

En relación a los ensayos realizados con el medio de cultivo de Ringer, en la Figura 7.11 se muestran los valores obtenidos en los tres ciclos de pruebas llevadas a cabo, tanto con las muestras tratadas como con las no tratadas.

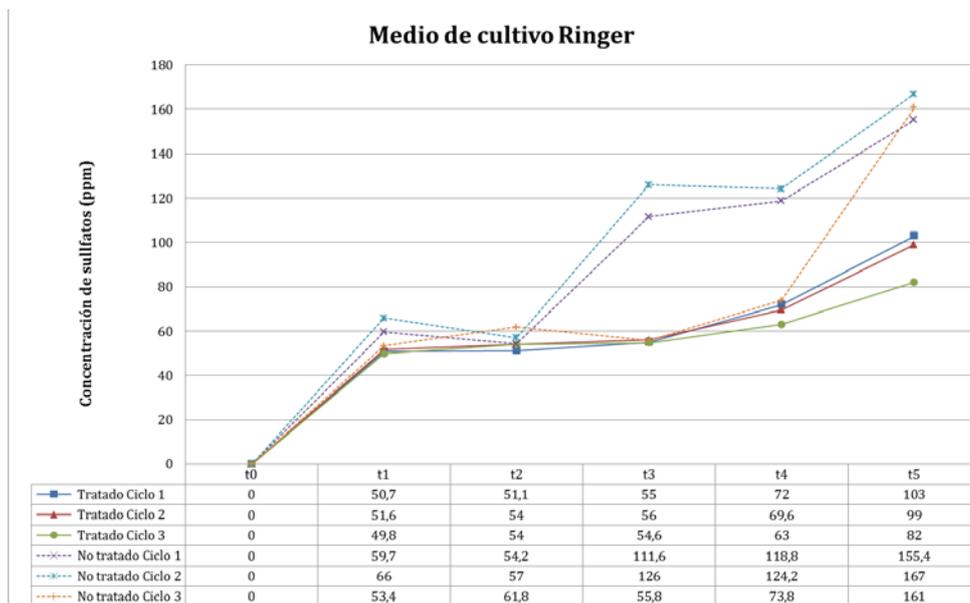


Figura 7.11.- Variación de la concentración de sulfatos en el medio Ringer.

Del mismo modo que sucede en los ensayos en los que se emplea el medio de cultivo de Vincke, la concentración de sulfatos en solución de Ringer son mucho mayores en las muestras no tratadas que en las tratadas (Figura 7.11), poniendo de manifiesto el claro efecto del tratamiento antibacteriano.

Otros de los fenómenos que se repiten en este ensayo, es que la liberación de sulfatos al medio es mayor en la primera etapa (t_0-t_1), si bien en este ensayo, en el caso de las muestras no tratadas muestran una gran liberación de sulfatos en la fase t_2-t_3 y en la t_4-t_5 , lo que demuestra que el microorganismo presenta un metabolismo más prolongado en el tiempo, aunque este sea menor que el que se da en el medio de Vincke. Debe destacarse que los niveles de liberación de sulfatos al medio en el caso del medio de Ringer es mucho menor que en el caso de Vincke, debido a la mayor idoneidad de este último medio de cultivo para el desarrollo del *T.thiooxidans*.

Como ya se comentó anteriormente, a pesar que los ciclos se repiten en las mismas condiciones se pueden observar diferencias significativas entre ellos, debido a dos factores principalmente, la variabilidad en la actividad bacteriana y la posible desviación en la determinación de sulfatos

En la Figura 7.12, se puede observar que la diferencia entre la cantidad de sulfatos al inicio y al final de cada ciclo, es notablemente mayor en el caso de las probetas no tratadas que en las tratadas, llegando ésta a ser un 70% mayor, demostrando la alta eficiencia del tratamiento.

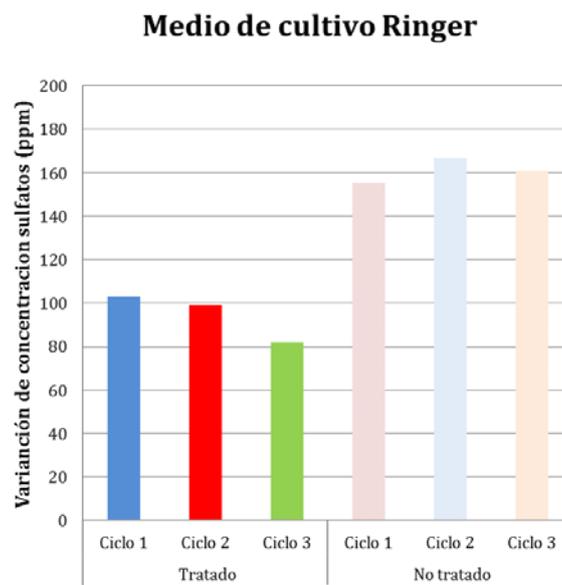


Figura 7.12.- Variación total de la concentración de sulfatos en el medio Ringer.

A diferencia de los ensayos realizados con el medio de Vincke, los resultados obtenidos empleando como medio de cultivo la solución de Ringer presentan una mayor homogeneidad, pudiendo ser debido a que al tener una menor actividad bacteriana las diferencias provocadas por este factor se minimizan.

Otra de las variables evaluadas para poder monitorizar el desarrollo del proceso de biodeterioro del hormigón provocado por el ácido sulfúrico biogénico, es el pH. El valor de este parámetro indica la evolución de las reacciones que intervienen en este proceso de

biodegradación. Las reacciones que intervienen en el pH de la solución son las mostradas en la Figura 7.8. La primera reacción (reacción 1) es la que tiene lugar en la porosidad del hormigón que alberga el ácido sulfhídrico adsorbido, el cual reacciona con la portlandita ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) formando sulfuro de calcio y provocando un descenso en el pH de la solución.

Otra de las reacciones (reacción 2) que tienen lugar es la disolución de la portlandita, formando Ca^{2+} e iones OH^- ; la liberación de los iones hidroxilo produce un aumento en el pH de la solución. El metabolismo del ácido sulfhídrico por parte del *T.thiooxidans*, transformándolo en ácido sulfúrico, es otra de las reacciones (reacción 3) que hacen disminuir el pH del cultivo.

En última instancia, el ácido sulfúrico reacciona con los óxidos del hormigón dando a lugar a compuestos como etringita, yeso, monosulfoaluminatos y residuos de sílice hidratados, que debido a su solubilidad pueden ser disueltos por el agua y provocar el deterioro de la matriz cementicia (reacción 4).

En la Figura 7.13 muestra la evolución de los valores de pH del medio de cultivo de Vincke, que contenía tanto las probetas tratadas como las no tratadas, en los tres ciclos de ensayos llevados a cabo. Se puede observar que los valores de pH del medio de cultivo de Vincke manifiestan una tendencia ascendente, pasando de un pH 4,5 - 5 a 7,5 - 8, debido en gran medida, a que la alcalinidad propia del hormigón ($\text{pH} \approx 12$) hace que el pH del medio aumente. Este aumento de pH será mayor en el caso de las probetas no tratadas debido que el ataque del ácido sulfúrico solubiliza el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ provocando un aumento del pH.

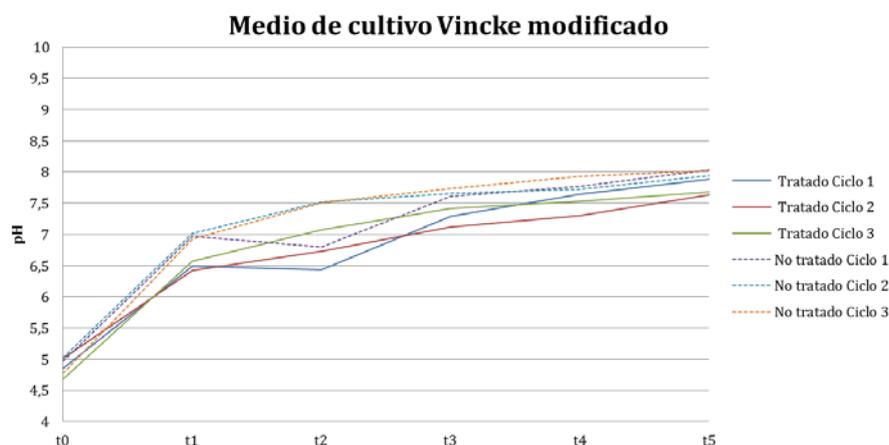


Figura 7.13.- Evolución de pH en medio de cultivo Vincke.

El comportamiento observado es totalmente contrario al descrito en otras investigaciones (*Okabe et al, 2007; Vincke et al, 2000*) donde el pH del medio de cultivo desciende desde 7 a 2, si bien estos ensayos se realizaron en diferentes condiciones, utilizándose 3 especies diferentes de *Thiobacillus*, mayor concentración de microorganismos, otro tipo de materiales y un medio de cultivo ligeramente diferente, pudiendo ser la causa de estas diferencias en los valores de pH.

En el caso de los ensayos llevados a cabo con la solución de Ringer, representado en la Figura 7.14, los resultados obtenidos no muestran grandes diferencias entre las pruebas realizadas con las probetas de hormigón tratadas y las no tratadas, esto puede responder a la menor actividad bacteriana en la solución Ringer, y por lo tanto, minimizando las diferencias de pH provocada por ésta .

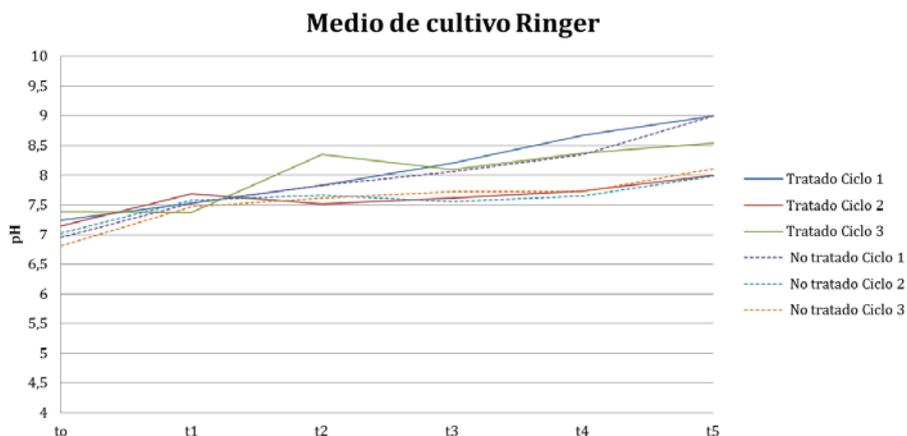


Figura 7.14.- Evolución de pH en medio Ringer.

Otro de los aspectos que se pone de manifiesto la Figura 7.14 es la mayor dispersión que presentan los resultados obtenidos, observándose diferencias notables entre las 3 repeticiones de los ciclos de ensayos, llegando a ser hasta de un punto de pH, esta variabilidad se da tanto en los probetas que tienen tratamiento como las que no.

7.3. CONCLUSIONES

Después de estudiar los resultados obtenidos de los ensayos de simulación de ataque por ácido sulfúrico biogénico se puede concluir que:

- Los ensayos por impregnación demuestran, de una forma cualitativa, que el empleo del formulado BXT/I inhibe el crecimiento del *Thiobacillus thiooxidans*.
- La metodología de ensayo por inmersión, descrita por Vincke (1999), permite evaluar de forma cuantitativa la efectividad de una solución frente al ataque por ácido sulfúrico biogénico. En este caso, la adición del formulado BXT/I reduce en más de un 30% la pérdida de masa de hormigón provocada por este proceso, mostrándose por lo tanto como una solución válida para esta problemática.
- Cabe destacar la idoneidad del medio del cultivo propuesto por Vinke, en comparación con la solución de Ringer, para simular este proceso de biodeterioro, ya que permite un rápido desarrollo del microorganismo responsable del mismo, el *Thiobacillus thiooxidans*.

8. CONCLUSIONES

8.1 INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se exponen las principales conclusiones extraídas de la investigación llevada a cabo en esta Tesis Doctoral, clasificándolas en conclusiones generales y conclusiones específicas. Las conclusiones generales (apartado 8.2) son las derivadas de los objetivos principales presentados en el Capítulo 1, y que han marcado la dirección del estudio, los cuales se pueden sintetizar en dos: el primero de ellos es el desarrollo de una metodología que permita evaluar la efectividad de diferentes agentes químicos y su durabilidad, y en segundo lugar, evaluación del efecto antimicrobiano de diferentes sustancias químicas frente a los microorganismos indicadores escogidos.

Por su parte, las conclusiones específicas (apartado 8.3), desarrolladas en mayor detalle, responden a los objetivos específicos referentes tanto a la metodología, como a la efectividad de los agentes antimicrobianos.

En el último apartado (8.4), con el fin de profundizar en el conocimiento sobre el biodeterioro del hormigón y sus posibles soluciones, se presentan propuestas para investigaciones y fases experimentales futuras que se realicen sobre esta misma línea de estudio, como consecuencia natural de progreso en esta línea

8.2 CONCLUSIONES GENERALES

La aportación de esta tesis doctoral al campo de la investigación sobre la interacción hormigón-microorganismo se centra en dos puntos principales: el desarrollo de una nueva metodología de ensayo para la evaluación de la interacción microorganismo-hormigón y la evaluación de las prestaciones de diferentes formulados con diferente actividad antimicrobiana.

Se ha propuesto una nueva metodología de evaluación global de la eficacia de principios activos antimicrobianos. Esta metodología abarca el estudio de la influencia del principio activo en las propiedades del hormigón, la posible lixiviación del principio activo, la eficacia del efecto antimicrobiano y su durabilidad, tanto a nivel de laboratorio como en ensayos de campo.

La principal ventaja de la metodología propuesta, frente a las metodologías descritas en la bibliografía científico-técnica, radica en dos puntos fundamentales. En primer lugar, esta metodología evalúa de manera directa la eficacia antimicrobiana de los principios activos, y no tanto la degradación posterior del hormigón. En segundo lugar, se estudia junto con la eficacia antimicrobiana el efecto del principio activo en las propiedades del hormigón, evaluando así los principios activos más adecuados, tanto desde el punto de vista antimicrobiano como desde el punto de vista del material.

Asimismo, en la presente tesis doctoral se han evaluado una serie de productos comerciales con propiedades antimicrobianas. Estos productos, inicialmente concebidos para otras aplicaciones, han sido valorados para su uso como agentes antimicrobianos en el hormigón, realizándose de este modo una selección de las características y formulaciones más adecuadas. Esto sirve como punto de partida en cuanto a los posibles productos que se puedan utilizar en el hormigón, además de plantear algunas indicaciones sobre como formular un producto para poder conseguir el efecto buscado.

8.3 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

En el apartado se presentan las conclusiones específicas de cada uno de los dos puntos principales tratados en esta investigación, metodología y la propuesta de soluciones contra el biodeterioro del hormigón.

8.3.1 Desarrollo metodológico

La metodología propuesta en esta tesis doctoral complementa las sistemáticas utilizadas en otras investigaciones, evaluando nuevos parámetros que hasta el momento no se habían valorado y que dan una información adicional sobre los procesos de biodegradación de hormigón. A continuación se describen las conclusiones extraídas sobre esta metodología:

- Es preciso evaluar la influencia del principio activo sobre las propiedades del hormigón, como consistencia, densidad y desarrollo de propiedades mecánicas, tanto a edades tempranas como a 28 días, para asegurar que la solución planteada no perjudique las prestaciones finales del material.
- Asimismo, se hace necesario evaluar la posible lixiviación del principio activo, tanto para asegurar la durabilidad del efecto antimicrobiano, como para evitar la contaminación del ambiente en el que se encuentre el hormigón tratado. Esto puede llevar a que formulados que en principio podrían presentar buenas prestaciones, como el Biopol D211® y el Vantocil IB®, deban ser descartados al ser lixiviables.
- Es preciso desarrollar ensayos que permitan caracterizar de manera directa y fiable el efecto antimicrobiano de los principios activos. La mayor parte de las metodologías consultadas estudian la resistencia a la degradación del hormigón (fundamentalmente un ataque ácido), más que la eficacia del principio activo como agente antimicrobiano. En esta tesis doctoral se han empleado ensayos que permiten evaluar de manera directa la inhibición del crecimiento biológico, por efecto de la utilización de los agentes antimicrobianos.
- La durabilidad del efecto antimicrobiano es otro factor a tener en cuenta en la metodología de evaluación, para asegurar la permanencia de este efecto en el tiempo. De este modo, es posible establecer una planificación y el mantenimiento de la estructura. Este parámetro no es evaluado en ninguna de las metodologías encontradas en la bibliografía, y en la presente tesis doctoral se define un ensayo de envejecimiento acelerado mediante el cual el hormigón es sometido a unas condiciones de luz y humedad extremas simulando un largo periodo de tiempo.
- Por último, es preciso contrastar los resultados obtenidos en laboratorio con ensayos de campo, que nos permitan validar el efecto antimicrobiano frente a condiciones reales de uso. De este modo, es posible evaluar la viabilidad industrial de la solución propuesta.

8.3.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana

- En la presente tesis doctoral se han evaluado 17 formulados diferentes, que contenían 10 principios activos. De este modo se ha discriminado el principio activo y la formulación más adecuada, para conseguir el objetivo final de obtener un tratamiento antimicrobiano eficaz que no perjudique las propiedades del hormigón.
- La evaluación de los diferentes formulados monocomponente muestra que la obtención de un efecto duradero en el tiempo y válido para un amplio espectro de microorganismos, pasa por desarrollar un producto que combine diferentes principios activos.

- De todos los agentes multicomponente evaluados, solamente el formulado PL-UV-H+M-2B presenta efectividad frente a todas las especies de microorganismos evaluadas, antes y después del proceso de envejecimiento acelerado.
- La comprobación de las prestaciones de este formulado en condiciones de uso (puerto de Barcelona) corrobora su efectividad, retrasando el crecimiento de algas sobre la superficie de hormigón hasta en 16 semanas.
- Se ha demostrado así mismo que empleando un producto únicamente alguicida, como el formulado PL-UV-H+M-3B, se pueden obtener excelentes resultados frente al crecimiento de las algas, tanto a nivel de campo como a nivel de laboratorio. De este modo, se puede abaratar el tratamiento del material.
- Los ensayos de simulación de acción del ácido sulfúrico biogénico, mediante el método descrito por Vincke (1999), demuestran que el empleo del formulado BXT/I reduce en más de un 30% la pérdida de masa de hormigón provocada por este proceso, mostrándose por lo tanto como una solución válida para esta problemática.

8.4 LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS

La investigación desarrollada en esta tesis doctoral supone un paso más en el estado del conocimiento de la interacción microorganismo-hormigón, si bien existen muchos aspectos en los que se podría ahondar, para poder conocer más profundamente los procesos que intervienen en el biodeterioro y, de este modo, poder desarrollar soluciones más adecuadas.

A continuación se indican algunas de las posibles líneas de investigación derivadas del presente trabajo:

- Es necesario desarrollar trabajos interdisciplinarios sobre la temática de la presente tesis doctoral, de tal modo que se pueda ahondar en diversos aspectos, como los condicionantes que favorecen la colonización del hormigón por parte de diferentes microorganismos, los efectos del metabolismo de estos en las propiedades del hormigón, así como los posibles efectos perjudiciales en el ambiente de la presencia de microorganismos en el hormigón.
- Es fundamental un desarrollo normativo a este respecto en España, dado que actualmente no existen instrucciones o normas que determinen los posibles efectos derivados de la presencia de microorganismos en el hormigón. Tomando como punto de partida algunas de las normativas existentes en otros países, y conociendo los posibles repercusiones que puede tener la presencia microbiana en

el hormigón, se hace necesario el desarrollo de una normativa a nivel estatal que regule las dosificaciones de hormigón en estas circunstancias.

- Es necesario estudiar las diferentes maneras de aplicar los principios activos al hormigón. Las soluciones planteadas en esta tesis doctoral se basan en tratamientos en masa, haciendo que estos tengan un coste económico muy elevado. Con el fin de aumentar la viabilidad económica de este tipo de soluciones, deben desarrollarse tratamientos superficiales efectivos, que empleen una menor cantidad de producto y por lo tanto, sean más económicos, pero que no pierdan efectividad. A raíz de los ensayos de campo llevados a cabo en esta tesis doctoral, en la actualidad se están probando tratamientos superficiales más económicos, con excelentes resultados, como se muestra en la Figura 8.1, por lo que debe ser una línea de investigación a desarrollar.



Figura 8.1.- Probetas de hormigón con y sin tratamiento superficial situadas en el puerto de Barcelona.

BIBLIOGRAFÍA

- ALLSOPP, D., SEAL, K., AND GAYLARDE, C. (2006) Introduction to biodeterioration, 2nd Ed., Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- ALLAN, M.L. (1999) Evaluation of coatings and mortars for protection of concrete cooling tower structures from microbiologically influenced corrosion in geothermal power plants. Brookhaven National Laboratory Report BN- 66980, New York.
- AMERICAN CONCRETE INSTITUTE - ACI (2006) 'Code requirements for environmental engineering concrete and commentary'. ACI 350-06. Farmington Hills. MI.
- BARBEROUSSE, H. ROUT, B., YEPREMIAN, C.AND BOULON, G. (2007) An assessment of façade coatings against colonisation by aerial algae and cyanobacteria. Building and Environment, 42, 2555-2461.
- BEELDENS, A., MONTENY, J., VINCKE, E., DE BELLIE, N., VAN GEMERT, D., TAERWE, L. & VERSTRAETE, W. (2001) Resistance to Biogenic Sulphuric Acid Corrosion of Polymer Modified Mortars, Cement Composites, 23, 47-56.
- BOLD, H. C., C. J. ALEXOPOULOS Y T. DELEVORYA. (1987) Morphology of plants and fungi. (5th ed.). Harper & Row, New York. 912pp.
- BRONGERS M., KOCH G. AND THOMPSON N. (2001) Corrosion Costs and Preventive Strategies in the United States. Federal Highway Administration, Washington, DC, Report FHWA-RD. 01-156.
- CENTER FOR BIOFILM ENGINEERING (2003) Montana State University.

- COMITE EURO-INTERNATIONAL DU BETON. (1989) Durable concrete structures bulletin d'information No. 182, Paris.
- COWAN, M.M, ABSHIRE, K.Z., HOUK, S.L., & EVANS, S.M. (2003) Antimicrobial efficacy of a silver-zeolite matrix coating on stainless steel. *J ind Microbiol Biotechnol* 30, 102-106.
- CWALINA, B., DZIERZERWICZ, Z. (2006) Biological corrosion of reinforced concrete constructions. XXI Polish Conference .79-108.
- CWALINA, B. (2008) Biodeterioration of concrete. The Silesian University of Technology, 4. 133-140.
- DARIENKO, T., GUSTAVS, L., MUDIMU, O., MENENDEZ, C.R., SCHUMANN, R., KARSTEN, U., FRIEDL, T. PROSCHOLD, T. (2010) Chloroidium, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to Chlorella (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, 45, 79-95.
- DAVIS, J., NICA, D., SHIELDS, K., ROBERTS, D.J. (1998) Analysis of concrete form corroded sewer pipe. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 42, 75-84.
- DE BELIE, N. (2010) Microorganisms versus stony materials : a love-hate relationship. *Materials and Structures*, 43, 1191-1202.
- DE BELIE, N., MONTENY, J., BEELDENS, A., VINCKE, E., VAN GEMERT, D. & VERSTRAETE, W. (2004). Experimental research and prediction of the effect of chemical and biogenic sulfuric acid on different types of commercially produced concrete sewer pipes. *Cement and Concrete Research*, 34, 2223-2236
- DE MUYNCK W, LEURIDAN, S., VAN LOO, D., VERBEJEN, K, CNUUDE, V., DE BELIE, N., VERTRAETE, W. (2011) Influence of pore structure on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 6808-6820.
- DE MUYNCK, W., COX, K., BELIE, N. (2008) Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement Concrete Research*, 38, 1005-1014.
- DE MUYNCK, W, DE BELIE, N, VERSTRAETE, W. (2010) Antimicrobial mortar surfaces for the improvement of hygienic conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 1 (8), 62-72.
- DE MUYNCK, W, MAURY RAMIREZ, A, DE BELIE, N. (2009) Evaluation of strategies to prevent algal fouling on white architectural and cellular concrete. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 679-689.
- ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY - EPA (1991) Hydrogen Sulphide Corrosion in Wastewater Collection and Treatment Systems Report to Congress. US EPA, Report EPA, 09-010, 36-42. Washington DC.
- ERIKSEN, K. (2003) Thaumasite attack on concrete at Marbjerg Waterworks. *Cement and Concrete Composite*. 25, 1147-1150.

- ESCADEILLAS, G., BERTRON, A., BLANC, P., DUBOSC, A. (2007) Accelerated testing of biological stain growth on external concrete walls. Part 1: development of the growth tests. *Materials and Structures* 40, 1061–1071.
- EUROPEAN STANDARD EN-PREN 16105 (2010) Paints and varnishes. Leaching of substances from coatings. Laboratory immersion method. 2010.
- EUROPEAN STANDARD UNE-EN 12390-2. Ensayos de hormigón endurecido: Fabricación y curado de probetas para ensayos de resistencia.
- EUROPEAN STANDARD UNE-EN 12390-3. Ensayos de hormigón endurecido: Determinación de la resistencia a compresión de probetas.
- EUROPEAN STANDARD UNE-EN 12390-4. Ensayos de hormigón endurecido: Resistencia a compresión característica de las máquinas de ensayo.
- EUROPEAN STANDARD UNE-EN-12350-2:11. Ensayos de hormigón fresco: Ensayo de asentamiento.
- FAGERLUND, G. (1997) *Durability of concrete constructions*. Warszawa. Poland
- FERNÁNDEZ CANOVAS, M. (2002) *Hormigón*. Colegio de Ingenieros de Caminos, canales y puertos. Colección escuelas. 6ª Edición. Madrid.
- FLANIGAN, B. (1997) Air sampling for fungi in indoor environments. *J. Aerosol*, 3, 381-392.
- FUSTER, N. (2006) *Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas*. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.
- GABRIO, T. DILL, I., FISCHER, G., GRÜN, L., RABE, R., SAMSON, R., SEIDL, H.P., SZEWZYK, R., TRAUTMANN, CH., WARSCHEID, TH., WEIDNER, U. (2003) Strategies and targets for establishing a multicenter trial: Identification of indoor relevant moulds. *Mycoses* 46, 1, 32-36.
- GAYLARDE, C., RIBAS SILVA, M., WARSCHEID, TH. (2003) Microbial impact on building materials: An overview, n36, pp.342-352.
- GAYLARDE, C., C. SAAD, D.S. (2001) Biodegradação de superficies pintada: técnicas modernas de estudo. *Workshop sobre Biodegradação*, 85-91.
- GUILLETTE, O. Y DREESEN, R. (1995) Laboratory chamber studies and petrographical analysis as bioreceptivity assessment tools of building materials, *Sci. Total Environ* 167, 365-374.
- HOTTA, M., NAKAJIMA, H., YAMAMOTO, K., AONO, M. (1998) Antibacterial temporary filling materials: the effect of adding various ratios of Ag-Zn-Zeolite. *Journal of Oral Rehabilitation*, 25, 485-489.
- HUDON, E., MIRZA,S., FRIGON,D. (2011) Biodeterioration of concrete sewer pipes: State of the Art and research needs. *Journal of Pipeline Systems Engineering and Practice*. 42-52.

- HUECK, H. J. (1968) The biodeterioration of materials - An appraisal. Biodeterioration of materials, Elsevier, London, 6.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 16869 (2008) Plastics- Assessment of the effectiveness of fungistatic compounds in plastics formulations.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO/FDIS 846-ISO 22196 (2011) Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces
- JANA D., LEWIS R. A. (2005) Acid attack in a concrete sewer pipe – a petrographic and chemical investigation. Proc. 27th Int. Conf. Cement Microscopy, ICMA, Victoria, Canada.
- JARAMILLO, D. (2001) Introducción a la ciencia del suelo. Escuela de Geociencias. Universidad de Colombia. 590.
- JEONGYUN, DO., HUNG, S., HYOUNGSEOK, S., YANGSEOB, S. (2004) Antifungal effects of cement mortars with two types of organic antifungal agents. Cement and Concrete Research, 35, 371-376.
- KAEMPFER, W., BERNDT, M. (1999) Estimation of service life of concrete pipes in sewer networks. Proceedings of the 8th Conference on Durability of Building Materials and Components, Vancouver, May 30–June 3. National Research Council of Canada, 1, 36–45.
- KALTWASSER H. (1976) Destruction of concrete by nitrification. European journal of Applied Microbiology, 3, 185-192.
- KARSTEN, U., FRIEDL, T., SCHUMANN, R., HOYER, K. & LEMBCKE, S. (2005) Mycosporine-like amino acids and phylogenies in green algae: Prasiola and its relatives from the Trebouxioophyceae (Chlorophyta). Journal of Phycology 41: 557-566.
- KAWAI, K., TERANISHI, S., MORINAGA, T., TAZAWA, E. (1994) Concrete Deterioration caused by Aerobic Bacteria. Concrete Library of JSCE, 24, 127-139.
- KOESTLER R.J., WARSCHEID, TH., NIETO, F. (1997) Biodeterioration: Risk Factors and their Management. Saving our cultural Heritage: The Conservation of Historic Stone Structures, 25-36. John Wiley and Sons, New York.
- KRAISTY, R. (2012) 8th. Microbiology, Plant Hygiene and preservation lignin. Borregaard Symposium.
- KUSUMANINGRUM , H.D., RIBOLDI, G., HAZELEGER, W.C., BEUMER, R. R. (2003) Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. International Journal of Food Microbiology, 85, 227-236.
- MAEDA, T. (2004) Inhibidor del crecimiento de Thiobacillus thiooxidans, ES 2 205 203 T3,01.05.2004.
- MATSAMURA, Y., YOSHIKATA, K., KUNISAKI, S-I. TSUCHIDO, T. (2003) Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with thar or silver nitrate. Applied Microbiology, 69, 431-440.

- MAY, E., LEWIS, F.J., PEREIRA, S., TAYLER, S., SEWAARD, M.R.D, ALLSOPP, D. (1993). Microbial Deterioration of fouling stone-a review. Biodeterioration abstracts, 7, 109-123.
- MCCRARY, S., THOMAS, I. D. (1994) High-alumina cement mortar for hydrogen sulphide corrosion control. No-Dig Engineering Journal, 1,4-9.
- MEHTA, P. K. Y MONTEIRO, P. J. M. (2001) Concrete: Microstructure, Properties and Materials. Englewood Cliffs. New Jersey.
- MILLER, T. (1994) Ecología y medio ambiente, 867. Grupo editorial Iberoamérica. Mexico DF. Mexico.
- MONTENY, J., ET AL. (2000) Chemical, microbiological, and in-situ test methods for biogenic sulfuric acid corrosion of concrete. Cement and Concrete Research, 30, 623-634.
- MORETRO, T., SONERUD, T., MANGERROD, E., LANGSRUD, A. (2006) Evaluation of the Antibacterial Effect of a Triclosan Floor Used in the Food Industry. Journal of Food Protection, 69, 627-633.
- MORI, T., NONAKA, T., TAZAKI K, KOGA M. HIKOSAKA Y & NODA S. (1992) Interactions of nutrients moisture and pH on microbial corrosion of concrete sewer pipes. Water Research, 26, 29-37.
- NAVAS, J. BORRALLERAS, P. (2005) Concrete with antibiotic and antifungal properties. Proceedings international symposium on concrete for a sustainable agriculture. 65-75.
- NEVILLE, A.M. (1977) The properties of concrete. 1st Ed. Pitman Publishing Ltd., Londres.
- NIKAWA, H., YAMAMOTO, T., HAMADA, T., RAHARDJO, M.B, MURATA, H, NAKANODA, S. (1997) Antifungal effect of zeolite-incorporate tissue conditioner against *Candida albicans* growth and acid production. Journal of oral Rehabilitation, 24, 350-357.
- OKABE, S., ODAGIRI, M., ITO, T., SATOH, H. (2006) Succession of sulfuroxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems. Appl. Environment Microbiological, 73, 971-980.
- PAAJANEN L., RITSCHKOFF A.C., VIITANEN H., (1994) Effect of insulation materials on the biodeterioration of buildings. VTT Publication 791, VTT, Espoo (Finland).
- PORTLAND CEMENT ASSOCIATION - PCA (2002) Types and causes of concrete deterioration. Portland Cement Association, IS536, 1-16.
- PUTERMAN M., BECKER, R. (2000) Development of patterned stains on building façades: investigation of the phenomenon and its prevention, 22-27. First International RILEM Workshop on Microbial Impact on Building Materials. Rilem publications.
- QUIRYNEN (1994). The clinical meaning of the surface roughness and surface free energy of intra oral hard substrata on the microbiology of the supra- and sub-gingival plaque: results of in vitro and in vivo studies. J. Dent. 22, 513-516.

- RAMIREZ, T.H., DE LEON, G.D. (2004) Concrete-Based Floors and Wall Coverings with an Antimicrobial Effect. Brussels, Belgium: European Patent Office.
- REIJ, M.W., DEN AANTREKER, E.D. (2004) Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 1-11.
- RILEM COMMISSION 25-PEM. Protection et Érosion des Monuments. Test No. II. 4. Water absorption under low pressure (pipe method). *Recommandations provisoires. Materiaux et Constructions* 13(75), 201-205. Paris, 1980.
- ROBERTS, D.J., NICA, D., ZUO, G., DAVIS, J.L. (2002) Quantifying microbially induced deterioration of concrete: Initial Studies. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 49, 227-234.
- RODRÍGUEZ, R. E. (2000) El Concreto Antibac. *Construcción y tecnología*.
- ROSE, A. H. (1981) "Microbial biodeterioration." *Economic microbiology*, Vol. 6, Academic, London.
- SAAD, D.S., KINSEY, G.C., KIM, S., GAYLARDE, C.C. (2001) Molecular methods for the analysis of fungal growth on painted surface. *Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium*. Buenos Aires. Argentina.
- SAAD, D.S., KINSEY, G.C., PATERSON, R., GAYLARDE, G.C. (2003) Ergosterol analysis for the quantification of fungal growth on paint films. *Proposal for standard methods. Surf. Coat. Intern*, 86, 131-134.
- SAAD, D.S., C. GAYLARDE. (2004) Biodeterioration of concrete – A brief review. *Second International RILEM Workshop on Microbial Impact on Building Materials*, 37-46.
- SÁNCHEZ, J.A, JIMÉNEZ, S., MARFIL, R., DIZ, J., JODRAL, M. (2006) Influencia de las operaciones de limpieza en la calidad microbiológica de las canales de porcino. *Dpto. de Bromatología y Tecnología de los Alimentos*. Universidad de Córdoba.
- SANCHEZ-SILVA, M., ROSOWSKY, D. V. (2008) Biodeterioration of construction materials: State of the art and future challenges. *Journal Material Civil Engineer*, 20, 352–365.
- SAND, W., BOCK, E., WHITE, D.C. (1987) Biotest system for rapid evaluation of concrete resistance to sulfur-oxidizing bacteria. *Mater Perform*, n26, pp.14-17.
- SAND, W., BOCK, E. (1991) *International biodeterioration*, Elsevier Science Publishers Ltd, London. U.K, 27, 175-183.
- SCHMIDT, M., HORMANN ,K., HOFFMAN, F.J., WAGNER, E., (1997) Concrete with greater resistance to acid and to biogenic sulfuric acid corrosion, 4, 2-8.
- SHAFAR, D. (2012) Sewer Pipe Corrosion. <http://walliseng.net/sewer-pipe-corrosion-how-much-pipe-wall-is-left/>
- STANIER, R.G., INGRAHAM, J.L., WHEELIS, M.L., PAINTER, P.R. (2005) *Microbiología*. Editorial Reverté. 2ª Edición. Barcelona. España.
- THIERFELDT, F. (2005) 3D Chloroplasten-Modell. <http://www.scientific-beginner.de>

- TIANO, P. (2002) Biodegradation of Cultural Heritage: Decay Mechanisms and Control Methods online. http://arcchip.cz/wz09/w09_tiano.pdf.
- TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. (2007) Microbiología. Editorial Panamericana, 9ª Ed. Buenos Aires. Argentina.
- TRAVERSA, L., ROSATO, V.G. (1998) Observaciones sobre la colonización de líquenes en estructuras de hormigón". Ciencia y Tecnología del Hormigón, 6, 9-18.
- VINCKE, E., VERSTICHEL, S., MONTENY, J., VERSTRAETE, W. (2000) A new test procedure for biogenic Sulfuric acid corrosion of concrete. Biodegradation, n10, pp. 421-428.
- VERRAN, J., TAYLOR, R.L., LESS, G. C. (1986) Adherence of Candida Albicans and oral streptococci to denture materials'. J. Dent Res. 66, 873.
- VERRAN, J., TAYLOR, R.L., LESS, G.C. (1994) The use of image analysis to quantify microorganisms adherent on surface. Binary 6, 55-57.
- VERRAN, J., TAYLOR, R. (1995) The effect of surface roughness and conditioning on adhesion. 'Proceedings of Second Meeting of the British Biofilm Club, Powys, British Biofilm Club, 7-13. Cardiff. Gales.
- VISHNIAC, W., SANTER, M. (1957) The Thiobacilli. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 21, 195-213.
- WARSCHEID, T., OELTING, M., AND KRUMBEIN, W.E. (1991) Physical-chemical Aspects of Biodeterioration Processes on Rocks with Special Regard to Organic Pollution. International Biodeterioration, 28, 37-48.
- WARSCHEID, T. (1996) Impacts of microbial biofilms in the deterioration of inorganic building materials and their relevance for the conservation practice. Internationale Zeitschrift für Bauinstandsetzen 2, 493-504.
- WAYNE FREED, W. (2000) Reinforced Concrete Containing Antimicrobial Enhanced Fibers. United States: Synthetic Industries, Inc.
- WAŻNY J. (1980) The influence of wood-destroying fungi on concrete. Oxley T.A., Becker G., Allsopp D. (Eds) Biodeterioration. Pitman Publ. Ltd., 59-62.
- WELTON, R.G. RIBAS SILVA, M. GAYLARDE, C, HERRERA, L.K. ANLEO, X., DE BELIE, N, MODRY, S. (2005) Techniques applied to the study of microbial impact on building material, Materials and Structures, 38, 883-893.
- WORLD HEALTH ORGANISATION - WHO (1995) Surveillance Program. Sixth Report of WHO Surveillance Program for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe.
- 3D SCIENCE
(2012) http://www.3dscience.com/3D_Models/Biology/Cells/Mitochondria.php
- INSPECTAPEDIA (2009) Cleaning & Prevention of Algae, Fungus, Lichens, Moss on Stone Tombstones, Graves, Roofs, Walls, Sidewalks & Other Building Surfaces direct. www.inspectapedia.com

ANEJO 1. INFORMACIÓN GENERAL DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

A1.1. INTRODUCCIÓN

En el presente anejo se presenta la información detallada sobre microorganismos patógenos, necesaria para una mejor comprensión de la temática del estudio, ya que algunos de los conceptos relacionados con la microbiología y empleados en la presente tesis doctoral no suelen ser comunes en el ámbito de la ingeniería, pudiendo ser necesaria algún tipo de aclaración.

El Anejo 1 consta de cuatro apartados, el primero (A1.2) da una visión general sobre las células eucariotas y procariotas. El segundo apartado (A1.3) presenta información específica de los 3 grupos de microorganismos que se han evaluado a lo largo de la tesis, bacterias, hongos y algas. Y por último, en el tercer apartado (A1.4) se da información detallada sobre los factores influyentes en el desarrollo de los microorganismos.

A1.2. ORGANIZACIÓN CELULAR

Para poder entender los mecanismos de acción necesarios para el control o la eliminación de microorganismos se deben conocer las estructuras que los forman y el metabolismo de los mismos. Una vez conocida esta información se podrán seleccionar los principios activos más eficientes en función del microorganismo a controlar. Las

estructuras que componen las células de un microorganismo dependen en gran medida de si son células eucariotas o procariotas.

A1.2.1. Células eucariotas

La célula eucariota es una célula más compleja y de mayor tamaño que la célula procariota. Entre los organismos pertenecientes a este grupo se encuentran las algas, protozoos, hongos, plantas y animales. La célula eucariota está dividida en compartimentos limitados por membranas internas, que poseen orgánulos que realizan funciones específicas. Otra de las principales diferencias entre ambos tipos de células es que en las células eucariotas el material genético está rodeado de una membrana y organizado en cromosomas. Las principales estructuras que la componen son las siguientes:

- **Pared celular:** estructura con gran importancia debido a que la función principal de ésta es la evitar explosión de la célula por diferencias de presión osmótica que se producen en el proceso de alimentación. El conocimiento y el funcionamiento de la pared celular es un aspecto fundamental a la hora de poder evaluar o desarrollar un agente antimicrobiano, puesto que muchos de ellos basan su acción en la destrucción o alteración de la pared. Dentro de las paredes celulares eucariotas se pueden distinguir dos tipos: pared algar y pared fúngica.
 - *Pared algar:* el espesor de la pared celular en las algas va desde los 10 a 20 μm y se compone por fibras de celulosa, en algunos casos se encuentran otros polisacáridos como xilasas o manasas. En menor cantidad también se puede encontrar lípidos y proteínas.
 - *Pared fúngica:* la pared celular de los hongos es más gruesa y el espesor va desde 15 -25 μm . Esta estructura está compuesta por quitina y quitosana, además de enzimas hidrolíticas.
- **Membrana Citoplasmática:** esta estructura es una bicapa lipídica de 7 a 8 μm de espesor, compuesta por proteínas, fosfolípidos y esteroides, constituyendo la estructura que separa la célula de su entorno. Las funciones de la membrana citoplasmática son diversas, pudiendo actuar en la regulación del equilibrio osmótico, como regulador de la excreción de los metabolitos, o como depósito de nutrientes y enzimas. En la Figura A1.1 se puede observar un esquema de la membrana citoplasmática.

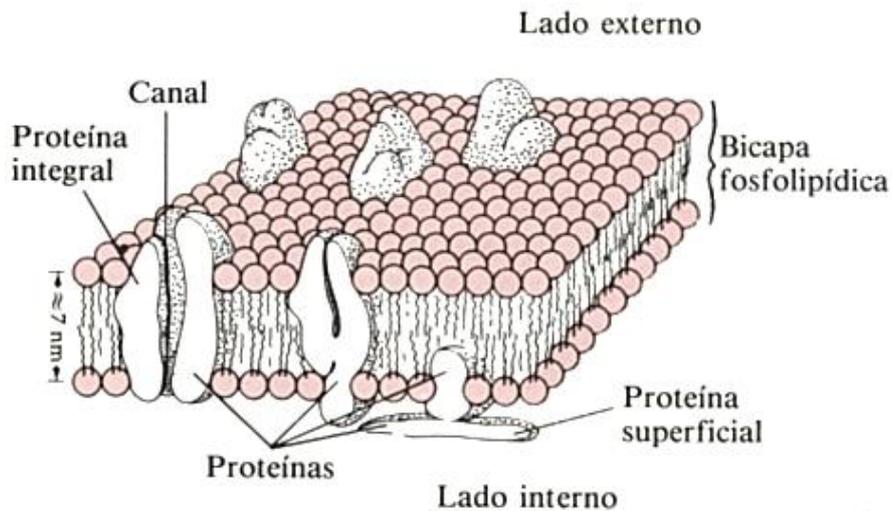


Figura A1.1.- Estructura membrana citoplasmática (Tortora et al., 2007)

- **Cilios y flagelos:** estructuras celulares alargadas que se encuentran en la parte exterior de la célula. La función de los cilios es la capturar alimentos y la de los flagelos es permitir moverse a los microorganismos en un medio líquido. La dimensión de estas estructuras varía en función del microorganismo, siendo entre 150 a 300 μm en algas y protozoos y entre 10 a 30 μm en bacterias.
- **Citoplasma** (ver Figura A1.2): se entiende por citoplasma al medio fluido que recubre la membrana citoplasmática, y alberga al resto de orgánulos celulares. Se puede distinguir entre ectoplastama y endoplasma. El ectoplasma es la parte más externa y está relacionada con el movimiento de la célula. El endoplasma es la fase líquida donde se encuentran los orgánulos celulares, como el núcleo, el retículo endoplasmático, los ribosomas, el aparato de Golgi, las mitocondrias, los cloroplastos y los gránulos.

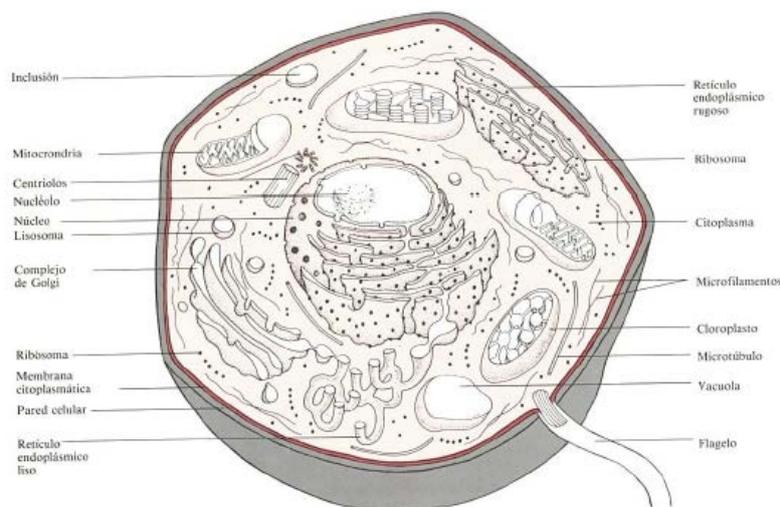


Figura A1.2.- Citoplasma y orgánulos constituyentes (Tortora et al., 2007)

- **Núcleo:** uno de los orgánulos que se encuentran en el citoplasma es el núcleo, representado en la Figura A1.2. Éste posee el ADN de la célula y representa entre el 1-2% del peso seco de la célula. En las células eucariotas el ADN está rodeado por una membrana nuclear, y en las procariotas el ADN se encontraría formando corpúsculos.
- **Retículo endoplasmático** (ver Figura A1.2): esta estructura es una red de canales que circulan a través del citoplasma y son una continuación tanto de la membrana plasmática como de la membrana celular. La función del retículo endoplasmático es la de proporcionar una superficie para reacciones químicas, una ruta de transporte de moléculas dentro de la célula y una zona de almacenamiento para las moléculas sintetizadas.
- **Ribosomas** (ver Figura A1.2): estas estructuras son los portadores del ARN y suponen entre el 60 y el 90% del peso de la célula. A diferencia del ADN se encuentra distribuido por todo el citoplasma. Hay tres tipos de ribosomas dependiendo de la función que desempeñan en la síntesis de proteínas.
 - *ARN ribosómico* (ARN-r), que es el responsable de recibir la información procedente del ADN.
 - *ARN mensajero* (ARN-m,) cuya función es la de transportar el código desde el ADN.
 - *ARN trasmisor* (ARN -t) tiene la función de traducir la información exacta proveniente del ADN.
- **Aparato de Golgi:** esta estructura tiene como función almacenar y secretar algunas proteínas, lípidos y azúcares. Otra de sus funciones es la síntesis de azúcares que se combinan con las proteínas para formar glucoproteínas.
- **Mitocondrias** (ver Figura A1.3): estas estructuras son los orgánulos responsables de la generación de ATP, siendo ésta la fuente de energía química de la célula. El tamaño de éstas va desde 0,5 a 10 μm . Las estructuras que la conforman son la membrana mitocondrial externa, el espacio intermembranoso, la membrana mitocondrial interna, las crestas y la matriz mitocondrial.

La membrana externa tiene funciones enzimáticas y de transporte. En el espacio intermembranoso se halla una alta concentración de protones y enzimas que intervienen en la obtención de energía mediante el ATP. La membrana interna igual que la externa tiene la función de transportar sustancias desde el exterior al interior de la mitocondria. La matriz mitocondrial es el lugar donde se da el ciclo de Krebs entre otras rutas metabólicas, esenciales para la vida.



Figura A1.3.- Imagen de una mitocondria (tomada de www.3dscience.com)

- **Cloroplastos** (ver Figura A1.4): estas estructuras son los orgánulos donde se realiza la fotosíntesis y, por lo tanto, sólo se encuentran en microorganismos fotosintéticos. Suelen encontrarse cerca de la pared celular porque necesitan la luz solar para completar la función fotosintética. Los cloroplastos son estructuras donde fijan su acción algunos desinfectantes, sobretodo alguicidas, inhibiendo el proceso de fotosíntesis, impidiendo de este modo la obtención de energía a la célula.

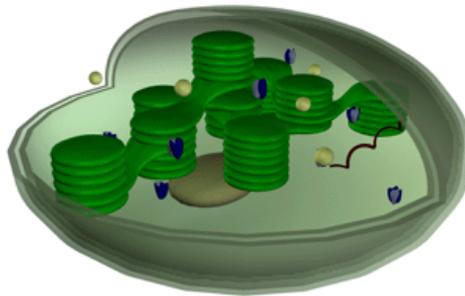


Figura A1.4.- Imagen de un cloroplasto (Thierfelt, F., 2005)

- **Gránulos:** son estructuras de menor importancia para este estudio debido a que ningún desinfectante centra su actividad sobre ella. Los gránulos son estructuras que se desarrollan en condiciones favorables y como consecuencia de una gran presencia de nutrientes, siendo los responsables de almacenar nutrientes (azúcares, lípidos, glucógeno, etc.)

A1.2.2. Células procariotas

Las células procariotas son células mucho más simples que las eucariotas y que no están divididas en compartimientos ni poseen núcleo verdadero. Dentro de las células procariotas se encuentran un gran grupo de organismos unicelulares tales como las bacterias y las arqueobacterias. Sus principales estructuras son:

- **Pared celular:** es una estructura gruesa y rígida cuya función es dar forma a la célula procariota, evitar la lisis osmótica y proteger a la célula de la acción de agentes externos nocivos. Desde el punto de vista de la desinfección la pared celular es importante por ser el lugar de acción de algunos antibióticos.

La pared bacteriana está formada por una red macromolecular llamada péptido-glucano-mucopolisacárido, formado por unidades de disacáridos unidos a cadenas de aminoácidos. Esta estructura es tan diversa en las bacterias que sirve como método para su clasificación entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. La pared de las bacterias Gram positiva es más gruesa y está compuesta por una capa de glucopéptidos. La pared de las bacterias Gram negativa está compuesta por una capa de glucopéptidos, rodeada de una bicapa fosfolípídica, lipoproteínas y glucolípídica. Son más resistentes a los antibióticos (Tortora et al., 2007) que las bacterias Gram positiva.

El método por el cual se clasifican se basa en la capacidad de retener un complejo de p-rosanilida y yodo (coloreado) en la pared celular de la bacteria. Si la bacteria es Gram positiva, los glucopéptidos presentes en la pared celular retendrán el complejo y las Gram negativa no lo retendrán, al ser los glucopéptidos mucho más escasos. En la Figura A1.5a se representa la estructura de la pared celular de una bacteria Gram positiva y en la Figura A1.5b la pared celular de una bacteria Gram negativa.

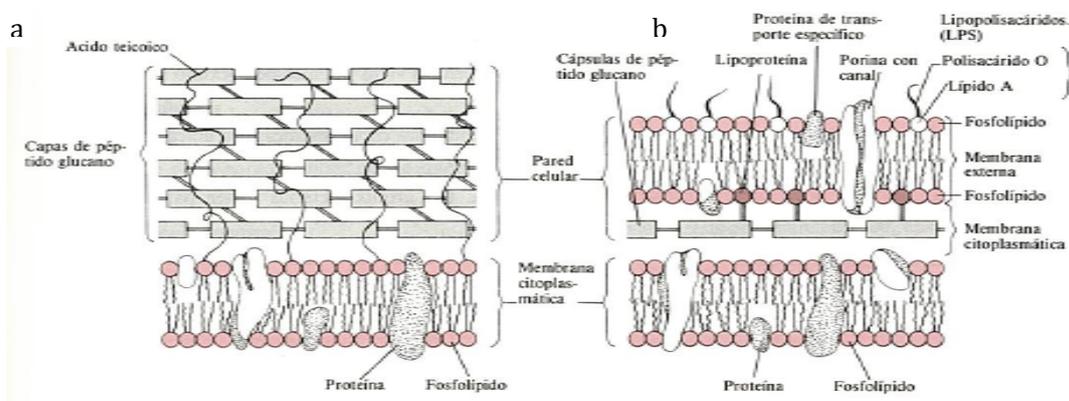


Figura A1.5.- Esquema de pared celular: a) bacteria Gram positiva y b) bacteria Gram negativa

- **Membrana citoplasmática:** estructura delgada que se extiende por dentro de la pared celular rodeando el citoplasma de la célula. La membrana citoplasmática de las células procariotas está formada principalmente por fosfolípidos y proteínas. La función más importante de la membrana citoplasmática es actuar como barrera selectiva por donde entran y salen sustancias de la célula. El paso de moléculas a través de la membrana depende de su tamaño y de su tipo, siendo más permeable a moléculas pequeñas y a moléculas solubles en lípidos. Otra de las funciones que posee la membrana citoplasmática es la de degradar nutrientes para obtener energía.

- **Citoplasma:** el citoplasma en una célula procariota hace referencia a todo lo que hay en el interior de la membrana citoplasmática. El citoplasma es básicamente agua (80%), proteínas, azúcares, lípidos e iones inorgánicos. Las principales estructuras que se encuentran en el citoplasma son: DNA, ribosomas e inclusiones.
- **Nucleoide:** contiene la información genética de una célula procariota (ADN cromosómico), formando un solo cromosoma dispuesto en doble hélice. A diferencia de las células eucariotas, el núcleo en las procariotas no posee una membrana que lo separe completamente del citoplasma.
- **Ribosomas:** estructuras cuya principal función es la de sintetizar proteínas. Los ribosomas están formados por proteínas y RNA ribosómico. En las células procariotas los ribosomas tienen menos proteínas y las moléculas de RNA son más pequeñas. Algunos antibióticos y biocidas tienen como punto de acción los ribosomas de las células y actúan inhibiendo la síntesis de proteínas.
- **Flagelos:** largos apéndices filamentosos que impulsan a la bacteria.
- **Fimbrias:** apéndices con forma de vellosidades parecidos a los flagelos, si bien poseen un menor tamaño. La disposición de estas estructuras varía en función del tipo de célula, pudiéndose presentar en el extremo de ésta o presentarse por toda la superficie de la misma. Las principales funciones de las fimbrias son, en primer lugar, permitir la adherencia a diferentes superficies, incluyendo otras bacterias, y en segundo lugar, transferir material genético entre bacterias.

A1.3. PRINCIPALES GRUPOS DE MICROORGANISMOS

Una vez definidas las diferencias existentes entre los dos tipos de células, procariotas y eucariotas, se hace necesario dar una información más detallada de los microorganismos que has servido durante la fase experimental como indicadores de la acción de los agentes antimicrobianos evaluados.

En primer lugar se detallarán las bacterias, dando una información específica de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Thiobacillus thiooxidans*. El segundo grupo, es el correspondiente a los hongos, de los cuales se da una información más concreta del *Aspergillus niger*. Por último, el tercer grupo corresponde a las algas, centrandó nuestra atención en *Scenedesmus vacuolatus* y *Stichococcus bacillaris*.

A1.3.1. Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares y procariotas (ver punto A1.2) y su tamaño puede ir desde 0,5 μm hasta las 5 μm . Desde el punto de su metabolismo, las bacterias son el grupo de microorganismos más complejo y como consecuencia son los

organismos más abundantes del planeta. Se hallan en todos los hábitat de la Tierra, incluso en las condiciones más adversas de temperatura, acidez, presencia de agua, radioactividad, etc. A pesar de ser una disciplina en la que hay una gran tradición de investigación se estima que un gran número de bacterias todavía no han sido descritas.

Si bien algunas bacterias son patógenas para el ser humano o su actividad, es un porcentaje muy bajo de todo el reino, sin las bacterias no sería posible la vida en la Tierra, ya que son imprescindibles para muchos ciclos bioquímicos.

En cuanto a la presencia de bacterias en el cuerpo humano, se puede afirmar que hay más bacterias en él que células propiamente humanas, concentrándose en gran medida en las estructuras exteriores, como la piel y el pelo, y en los intestinos. Las consecuencias que puede provocar la presencia de bacterias en el organismo pueden ser inocuas, beneficiosas o perjudiciales. La mayor parte de ellas no provocan reacción en cuerpo humano pero hay otra que pueden producir enfermedades infecciosas como por ejemplo: tétanos, tuberculosis, cólera, neumonía, lepra, etc.

Las bacterias se utilizan en algunas industrias, como por ejemplo la industria láctea, cervecera, farmacéutica, ya que algunos procesos fundamentales para estas industrias necesitan la presencia de determinadas bacterias para que tengan lugar.

Debido a la gran diversidad que existe de bacterias, se pueden establecen distintos criterios para su clasificación, uno de los más comunes es la morfología. Según su morfología las bacterias pueden pertenecer a los siguientes grupos:

- **Cocos:** bacterias redondeadas, que pueden presentarse aisladas (micrococos), en parejas (diplococos), en cadena (estreptococos) o en racimo (estafilococos).
- **Bacilos:** bacterias alargadas, rectas o curvas, con o sin flagelos.
- **Espirilos,** bacterias curvadas o retorcidas helicoidalmente. Las ligeramente curvadas se denominan Vibrio y las que lo están completamente se conocen como espiroquetas.
- Bacterias relativamente grandes y formadas por filamentos tabicados, que reciben el nombre genérico de *Leptothrix*.

Uno de los aspectos que definen a un grupo de organismo es su proceso de reproducción y crecimiento y en el caso de las bacterias su reproducción se produce por fisión binaria (*Tortora et al., 2007*). Mediante este mecanismo se obtienen dos células hijas, con idéntica información en el ADN, respecto a la célula madre, y de contenido citoplasmático celular similar, de este modo de obtendrían colonias de bacterias idénticas. Solamente los procesos de mutación darán lugar a la variabilidad genética.

Uno de los conceptos básicos dentro de la reproducción bacteriana es el tiempo de generación, definiéndose como el tiempo necesario para que una célula se divida y por tanto duplique su población. Este tiempo varía en función de cada microorganismo.

Las fases del crecimiento bacteriano (también válido para otros microorganismos) se pueden representar gráficamente a través de una curva de crecimiento bacteriano. Esta curva es característica de una cada bacteria en función del tiempo y en unas condiciones ambientales determinadas. En la Figura A1.6 se representa una curva de crecimiento bacteriano, donde se muestran las cuatro fases que tienen lugar.

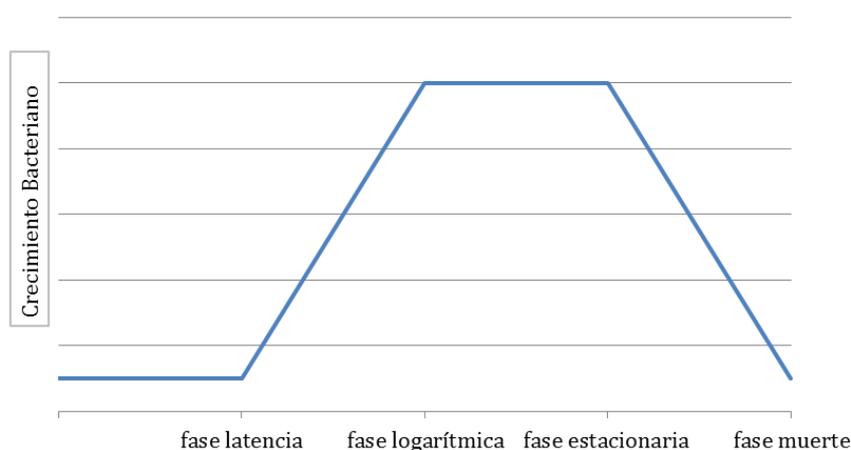


Figura A1.6.- Curva crecimiento bacteriano (Elaboración propia)

La primera fase es la denominada *fase de latencia*, durante la cual no se produce ningún cambio en la población bacteriana puesto que éstas no se reproducen inmediatamente al llegar a un medio nuevo. En este periodo las células se encuentran activas sintetizando los enzimas necesarios para la reproducción.

La *fase logarítmica* es la fase en la que las bacterias son más activas metabólicamente, se dividen y crecen de forma exponencial. Es en esta fase cuando se da el tiempo de generación mínimo de una bacteria. Durante esta fase es cuando las bacterias son más activas metabólicamente.

La siguiente fase es la *fase estacionaria*, en ella el crecimiento se detiene y el número de células nuevas se iguala al número de células muertas y la población se estabiliza. Este punto se produce porque se acumulan metabolitos tóxicos para las propias células, se agota algunos de los nutrientes o cambia alguna de las condiciones de pH o temperatura. En el momento en el que el número de muertes supera al número de células que se forman, la población bacteriana entra en la *fase de muerte*.

En esta tesis doctoral se han evaluado las prestaciones de diferentes agentes microbianos frente al crecimiento de algunas bacterias que eran patógenas para el ser humano o su actividad o por poder degradar el hormigón. De los seis microorganismos evaluados 3 de ellos son bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y

Thiobacillus thiooxidans. En la Tabla A1.1, la Tabla A1.2 y la Tabla A1.3 se muestran las características principales de cada una de las bacterias estudiadas y los efectos que produce su presencia en el ser humano o en el hormigón.

NOMBRE	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	
Clasificación científica	Reino: Bacteria Filo: Proteobacteria Clase: Gammaproteobacteria Orden: Enterobacteriales Familia: Enterobacteriaceae Género: <i>Escherichia</i> Especie: <i>E. coli</i>	 
Tipo de pared celular	Gram negativa	
Metabolismo	<p>La <i>Escherichia coli</i> es un bacilo anaerobio facultativo que vive en el intestino de los mamíferos formando parte de su microbiota. La función de esta bacteria en el cuerpo humano es la de sintetizar vitaminas B y K además de ayudar a la absorción de nutrientes y poder fermentar la glucosa y la lactosa. La temperatura óptima en la que se desarrolla esta bacteria es 37° C, aunque puede sobrevivir entre los 10° C y los 55° C, por su parte, el pH óptimo para su crecimiento es 6-7.</p>	
Efectos perjudiciales	<p>Si bien la mayoría de las cepas de esta bacteria son saprofitas algunas pueden provocar enfermedades. Las cepas patógenas tienen la capacidad de adherirse al tracto intestinal produciendo toxinas que provocando la diarrea. Este proceso tóxico es muy frecuente en países en vías de desarrollo donde no existe una infraestructura adecuada para mantener la profilaxis necesaria.</p>	

Tabla A1.1.- Información general sobre *Escherichia coli* (Stanier et al, 2005; Tortora et al., 2007)

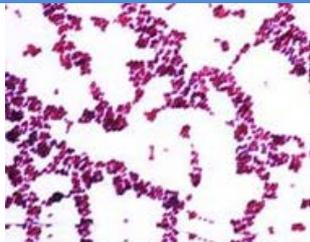
NOMBRE		STAPHYLOCOCCUS AUREUS	
Clasificación científica	Reino: Bacteria Filo: Firmicutes Clase: Bacilli Orden: Bacillales Familia: Staphylococcaceae Género: <i>Staphylococcus</i> Especie: <i>Staphylococcus aureus</i>	 	
Tipo de pared celular	Gram positiva		
Características	<p>El <i>Staphylococcus aureus</i> es el estafilococo más importantes y es un microorganismo aerobio o anaerobio facultativo. Es una bacteria con forma esférica con una pared celular que le permite sobrevivir en condiciones de presión osmótica elevada. Esto le permite vivir en alimento como carnes curadas o con poca agua disponible.</p> <p>El rango de temperatura en el que pueden desarrollarse va desde 7° C a 42° C. En cuanto a las condiciones de pH el <i>S.aureus</i> puede sobrevivir en ambientes con valores que van desde 4 hasta 9, si bien el óptimo es 7.</p>		
Efectos perjudiciales	<p>Esta bacteria puede producir gran cantidad de toxinas lo que hace que sea un microorganismo con una gran capacidad de invadir.</p> <p>Esta bacteria causa infecciones en las heridas que se tratan en los hospitales, además de poseer una elevada resistencia a la penicilina.</p> <p>Una intoxicación por <i>Staphylococcus aureus</i> puede provocar vómitos, fiebre y en algunos casos la muerte.</p>		

Tabla A1.2.- Información general sobre *Staphylococcus aureus* (Stanier et al, 2005; Tortora et al, 2007)

NOMBRE		<i>THIOBACILLUS THIOOXIDANS</i>	
Clasificación científica	Reino: Eubacteria Filo: Proteobacteria Clase: Gammaproteobacteria Orden: Acidithiobacillales Familia: Acidithiobacillaceae Género: <i>Acidithiobacillus</i> * *en la memoria de la tesis este microorganismo se le denomina <i>Thiobacillus thiooxidans</i> .		
Tipo de pared celular	Gram negativa		
Características	Esta bacteria es un bacilo aerobio estricto y se encuentra en depósitos o tuberías en las que haya presencia de azufre. Es un microorganismo quimioautótrofo y es capaz de metabolizar el H ₂ S (ácido sulfhídrico) en H ₂ SO ₄ (ácido sulfúrico). Puede desarrollarse en unas condiciones de temperatura que van desde los 5° C hasta los 40° C y en a un pH en el rango de 0.5 a 5.5, siendo el óptimo 2 (Hudon et al, 2011).		
Efectos perjudiciales	La presencia de <i>Thiobacillus thiooxidans</i> produce grandes daños en las tuberías de hormigón de aguas residuales. Esta bacteria se encuentra en la parte no sumergida de la tubería (condiciones anaeróbicas) y metaboliza el H ₂ S proveniente de las aguas en H ₂ SO ₄ , provocando, en primer lugar, un descenso del pH del hormigón, y en segundo lugar, el deterioro del hormigón al formarse un compuesto soluble como es el Ca ₂ SO ₄ , perdiendo de esta manera parte de la sección de hormigón en la tubería. Este proceso se explica más ampliamente en el punto 2.3 del Capítulo 2		

Tabla A1.3.- Información general sobre *Thiobacillus thiooxidans*

A1.3.2. Hongos

Los hongos son microorganismos eucarióticos, y dentro del reino Fungi se incluyen hongos carnosos, levaduras y mohos. Todos los hongos son organismos aerobios o anaerobios facultativos y heterótrofos y por lo tanto necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. De mismo modo que las bacterias, los hongos descomponen la materia orgánica y reciclan nutrientes mediante enzimas extracelulares. El reino de los hongos cuenta con más 100.000 especies de las cuales solamente 0.1% son patógenas para el hombre, aunque sí lo son para muchas plantas, y por lo tanto, en muchos casos son perjudiciales para la actividad agrícola.

Las estructuras vegetativas de los hongos filamentosos se denominan hifas, que son filamentos alargados. Estas hifas si las condiciones son favorables pueden crecer hasta formar una masa conocida como micelio. La parte del micelio responsable de la nutrición

se denomina micelio vegetativo y la responsable de la formación de estructuras de reproducción.

Por su parte las levaduras son hongos no filamentosos con forma esférica u ovalada, que se reproducen mediante gemación. Las levaduras son anaerobios facultativos, es decir, en presencia de oxígeno realizan respiración aeróbica, en cambio, en ausencia de éste realizan la fermentación, proceso por el cual se emplean levaduras en las industria cervecera, vinícola y panadera.

El proceso reproductivo de los hongos se realiza mediante la formación de esporas. Estas esporas les permiten sobrevivir en condiciones adversas y estar en estado latente hasta que las condiciones sean favorables para su desarrollo. Las esporas fúngicas pueden ser asexuales o sexuales, las asexuales son producidas en el micelio aéreo y cuando se desarrollan dan lugar a organismos idénticos al de origen. Por su parte, las esporas sexuales provienen de la unión de dos cepas de diferentes hongos de la misma especie, obteniéndose de esta manera organismos diferentes a los parentales.

La presencia de hongos puede provocar cuantiosas pérdidas económicas en la industria agroalimentaria y en el sector agrícola. En la agricultura es habitual que los cultivos sean atacados por diferentes hongos que reducen la rentabilidad de las cosechas o en algunos casos, las frutas, una vez cosechadas son atacadas por hongos filamentosos. Es por esta razón que el control de la población de hongos en determinados cultivos es una práctica imprescindible y se realiza mediante el empleo de fungicidas.

Los hongos también pueden provocar enfermedades a los seres humanos, denominadas micosis. En función de los efectos que tengas sobre el cuerpo humano y los tejidos afectados, las enfermedades fúngicas se pueden clasificar en 5 grupos:

- **Micosis sistémica:** infecciones que afectan a órganos y/o tejidos internos, este tipo de micosis suele transmitirse por inhalación, siendo los pulmones los primeros órganos afectados.
- **Micosis subcutánea:** este tipo de infección afecta a la piel y es transmitida por contacto directo de un elemento fúngico con una herida.
- **Micosis cutáneas:** esta enfermedad fúngica afecta a la queratina de la piel y al cabello, degradándolo mediante una enzima denominada queratinasa. La transmisión se da entre personas o entre animales y personas, pudiendo tener un origen telúrico.
- **Micosis superficiales:** enfermedades que tienen especial presencia en los trópicos y afectan al cabello y la epidermis.

- **Micosis oportunistas:** son enfermedades que se dan cuando el huésped está inmunodeprimido, pero en condiciones de salud normal no tienen ningún efecto patógeno.

Del mismo modo que en el caso de las bacterias, en esta investigación se han valorado las prestaciones de diferentes agentes microbianos frente al crecimiento de un hongo específico. El hongo escogido como indicador fue el *Aspergillus niger*, en la Tabla A1.4 se muestran las características principales del hongos en cuestión y los efectos que produce su presencia en el ser humano o en el hormigón.

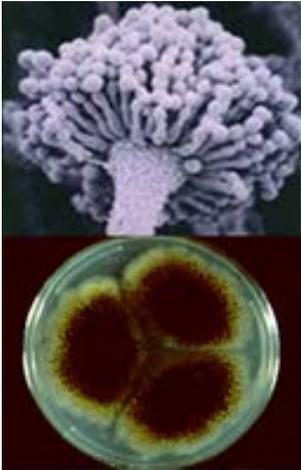
NOMBRE		<i>ASPERGILLUS NIGER</i>	
Clasificación científica	Dominio: Eukariota Reino: Fungi Filo: Ascomycota Subfilo: Pezizomycotina Clase: Eurotiomycetes Orden: Eurotiales Familia: Trichocomaceae Género: <i>Aspergillus</i> Especie: <i>Aspergillus niger</i>		
Características	El <i>Aspergillus niger</i> es un hongo filamentoso que se caracteriza por formar colonias de color negro, que a su vez están formadas por hifas especializadas, denominadas conidióforos, que es su extremo originan las esporas asexuales denominadas conidios. El rango de temperatura para su crecimiento va desde 0-5° C hasta 35-40° C para <i>A. niger</i> , siendo el óptimo 25-30° C y el pH de crecimiento óptimo es de 4.5-5.5 pero soporta pH que van desde 3.5 a 6.8.		
Efectos perjudiciales	Este hongo se caracteriza por ser un fitopatógeno, ya que su alimentación se basa en carbohidratos y suele encontrarse en lugares húmedos. La inhalación de un gran concentración de esporas puede producir aspergilosis, provocando alteraciones pulmonares. Esta enfermedad se da con más frecuencia en horticultores, ya que están más expuestos a las esporas del <i>A.niger</i> .		

Tabla A1.4.- Información general sobre *Aspergillus niger*

A1.3.3. Algas

Las algas son organismos fotoautótrofos y la gran mayoría se encuentran en el agua, sin bien, algunas pueden encontrarse en el suelo, paredes, árboles, etc., si hay la suficiente humedad. Al necesitar la luz del sol para realizar la fotosíntesis siempre se encuentran en la zona acuática a la que llega la luz solar.

Se pueden distinguir varios grupos principales de algas, dinoflagelados, euglenoides, diatomeas y las algas marrones, algas rojas y verdes. A continuación se describen algunas de las características principales de cada uno de los tipos.

- **Dinoflageladas:** son algas unicelulares que flotan en el mar y forman parte del plancton. El tamaño de la población de estas algas depende fundamentalmente de la temperatura, salinidad y profundidad del agua.
- **Euglenoides:** algas unicelulares que poseen un flagelo que utilizan para desplazarse. Carecen de una pared celular celulósica, pero poseen un periplasto o película semirígida. La mayoría de euglenoides son formas no pigmentadas y tienen nutrición saprofítica o fotoauxotrófica. Las especies pigmentadas tienen numerosos cloroplastos que contienen las clorofilas a y b como las Chlorophyta y Charophyta. Pueden vivir en diversos hábitats y suelen ser en estanques, charcas de agua dulce ricas en materia orgánica. La reproducción asexual de estas algas se realiza mediante por simple división longitudinal previa mitosis.
- **Diatomeas:** las algas diatomeas son organismos unicelulares microscópicos que se encuentran por todo el mundo formando parte del plancton. Estas algas a diferencia de las euglenoides carecen de flagelos. Utilizan la luz solar como fuente de energía a través de la fotosíntesis. La reproducción puede ser sexual o asexual, obteniendo organismos idénticos o diferentes a los progenitores, respectivamente.
- **Algas marrones:** este tipo de alga pluricelular es fundamentalmente marina y puntualmente se pueden encontrar en hábitats de agua dulce. Su tamaño puede variar desde pocos milímetros hasta los 50 metros y suelen situarse en zonas de marea.
- **Algas rojas:** organismos pluricelulares que viven en aguas profundas y gracias a sus pigmentos rojos pueden absorber la luz solar que penetra, ocupando de este modo hábitats donde no viven otras algas.
- **Algas verdes:** es el tipo de alga más diverso y más próximo a las plantas, ya que en las paredes de las células contienen. La mayoría son organismos unicelulares (90%) y fotosintéticos y poseen clorofila a y b.

Las algas indicadoras que se han utilizado en esta Tesis Doctoral son *Stichococcus bacillaris* y *Scenedesmus vacuolatus*, sirviendo de ejemplo para evaluar la eficacia de los agentes antimicrobianos. En la Tabla A1.5 y la Tabla A1.6 se muestran las características principales de estas algas.

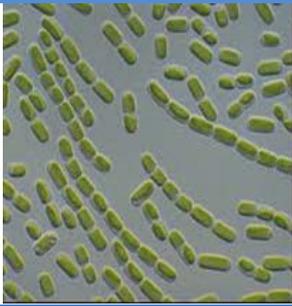
NOMBRE		<i>STICHOCOCCUS BACILLARIS</i>	
Clasificación científica	Dominio: Eukaryota Reino: Viridiplantae Filo: Chlorophyta Clase: Trebouxiophyceae Orden: Microthamniales Género: <i>Stichococcus</i> Especie: <i>Stichococcus bacillaris</i>		
Tipo de alga	Alga verde		
Características	<p>Alga unicelular con escasos filamentos, siendo estos rectos o con forma sigmoidal. <i>La Stichococcus bacillaris</i> tienen forma ovalada y sus paredes celulares son finas. Poseen un núcleo central único y se reproducen mediante fragmentación de los filamentos y la multiplicación de sus células vegetativas. Estas algas son fácilmente cultivables y pueden ser utilizadas para diferentes estudios fisiológicos, como por ejemplo en el transporte de glucosa y la composición de los aminoácidos de las proteínas (Darienko et al, 2010; Karstes et al. 2005).</p>		

Tabla A1.5.- Información general sobre *Stichococcus bacillaris*

NOMBRE		<i>SCENEDESMUS VACUOLATUS</i>	
Clasificación científica	Dominio: Eukaryota Reino: Plantae Filo: Chlorophyta Clase: Chlorophyceae Orden: Chlorococcales Familia: Scenedesmaceae Género: <i>Scenedesmus</i> Especie: <i>Scenedesmus vacuolatus</i>		
Tipo de alga	Alga verde		
Características	<p>Alga verde con forma de elipse y dispuestas en una sola serie. El número de células suelen ser múltiplos de dos, siendo habituales 4, 8, 16 o 32. La presencia de <i>Scenedesmus vacuolatus</i> es muy habitual y forma parte del plancton de agua dulce. El ciclo reproductivo de esta alga se realiza por división celular. Esta especie de alga es usada en la depuración de aguas residuales, ya que aporta el oxígeno necesario en la descomposición de la materia orgánica por parte de las bacterias. (Bold et al, 1987).</p>		

Tabla A1.6.- Información general sobre *Scenedesmus vacuolatus*

A1.4. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO MICROBIOLÓGICO

El proceso de desarrollo de los microorganismos necesita al menos una célula viable y condiciones en el medio favorables. Los condicionantes que influirán en el

desarrollo los clasificaremos en dos categorías, **factores intrínsecos** y **factores extrínsecos**. Dentro de los factores intrínsecos se consideran la disponibilidad de nutrientes, el pH, el potencial de óxido-reducción (Red-Ox) y la actividad del agua (a_w). Como factores extrínsecos consideraremos la humedad relativa y la temperatura.

El primer **factor intrínseco** a considerar son los nutrientes, que son necesarios para la multiplicación de un microorganismo. Dentro de esta categoría se encuentran:

- Agua.
- Fuente de energía.
- Elementos para la biosíntesis como el carbono, oxígeno, fósforo, azufre.
- Otros factores de crecimiento

El *agua* supone el 80-90 % del peso del microorganismo y todas las reacciones bioquímicas ocurren en un ambiente acuoso, por lo tanto, la presencia de agua se hace del todo imprescindible para la existencia de microorganismos. La actividad de agua (a_w) de un medio o solución se define como el cociente entre la presión parcial del agua existente en la atmósfera en equilibrio con el sustrato (P) y la presión parcial de la atmósfera en equilibrio con el agua pura a la misma temperatura. La mayoría de los microorganismos incluyendo las bacterias patógenas crecen más rápidamente a niveles de actividad de agua (a_w) 0,993-0,998. A valores inferiores de actividad de agua (a_w), la velocidad de crecimiento o la masa celular final disminuye y la fase de latencia aumenta. El valor limitante de la actividad de agua para el crecimiento de cualquier microorganismo es de aproximadamente 0.6. En la Tabla A1.7 se muestran los rangos de actividad en los que se da el crecimiento de los microorganismos estudiados en la presente tesis doctoral.

FAMILIA	ORGANISMO	a_w
Bacterias	<i>Escherichia coli</i>	0,935 a 0,960
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,9
	<i>Halobacterium halococcus</i>	0,75
Hongos	<i>Xeromyces bisporus</i>	0,60 (el de menor actividad)
Levaduras	<i>Sacharomyces rouxii</i>	0,60 (el de menor actividad)

Tabla A1.7.- Rango de actividad de agua (a_w) para el crecimiento de algunos microorganismos

Los microorganismos se pueden clasificar de acuerdo a su actividad acuosa o presión osmótica:

- Halotolerantes: Capaces de crecer en presencia de elevadas concentraciones de sal.
- Osmotolerantes: Capaces de crecer en presencia de elevadas concentraciones de compuestos orgánicos no ionizados como son los azúcares.
- Xelotolerantes: Capaces de crecer en medios con muy poca agua disponible.

El segundo factor intrínseco a considerar es la fuente de energía. Según sea el origen de donde el microorganismo obtiene la energía podemos clasificar a los microorganismos como:

- Fotótrofos: extraen energía directamente del sol. Comprende a algas, bacterias fotosintetizantes y protozoos.
- Quimiotrofos: obtienen la energía por oxidación de compuestos químicos.

Dentro del subapartado Elementos para la biosíntesis se incluyen los principales elementos para el desarrollo de reacciones biosintéticas como el carbono, hidrógeno, nitrógeno, fósforo y azufre, además de algunos elementos minoritarios.

La fuente de carbono (C) puede tener diferentes orígenes, carbohidratos, ácidos, aminoácidos, lípidos e hidrocarburos. Los carbohidratos son los más comunes y son fácilmente digeribles. Entre ellos están los monosacáridos: hexosas, pentosas, heptosas. Los ácidos son una fuente no demasiado común de carbono, debido a la dificultad que supone el transporte a través de la membrana celular. Los aminoácidos (aa) junto con los hidratos de carbono son los más utilizados para obtener carbono además de ser fundamentales para la construcción y reparación celular.

Los lípidos son compuestos no solubles en agua, por lo que nos son tan comunes como los carbohidratos. Pero son una parte imprescindible a la hora de construir la pared celular. Para que los hidrocarburos se utilicen como fuente de carbono se requieren condiciones aeróbicas y es una minoría de microorganismos los que pueden digerirlos.

Para el oxígeno ver el apartado sobre la reacción de óxido-reducción. El nitrógeno(N) es un elemento vital para la síntesis de proteínas y de algunas vitaminas. El nitrógeno se puede encontrar en muchos estados de oxidación, desde NO_3^- a NH_4^+ . Dentro del Ciclo de Nitrógeno, hay microorganismos que tienen la función de fijar el N, es decir, convierten el nitrógeno en N_2 atmosférico, dejándolo disponible para otros organismos, estos microorganismos reciben el nombre de fijadores de nitrógeno, entre ellos se encuentran algunas algas. Otros microorganismos utilizan como fuente de nitrógeno, nitratos, sales de amonio.

El fósforo (P) se considera un elemento fundamental para la formación de ATP, ADN y ARN, además de estar presente en la pared celular en forma de fosfolípidos. Las formas más comunes en las que se presenta el fósforo es KH_2PO_4 . El fósforo también actúa como regulador del pH. Normalmente la forma en la que se presenta el azufre es $-\text{SH}$, es decir de forma reducida. Si el microorganismo carece de la capacidad de reducción de sulfatos, entonces se necesitan fuentes reducidas tales como el H_2S .

El último factor influyente para el crecimiento microbiano son los englobados bajo el nombre otros factores de crecimiento. Éstos se consideran a los componentes importantes, aunque no mayoritarios, para el desarrollo de los microorganismos, entre los

cuales se encuentran vitaminas, aminoácidos, purinas, pirimidinas, ácidos grasos y componentes inorgánicos.

El segundo factor intrínseco influyente es el **pH** en el que se encuentra el microorganismo. Cada microorganismo tiene un rango de pH óptimo para su crecimiento. Las bacterias crecen con mayor rapidez a pH comprendido entre 6 y 8. Para las levaduras el pH óptimo está ente 4.5 y 6. Los hongos filamentosos entre 3.5 y 4, mientras que las algas se desarrollan óptimamente con valores de pH entre 6,5 a 7,5.

La **reacción de óxido-reducción (Red-Ox)**, se produce como consecuencia de una transferencia de electrones entre átomos o entre moléculas. Los microorganismos presentan diferentes grados de tolerancia al potencial de oxidación. En relación con los microorganismos, el potencial redox indica las relaciones de oxígeno entre los mismos y es utilizado para especificar el ambiente en que un microorganismo es capaz de generar energía y sintetizar nuevas células. Los microorganismos aerobios necesitan para crecer valores redox positivos, mientras que los anaerobios frecuentemente requieren valores negativos. Los microorganismos de acuerdo a su potencial de oxidación reducción se divide en los siguientes grupos.

- **Aerobio estricto:** los microorganismos aerobios estrictos usan el oxígeno como aceptor final de electrones en la respiración, por lo tanto necesitan presencia de oxígeno.
- **Anaerobio estricto:** los microorganismos anaerobios obligados sólo tienden a crecer a potencial redox bajos o negativos, no pueden utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones.
- **Anaerobio facultativo:** los anaerobios facultativos, pueden utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones, pero en su ausencia también pueden utilizar como aceptor final de electrones una molécula inorgánica, como SO_4^- , NO_3^- , CO_2^- ,
- **Microaerófilos:** estos microorganismos necesitan una cantidad muy reducida de oxígeno para su crecimiento.

Los dos **factores extrínsecos** influyentes en el crecimiento microbiológico son la humedad relativa y la temperatura. La humedad relativa y la actividad acuosa están relacionadas entre sí, de modo que la humedad relativa es esencialmente una medida de la actividad de agua en la fase gaseosa (comentado dentro del apartado factores intrínsecos que intervienen en el crecimiento microbiano).

El factor *temperatura* es uno de los parámetros que intervienen de forma más importante tanto en la velocidad de crecimiento de una población de microorganismos, como en el tipo de microorganismos que se desarrollan. Los microorganismos crecen dentro de una amplia escala de temperaturas. A presión atmosférica, puede haber

crecimiento microbiano dentro de un intervalo de temperatura comprendido desde aproximadamente los -8°C hasta los 100°C .

La exigencia más importante es que el agua se encuentre en estado líquido y por lo tanto disponible para mantener el crecimiento. Ningún organismo ha sido capaz de crecer a todas las temperaturas de este intervalo; las bacterias normalmente se limitan a crecer a una escala de temperaturas en torno a los 35°C mientras que los mohos lo hacen a temperaturas algo inferiores a los 30°C . En la Figura A1.7 se presenta la clasificación de microorganismos en función de la temperatura a las que se desarrollan.

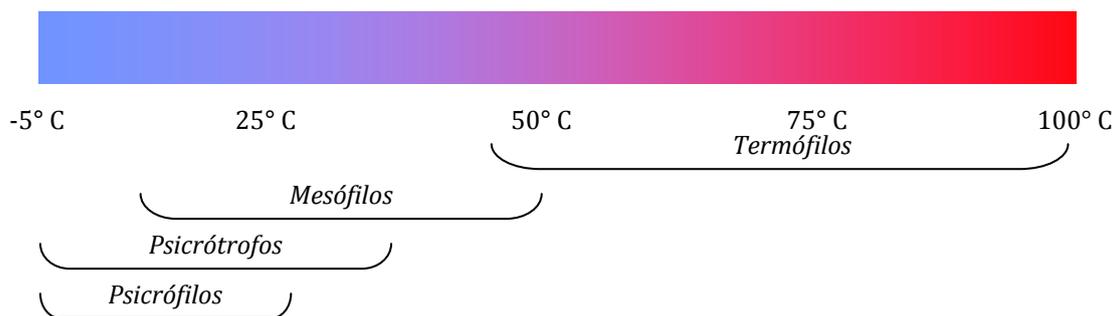


Figura A1.7.- Rango de temperaturas de crecimiento de microorganismos (Elaboración propia).

ANEJO 2. PROCESOS DE DESINFECCIÓN: MEDIOS FÍSICOS Y QUÍMICOS

A2.1 INTRODUCCIÓN

En este Anejo se presenta la información específica sobre la desinfección. Mediante esta información se comprenderá más detalladamente el proceso de desinfección y el modo de acción de los diferentes principios activos utilizados con este fin. El anejo 2 consta de tres apartados, el primero (A2.2) se explica de forma detallada la desinfección química. En el último apartado (A2.3) se expone en detalle la desinfección por medios físicos.

A2.2 LA DESINFECCIÓN POR MEDIOS QUÍMICOS

El mecanismo de acción de los agentes químicos de desinfección se basa en atacar alguna estructura vital del microorganismo, sin atacar a las estructuras del hospedador. Las principales estructuras atacadas son las siguientes:

- *Membrana externa*: Es la estructura que defiende a la bacteria del medio y por lo tanto es vital para la supervivencia de ésta. La membrana está compuesta de fosfolípidos y polisacáridos que al reaccionar con los desinfectantes pueden provocar diferentes reacciones en función de la composición de éstos, como por ejemplo, la penetración de moléculas no polares en el interior y la disolución de la fase lípida de la bacteria, o la perturbación de la organización de la membrana estableciendo puentes con determinadas estructuras, etc.

- *Membrana citoplasmática:* Muchos de los desinfectantes utilizados producen fisuras a nivel de compuestos de bajo peso molecular, siendo una causa de desnaturalización proteica y celular.
- *Metabolismo energético:* Algunos agentes actúan en la producción de ATP y por lo tanto colapsan el metabolismo de la bacteria.
- *Citoplasma y núcleo:* Hay desinfectantes que interfieren a nivel de enzimas o proteínas, impidiendo de esta manera el desarrollo de la bacteria.
- *Esporos bacterianos:* Estas estructuras son especialmente resistentes a muchos desinfectantes por uno de sus componentes (ácido dipicolínico) pero se han desarrollado algunos agentes activos a este compuesto como el peróxido de hidrógeno y el cloro.
- *Virus:* El agente a emplear dependerá de si el virus tiene o no envoltura lipídica. Los desinfectantes derivados del amonio cuaternario son activos contra los virus envueltos, mientras que los derivados del cloro, yodo, ácidos y álcalis fuertes son activos frente a la mayoría de virus.

Una vez definidas las estructuras de los microorganismos que son atacadas por los desinfectantes y sus mecanismos de acción, se detallan las principales familias de agentes químicos empleados como desinfectantes.

- *Derivados de amonio cuaternario (DAQ).* Desde que se desarrollaron en el año 1935, se ha comprobado que son más eficaces como inhibidores de crecimiento (bacteriostáticos) que como biocidas. En consecuencia, son más adecuados para ser utilizados contra bacterias Gram positivas que contra Gram negativas, por lo que ocasionalmente se combinan con otros desinfectantes para incrementar su eficacia respecto a éstas. Son más bactericidas que fungicidas y son efectivos frente virus lipofílicos pero no contra lipofóbicos. A pesar de estas limitaciones son aptos para multitud de aplicaciones y son respetuosos con el medio ambiente.

La eficacia de los DAQ se reduce en presencia de materia orgánica por lo que se hace necesaria una limpieza previa. En presencia de agua sucia, los DAQ precipitan por lo que es necesario utilizar quelantes para su estabilización. Asimismo hay que señalar que son más activos en medios alcalinos que ácidos. Se emplean en altas concentraciones (pero pueden provocar corrosión) y su eficacia aumenta cuando aumenta la temperatura.

El mecanismo de acción de los DAQ se basa en su unión con los fosfolípidos y proteínas de las membranas y deteriorar la permeabilidad de la misma.

- *Fenoles*. Son una de las materias utilizadas como desinfectantes más antiguas. El fenol casi nunca es empleado puro porque es tóxico y corrosivo, pero sus derivados son muy eficaces frente a bacterias, virus y hongos. No tienen capacidad de penetración por lo que no son efectivos como desinfectantes de superficie, y se suelen usar en combinación con jabones.

El mecanismo de acción de los fenoles se fundamenta en la acción sobre la membrana celular e inactivación de las enzimas del citoplasma, provocando la desnaturalización de las proteínas bacterianas y la lisis de la membrana celular.

- *Compuestos liberadores de halogenuros*. Las soluciones de hipoclorito de sodio son los compuestos de halogenuros metálicos más utilizados. Son muy efectivos con todo tipo de microorganismos pero pierden su actividad en presencia de materia orgánica. Son tan empleados por su coste relativamente bajo como por su baja toxicidad en las concentraciones a las que se usa. Se debe tener en cuenta que nunca se deben emplear mezclados con ácidos porque provocan la emanación de gas cloro, que es altamente tóxico.

Las soluciones más comunes son las de hipoclorito potásico, hipoclorito sódico, tricloroisocianuro, dicloroisocianuro sódico, halozone, y cloramida - T, entre otros.

Otro halogenuro utilizado, aunque mucho menos que el cloro, es el bromo, ya que no se han conseguido demasiados compuestos liberadores de bromo. La acción desinfectante de los liberadores de halogenuros se debe a la electronegatividad del halógeno que oxida las reacciones peptídicas de las proteínas y las desnaturaliza.

- *Fenoles halogenados*. Estos desinfectantes corresponden a una molécula de fenol en la que uno o más grupos hidroxilos son sustituidos por un halógeno, normalmente cloro o bromo. Son menos corrosivos y menos solubles que los fenoles puros pero son más eficaces frente a bacterias gram negativas y positivas, aunque pierden más su efectividad en presencia de materia orgánica. Los fenoles halogenados poseen un olor intenso y pueden ser muy colorantes, por lo que no son aptos para ser utilizados en presencia de alimentos.

Cuanto mayor sea el grado de sustitución de halógenos, la solubilidad de la molécula descende así como su actividad bactericida, pero en cambio aumenta su actividad fungicida.

- *Aldehídos*. El desinfectante más conocido y utilizado de esta familia es el formaldehído. Los aldehídos se pueden utilizar en presencia de materia orgánica y aumenta su actividad en ambientes de humedad alta.

Hay que tener precaución a la hora de trabajar con este tipo de agentes porque pueden provocar irritaciones de las vías respiratorias. La velocidad de acción es

lenta, por lo en la actualidad se han desarrollado formulados en combinación con DAQ para aumentar la velocidad de actuación y ampliar el espectro de actuación.

El mecanismo de acción de los aldehídos se basa en la desnaturalización de las proteínas y en la alquilación de los ácidos nucleicos.

- *Biguanidas y biguanidas poliméricas.* Son desinfectantes con un amplio espectro de acción en bacterias pero limitado en hongos y virus. La forma de actuar de estos agentes se centra en la modificación de la permeabilidad de la membrana citoplasmática. Debido al tamaño de las moléculas de estos compuestos pueden ser absorbidas tanto por bacterias Gram positivos como Gram negativos.
- *Compuestos anfóteros.* Son sustancias que se caracterizan por tener cargas tanto negativas como positivas por lo que pueden formularse indistintamente con sustancias aniónicas como catiónicas. Los anfóteros poseen buena detergencia y se lavan mejor que la mayoría de los DAQ. Se han utilizado en la industria farmacéutica y lechera. Estos compuestos no actúan bien en presencia de grandes cantidades de materia orgánica y tienen escasa actividad virucida.

Estas sustancias se han utilizado en combinación con formaldehído, obteniéndose productos con gran capacidad detergente y un amplio espectro de actividad.

- *Compuestos yodados.* El yodo es una sustancia con una gran capacidad desinfectante, pero no es una sustancia muy soluble y resulta demasiado tóxico y corrosivo como para ser utilizado como un microbicida. Los productos derivados del yodo actúan de manera similar a altas y bajas temperaturas, pero no pueden ser utilizados en condiciones alcalinas.

La forma de actuar de estos desinfectantes se centra en la disminución de los requerimientos de oxígeno de los microorganismos aerobios, lo que perjudica la cadena respiratoria. Además también interactúa preferentemente con las proteínas de la membrana del citoplasma.

- *Alcoholes.* Aunque se han utilizado como desinfectantes este tipo de sustancias no son especialmente activas. Gracias a su gran capacidad solvente se utilizan en combinación con fenoles, fenoles halogenados, DAQ y clorhexina. Una de las ventajas de estos agentes es que debido a su rápida evaporación no dejan residuos lo que los hace especialmente aptos para la industria alimentaria.
- *Ácidos y álcalis.* Los ácidos inorgánicos (por ejemplo ac. nítrico, clorhídrico, fosfórico, sulfúrico) poseen una gran capacidad desinfectante debido a su bajo pH, pero tiene ciertas limitaciones al ser altamente corrosivo y a su lenta velocidad de acción. Los ácidos orgánicos (por ejemplo ácido fórmico, cítrico, láctico, málico) se utilizan en combinación con otras sustancias para aumentar el efecto virucida y fungicida de éstos.

En cuanto a los álcalis, los más utilizados son el hidróxido de sodio y potasio, tienen una alta capacidad limpiadora, especialmente microbiocida además de buenas propiedades desengrasantes. Ampliamente empleado en la industria alimentaria. Su actividad aumenta cuando la temperatura también lo hace. Después de su empleo debe neutralizarse la zona limpiada.

El modo de acción de ácidos y álcalis se basa en la acción sobre los H^+ que destruyen los puentes de los aminoácidos en los ácidos nucleicos, modificando el pH de citoplasma y precipitando las proteínas. Por otro lado los OH^- saponifican los lípidos de la envoltura externa provocando la destrucción de las estructuras de la superficie.

- *Agentes oxidantes.* El mecanismo de acción de los agentes oxidantes se basa en la desnaturalización de las proteínas y lípidos de los microorganismos lo que hace que la membrana exterior se desnaturalice.

El producto de esta familia más empleado es el peróxido de hidrogeno que posee buenas capacidades antibacterianas, pero no es un buen fungicida. Al no ser una sustancia estable se tiene que ajustar su pH a 5, pero estabilizado es el más utilizado en la industria láctea.

A2.3 LA DESINFECCIÓN POR MEDIOS FÍSICOS

La limpieza mecánica es imprescindible para eliminar la suciedad, y con ella, el 99% de la población microbiana. La limpieza mecánica se puede llevar a cabo de diferentes maneras pero normalmente se utiliza agua con algún agente mojante, como jabón o en algún caso desincrustante. A pesar de este proceso normalmente queda una población microbiana remanente que hay que eliminar para poder garantizar la higiene de la instalación. Este proceso debe ser el paso previo al resto de desinfección mediante medios físicos.

A2.3.1 Desinfección por temperatura

El crecimiento y reproducción de los seres vivos en general son la consecuencia de un conjunto de reacciones bioquímicas que desarrollan más rápido cuanto más es la temperatura. Pero hasta un límite, ya que a temperaturas por encima de $50^{\circ}C$ empieza la desactivación de enzimas, ARN y deterioro de la membrana citoplasmática. Por lo tanto, se puede afirmar que hay un intervalo de temperatura en el cual el desarrollo de una población de un microorganismo es máximo y fuera de éste el crecimiento de la misma se reduce.

Si se utiliza la temperatura como método para controlar o minimizar la población de un determinado organismo, se debe tener en cuenta que los resultados obtenidos serán

función de las temperaturas alcanzadas en el proceso. A bajas temperaturas se puede conseguir la desactivación enzimática y del ARN, además del deterioro de la membrana citoplasmática, pero si pretende alcanzar una degeneración de la barrera osmótica se requieren temperaturas superiores, del orden de 110°C.

En función de la temperatura utilizada en el proceso de desinfección se pueden distinguir dos tipos:

- *Desinfección por disminución de temperatura.* Las temperaturas por debajo de la mínima de crecimiento disminuyen la actividad metabólica hasta pararla, pero en muy pocos casos son suficientes para matar los microorganismos en un corto plazo. La muerte por congelación se da con mayor facilidad en medios con material en solución. Durante la congelación se forma hielo de agua pura, de modo que la fase líquida se vuelve más concentrada. Para alcanzar el equilibrio osmótico, la fase líquida extrae agua de las células, haciendo que estas mueran por deshidratación, pues no logran conservar más del 10% de su humedad original.
- *Desinfección por aumento de temperatura.* La resistencia de los microorganismos a las altas temperaturas es menos frecuente que a las bajas porque las moléculas proteicas, como las enzimas, se desnaturalizan con más facilidad que por temperaturas bajas. De hecho el proceso de desnaturalización por bajas temperaturas no se da, lo que se produce es una ralentización de la velocidad de reacción. En cambio con altas temperaturas la desnaturalización es rápida y casi siempre irreversible.

Dentro de los tratamientos por calor, cabe distinguir dos tipos, los tratamientos: seco y húmedo. Los procesos que utilizan el *calor seco* son la incineración y la inyección de aire caliente. Los de *calor húmedo* son la ebullición, tindalización y autoclave. Cabe remarcar la mayor efectividad de los tratamientos con este sistema que con calor seco, debido a que la saturación de agua provoca que la acción de calor sea mucho más fuerte.

A2.3.2 Desinfección por fumigación

Este proceso es una desinfección combinada entre un medio físico (pulverizar en el ambiente un producto) y un medio químico (efecto bioestático, biocida, etc. del agente químico). El proceso de pulverización se utiliza tanto para desinfectar superficies como volúmenes de aire. Consiste en pulverizar un producto químico mediante un equipo de presión que permite crear una población de gotas con un tamaño lo suficientemente pequeño para que pueda permanecer en suspensión en el ambiente mientras realiza la función de desinfección y permita llegar el producto a todos los rincones de la edificación.

A2.3.3 Desinfección por radiación

La radiación se refiere a aquella forma de energía que se transmiten a través del aire, y consiste en partículas o en ondas electromagnéticas. Las radiaciones utilizadas en los procesos de esterilización o desinfección son las de una longitud de onda baja y con una energía suficiente para excitar o modificar moléculas orgánicas y por lo tanto capaces de desarrollar una acción letal específica. Dentro de esta categoría los rayos γ y los x (radiaciones ionizantes) son las más energéticas, pudiendo provocar daños irreversibles a nivel celular, son muy poco específicas.

Los rayos x son letales para todas las formas de vida, debido a su alta energía y a su alto poder de penetración, pero no es un sistema utilizado debido a su alto coste y a la dificultad de controlar su acción.

Los rayos γ son un método ionizante muy adecuado para la esterilización de zonas y material sanitario y además de ser un sistema relativamente barato es fácilmente manejable y versátil. La desventaja que presenta es que para la desinfección de algunos microorganismos se necesita una energía demasiado elevada que puede afectar a la salud humana y por ello se deben extremar las precauciones durante el tratamiento.

La radiación ultravioleta no es ionizante, pero dependiendo del microorganismo, del tiempo de exposición y la dosis puede tener efectos letales. Para que sea efectivo el tratamiento por radiación UV la longitud de onda debe estar por debajo de los 260 nm. En algunos casos esta radiación no tiene efecto irreversibles, es decir, si el microorganismo vuelve a recibir radiación visible puede generar enzimas que favorezcan su recuperación.

A2.3.4 Desinfección por presión

La gran mayoría de microorganismos se desarrollan a temperatura atmosférica (salvo excepciones) por lo que cualquier variación de este parámetro influirá en su desarrollo. Si la presión alcanza 500 atm la supervivencia de cualquier microorganismo es prácticamente imposible y a partir de 100 atm se empieza a inhibir su crecimiento. Las elevadas presiones perjudican el equilibrio osmótico y reducen la división celular.

1. INTRODUCTION

1.1 BACKGROUND

Concrete is the most used building material in the world, because of its low cost and wide and high performance. Its evolution has been continuous since the nineteenth century, when concrete was appeared. In these two centuries the demands and the area application have significantly. One of these areas has been the areas associated with aspects of biology, either to prevent microorganisms appearance on the concrete, or just for the opposite, favoring its colonization, in certain areas, to take advantage of both positive synergies circumstances (concrete and microorganisms).

In this line of research in the Construction Engineering Department of the UPC is working in both directions through two PhDs. Manso's research (2012) is focused on the colonization of microorganisms on concrete elements, while the present PhD is dedicated to prevent or to delay the microorganisms development in such elements. Both cases try to respond to very interesting industrial problems, either to enhance aesthetic or environmental applications as in the first of the PhD or to reduce the risk of problems as in the present PhD.

Figure 1.1 shows two clear examples of problems that can occur in the concrete due to the presence of certain microorganisms. In the pictures displayed on the left it possible to see the consequences of algae action on a concrete floor in a marine environment, while the figure on the right shows the degradation experienced by a concrete pipe due to the action of *Thiobacillus thiooxidans*.



Figure 1.1.- Left: Pavement sailing Club with and without algal colonization. Right: Drain Pipe attacked by *Thiobacillus thiooxidans* (www.wallisengineering.net, 2012)

Because of their variety and their metabolic diversity, microorganisms are found in almost all habitats, including building materials. The effects can be positive or negative. In the first case can be beneficial under certain conditions, as demonstrated in several studies, which evaluated the use of microorganisms for the conservation of heritage (*De Muynck, W, 2009; De Muynck, 2011*).

However, the emphasis in this investigation is on the negative effects caused by the porous nature of concrete which serves as a refuge for microorganisms and this can have two negative impacts:

- To cause that concrete can become a microbial contamination source.
- Concrete can suffer various degradation processes due to microbial activity, causing its biodeterioration.

Regarding to the concrete as a potential microbial contamination source, it should be noted that as time goes by microorganism control becomes more relevant and becomes a major concern in many environments suchs as clinical or the industrial (food processing, pharmaceutical, etc.) and even the home environment. Hence, these environments must take into into account the environmental microbiological level role in the concrete in a building. In the case of the food industry (although it can be extrapolated to other industries) the asepsis level is especially important due to the large impact of cross contamination on products produced in this industry, understanding cross contamination as the microorganisms contamination produced by transmission from a food to another, directly or indirectly, as a result of inadequate hygiene (*Kusumaningrum and Cols., 2003*). In this situation pathogens can multiply to levels of risk (*Reij et al., 2004*).

The most important contamination media are the manipulators, the raw materials, the equipment and the contact surfaces (*Fuster, N. 2006*). This type of pollution is responsible for nearly 25% of food-borne outbreaks, according to a study by the World Health Organization in 1995 within Europe.

In this direction, recent studies (*Cowan et al. 2003; Moretro et al. 2006*) show that surfaces treated with the product to control the microbial population may reduce the microbiological burden of food in contact with them. The chemical components employed for these antimicrobial solutions are both of organic and inorganic origin. Within this group of products have greater relevance silver and copper compounds, being the most studied active principles (*Matsamura et al. 2003*). These products have been used in numerous applications such as household products and surgical tools.

Whatever is the origin of the active ingredients used so far as antimicrobial agents; the major disadvantage found when they are used in construction materials is the durability of its effect. As opposed to other applications (surgical materials, plastics, cleaning gels, packaging, etc.) buildings have a much longer useful life and thus must ensure that the duration of the effect is as long as possible, or at least to determine it.

Another aspect that should be taken into account when using antimicrobial products is its toxicity in human, animal and environmental terms. It is an important limitation because it restricts the number of chemical products which can be employed (*Nikawa et al. 1997; Hotta et al 1998; Matsumura et al, 2003*).

In response to the need for a building material that helps maintain hygienic conditions required for a particular activity some research have been done where the behavior of different components both organic and inorganic was studied, as inhibitors of certain microorganisms growth. An example of some of the researches conducted for this purpose is the evaluation of the performance of phenol derivatives as antimicrobial agent in walls and slabs made of concrete (*Wayne et al, 2000; Ramirez and De Leon, 2004*). Meanwhile, Navas and Borralleras (2005) studied the effect of adding to the concrete mass of polypropylene fibers containing in its composition bactericidal and fungicidal agents. This treatment achieved growth inhibition of certain bacteria and fungi, although the duration of effect wasn't determined.

Due to the high cost of the concrete mass treatment, nowadays solutions are being studied in which case only the concrete or mortar surface is treated, thereby avoiding providing antimicrobial protection to the interior of concrete, where life never develops to harmful microbial levels due to the oxygen, carbon dioxide and moisture existing conditions.

Regarding the second effect noted, the concrete biodeterioration it should be noted that a large number of researches explore the many processes caused by microorganisms which includes the concept biodeterioration. This concept should be defined as the process by which the structure loses some of the benefits for which it was designed due to the effect caused by microbiological activity in value or quality (*Rose, 1981*). Within the concept biodeterioration must distinguish three kinds, aesthetic, physical and chemical (*Gaylarde et al., 2003*) depending on the resulting consequences in the material affected.

The degradation degree of a material produced by the action of microorganisms is determined by four factors: microorganisms, structural element, environmental conditions and the building material. Figure 1.2 shows the interaction model involved in biodeterioration processes of a generic material construction.

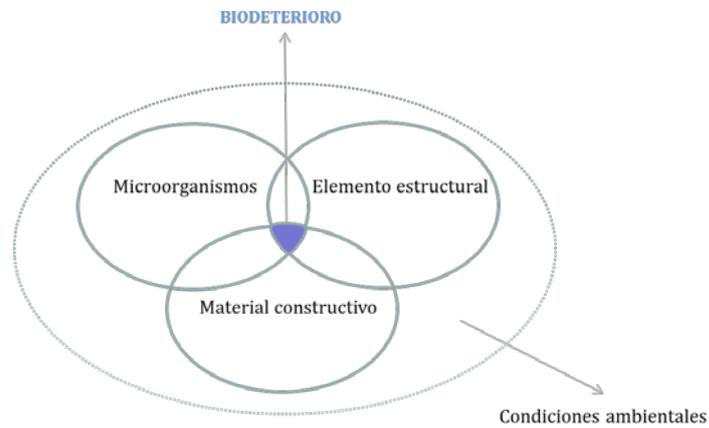


Figure 1.2.- Influential factors in biodeterioration (Sánchez-Silva et al., 2009)

To be sure, in an initial state structure is less susceptible to microbiological attack because of the material physicochemical characteristics (surface roughness, pH, material density, etc). Over time, these barriers become weaker and then microorganisms can colonize the structure, starting at this moment the biodeterioration. Environmental conditions, the use of the structure and arrangement determine largely the microbial presence in its type and quantity.

The biodeterioration effects in building materials have important economical consequences and should be taken into account in the cost structure throughout its production cycle. The structure durability and its maintenance will depend on material capacity to bear the microbial attack. Despite these significant impacts, biodeterioration does not receive the required attention in the standards, highlighting the two most important examples, the first one is Chapter 4 of *ACI 350-06 (2006)*, which defines concrete requirements in special exposure conditions, and second, the number 182, *The Durable Concrete Structures Bulletin d'information (1989)*, in which specifies the conditions are needed to be taken into account to define the concrete composition in biodeterioration risk applications (Hudon et al., 2011).

In environments where conditions are especially favorable for microbial development, the losses in structures capabilities due to biodeterioration can become noticeable; that is why in certain circumstances this effect should be especially considered. The quantification of the biodeterioration impact is difficult to estimate because these effects are not easily separable from other degradation processes. Sometimes biodeterioration accelerates other mechanisms that also damage the material.

The quantification of biodeterioration damages is also difficult because processes involved in it are studied by two very different disciplines, microbiology and engineering, and not always the engineering community is familiar with these biological processes and vice versa (Sanchez-Silva, 2009). However there are some cases of quantification, one of them revealed that 1% of the total cost of the buildings in Hamburg was destined to maintenance each year, due to physical degradation, chemical and biological Sand and Bock (1991).

Within biodeterioration processes is one of the most studied the concrete pipes degradation by sulfuroxidants bacteria is because of the significant problems they cause. This type of biodeterioration appears in special conditions of acidity generated by the action of hydrogen sulfide and carbon dioxide from carbonation, causing the water present in the concrete porosity to reduce its pH from 12 to pH 9. In these conditions the *Thiobacillus thiooxidans* (bacteria), also known as *Acidithiobacillus thiooxidans*, grows in the biofilm formed on the inner pipe and metabolizes hydrogen sulfide into sulfuric acid (Hudon, E. et al. 2011). This process causes a significant concrete section loss in pipes which compromising the structure durability.

In order to assess the economic impact of deterioration processes, the U.S. has conducted several studies to show that the degradation of both concrete sewer pipes and other facilities for waste water treatment causes. The U.S alone has economic losses of several billion dollars annually (Brongers et al., 2001; Environment Protection Agency (EPA), 1999). Of these costs, damage to wastewater utilities are valued at \$ 30 billion annually. In the case of the city of Los Angeles these costs were valued at \$ 200 million (McCrary et al., 1994).

At European level in the study of Kaempfer and Berndt (1999) it was estimated that the cost of repair and maintenance of public and private sewer systems in Germany amounted to \$ 100 million, 40% of which was attributed to corrosion by sulfuric acid biogenic attack.

Currently in Spain there is no treatment to prevent or minimize this biodeterioration, although there are patents in this regard (Maeda, "growth inhibitor *Thiobacillus thiooxidans*", ES 2 T3 205 203, 01.05.2004) and consequently this problem is displacing this constructive solution (concrete pipes) by others which are unaffected by this process, for example plastics pipes, although the diameter range for small or medium. Once known this situation it is necessary to at least, establish a methodology for assessing this degenerative process and then approach potential solutions.

Finally, it can be concluded that many of concrete biodeterioration problems and other construction materials are not solved yet. Therefore, is needed in future researches greater convergence across disciplines, engineering and microbiology, in future research.

1.2 RESEARCH SIGNIFICANCE

The lack of a deep understanding of the possible effects that the presence of certain microorganisms in concrete, both hygienic conditions conservation in a building, as the material biodeterioration due to microorganisms metabolism, forces a number of important economic losses and so far not reliably quantified. These are different kind of losses like, loss of effectiveness in the food industry, greater structure maintenance costs due to biodeterioration or physical discomfort produced by microbiological contamination in the working environment.

In this direction, these issues are not currently being deeply studied or properly taken into account. One of the clearest examples of this is the null importance that is given to the potential microorganisms presence in the concrete designing process, although their durability can be clearly determine.. Another example to remark is the clear influence of the construction material in hygienic conditions required in a building. These examples show that it is considered essential to study methodologies to determine the effects of microorganism-concrete interaction and evaluate solutions to minimize or avoid potential consequences.

1.3 OBJECTIVES

1.3.1 General objectives

The general objectives of this PhD are:

- To develop a methodology by which evaluate the different chemical agents effectiveness against the certain microorganisms growth and its durability. Within this study evaluates another important point, the antimicrobial agents influence on the concrete fundamental properties.
- To assess the chemical indicators antimicrobial effect against pathogenic microorganisms to human and / or its activity (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*) or against the microorganisms wich growth may be cause concrete biodeterioration (*Scenedesmus vacoulatus*, *Stichococcus bacillaris* and *Thiobacillus thiooxidans*).
- To compare the laboratory results with field trials results and thus to evaluate the products performance in real use conditions.

1.3.2 Specific objectives

In order to achieve the general objectives specific ones are established.

Methodology development

- To study existing methodologies to evaluate chemical agents antimicrobial effectiveness.
- A new model proposal to determine the antimicrobial effect durability.
- To develop a model by which to determine the antimicrobial agents toxicity (human, animal or environmental).
- To study possible solutions with real applications through field trials.

Antimicrobial activity evaluation:

- Determining the different agents antimicrobial activity, both mono-component and multi-component.
- Evaluation of the antimicrobial agents influence on the concrete fundamental properties.
- Checking the possible antimicrobial chemical agents toxicity.
- To verify the results observed in the laboratory with the results obtained in field trials.
- To compare the obtained results with other authors results.

1.4 METHODOLOGY

To achieve this PhD the goals is necessary to develop a methodology that allows it. The methodology used in the experimental phase includes laboratory tests as field tests. One of the notable aspects of the methods used is that follows a waterfall program, whereby only antimicrobial agents with good results pass to the next stage. This is intended to minimize the cost and time involved in the pilot phase, as shown in Figure 1.3.

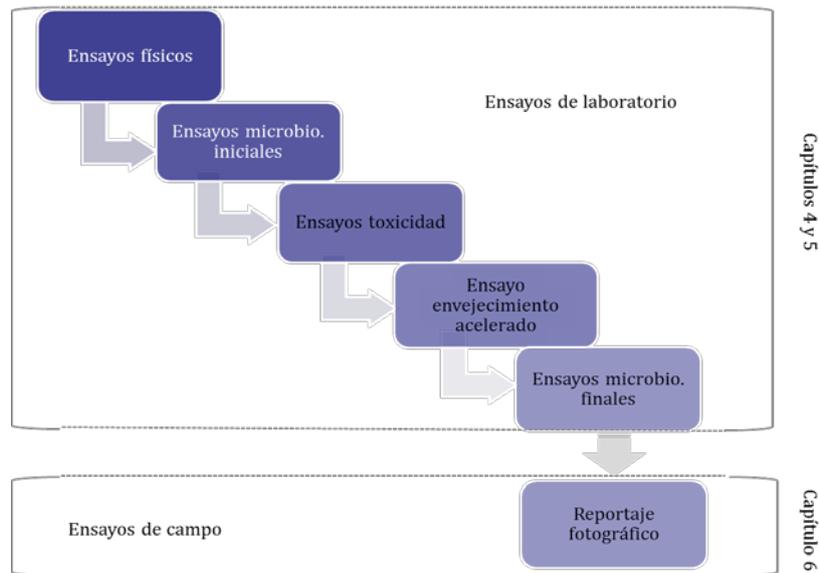


Figure 1.3.- Stages of microbiological laboratory tests.

There are two types of laboratory microbiological tests: the first one, microbiological test using *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Stichococcus bacillaris* and the second one, microbiological tests using *Thiobacillus thiooxidans*. In the first phase of the methodology the key laboratory tests are: physical tests, initial and final microbiological tests, toxicity determination tests, accelerated aging test (see Figure 1.3).

The steps followed in microbiological tests (Figura 1.4) in assessing the antimicrobial agent efficiency against biogenic sulfuric acid attack produced by *Thiobacillus thiooxidans* are:

- Physical tests.
- Acid attack simulation testing.
- Monitoring variables of biodeterioration evolution.

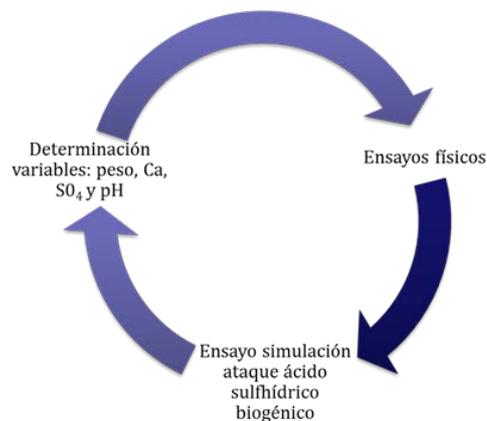


Figura 1.4.- Microbiological testing stages with *Thiobacillus thiooxidans*

After the antimicrobial agents efficacy evaluation laboratory tests (chapters 4 and 5) against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Stichococcus bacillaris* formulations with the best performances were selected and they were used in the field tests. The aim of these fields was to evaluate the formulations performance in real conditions. In this two formulations efficacy was evaluated against the algae growth in the port of Barcelona.

1.5 CONTENTS OF THE DOCUMENT

The PhD consists of eight chapters and two annexes. This chapter (Chapter 1) is the introduction and presents the topic, objectives and the methodology required to achieve the objectives.

Chapter 2 presents a literature review about the microorganism-concrete interaction and its possible consequences and influencing factors. It also presents the main methodologies to monitor this interaction.

Meanwhile, Chapter 3 proposes a methodology to evaluate possible specific variables and in turn, required to achieve the objectives. This chapter details the methodology used in the tests, both in the laboratory and those carried out at the field level.

Chapter 4 presents and discusses the laboratory tests results using monocomponent antimicrobial agents. Meanwhile, following the same pattern as in the previous chapter, Chapter 5, shows the results of microbiological tests carried out by employing multicomponent antimicrobial agents.

Chapter 6 shows the results observed after field testing phase in the port of Barcelona. It assesses the formulations performances in real use conditions which showed better results in laboratory tests.

Chapter 7 shows the experimental phase results obtained from the sulfuric acid biodeterioration simulation test using *Thiobacillus thiooxidans*. These test results determine the antibacterial agent efficiency against biodeterioration process.

Chapter 8 discusses the conclusions obtained from the different studies developed and suggests future research to achieve deeper knowledge about some points covered in this PhD.

Annex 1 provides a microorganism's overview, with special emphasis on the indicators microorganisms. In addition, in annex 2 shows the information concerning the current status of disinfectants used nowadays to control the microbial population.

8. CONCLUSIONS

8.1 INTRODUCTION

This chapter presents the key findings reached from the research conducted in this PhD, classified in general conclusions and specific conclusions. The general conclusions (section 8.2) are derived from the primary objectives presented in Chapter 1, which lead the direction of the study, and these can be summarized into two: the first one is the development of a methodology to assess the effectiveness of different chemicals and their durability, and the second, the antimicrobial effect evaluation of different chemicals against selected indicators microorganisms.

Regarding the specific conclusions (section 8.3) they respond to the specific objectives initially set at the end of the experimental phase. The specific findings concerning the methodology, determine its suitability to evaluate the defined objectives. Moreover, specific conclusions about the effectiveness of antimicrobial agents show benefits from several points of view: antimicrobial activity, its durability and toxicity assessment in real use conditions.

In the last section (8.4), in order to deepen the knowledge about the concrete biodeterioration and the possible solutions, some proposals are given for future research and experimental phases on this line of study.

8.2 GENERAL CONCLUSIONS

The contribution of this work to the field of research on concrete-microorganism interaction is focused on two main points: a new testing methodology development for evaluation of microorganism-concrete interaction and different formulations performance evaluation.

It has been proposed a new global methodology to evaluate the antimicrobial active ingredients effectiveness. This methodology involves the study of the influence of chemicals in the concrete properties, the possible antimicrobial active leaching and its effectiveness and durability both in laboratory and in field tests.

The main advantage of the proposed methodology compared to the existing methodologies described in the scientific and technical literature, is based on two fundamental points. First, this method evaluates directly the active antimicrobial efficiency, rather than the subsequent concrete degradation. Secondly, we study the antimicrobial efficiency coupled with the effect of the active ingredient in concrete properties, thus evaluating the most suitable chemicals, from the antimicrobial activity and from the viewpoint of the material.

Also, in this PhD 10 commercial products have been evaluated with antimicrobial properties. These products, initially designed for other applications, have been evaluated for use as antimicrobial agents in concrete, thereby performing a selection of the most suitable characteristics and formulations. It could serve as a starting point in terms of the possible products that can be used in concrete, as well as to raise some guides about how to formulate a product to achieve the desired effect.

8.3 SPECIFIC CONCLUSIONS

In this section the specific conclusions from the two main points covered in this research, methodology and proposed solutions against concrete biodeterioration, are presented.

8.3.1 Methodology development

The methodology proposed in this work complements other methodologies used in other researches, by evaluating new parameters which have not been considered so far and by giving additional information about the processes of concrete biodegradation. The following are the conclusions drawn by this methodology:

- It is necessary to evaluate the influence of the chemicals on concrete properties, such as consistency, density and mechanical property development, at an early age and at 28 days, to ensure that the proposed solution does not harm the material final performances.

- Likewise, it is necessary to consider the possibility that the active principle leaches to ensure the antimicrobial effect durability and to prevent contamination of the environment in which the concrete is treated. Some formulations should be discarded due to their leachability, such as the D211 and Vantocil, Biopol IB.
- It is necessary to develop tests to characterize, directly and reliably, the active ingredients antimicrobial effect. Most of the consulted methodologies study the concrete degradation resistance (mainly acid attack) but not the efficacy of the chemicals as antimicrobial agents. In this investigation tests were developed directly to assess the biological growth inhibition due to the antimicrobial agents' effect.
- The antimicrobial effect durability is another factor to consider in the evaluation methodology to ensure the permanence of this effect over time. Thus, it is possible to establish the structure planning and maintenance. This parameter is not evaluated in any of the methods found in the literature and in this PhD is defined an accelerated aging test by which the concrete is subjected to light and humidity extremes conditions, simulating a long period of time.
- Finally, the laboratory results must be compared with field tests to allow antimicrobial effect in real use conditions validation. Thus, it is possible to evaluate the industrial feasibility of the solution proposed.

8.3.2 Antimicrobial activity evaluation

- In this PhD 17 different formulations have been evaluated containing 10 active ingredients, which have permitted to discriminate the most appropriate chemical and formulation to achieve the ultimate goal, to obtain an effective antimicrobial treatment which does not prejudice the concrete properties.
- Evaluation of different monocomponent formulations shows that to achieve a long lasting effect and a broad microorganism's spectrum, it is necessary to develop a product that combines different active ingredients.
- Of all evaluated multicomponent agents, only the formulated PL-UV-M-2B shows effectiveness against all species of microorganisms evaluated before and after the accelerated aging process.
- The formulation performance assessment in real conditions (the port of Barcelona) confirms its effectiveness slowing the algae growth rate on the concrete surface up to 16 weeks.

- It's been proved that using only an algaecide product, as formulation PL-UV-H-3B, excellent results can be obtained against the growth of algae both in field and in the laboratory. Thus, it could lower the material treatment cost.
- Biogenic sulfuric acid's action simulation tests by the method described by Vincke, demonstrate that use of the formulation BXT/I reduced more than 30% the concrete mass loss caused by this process, proving it as a valid solution to this problem.

8.4 FUTURE RESEARCH LINES

The research developed in this investigation is a step in the state of microorganism-concrete interaction knowledge, although there are many ways in which one could investigate to explore more about the processes involved in biodeterioration and then, develop appropriate solutions. Here are some possible researching lines arising from this work:

- The need to develop interdisciplinary projects on this investigation topic to achieve more knowledge about the conditions that favor the colonization of the concrete by different microorganisms and the effects of metabolism of these concrete properties as well as the potentially harmful effects in the environment of microorganisms present in the concrete.
- Standards development is essential in this regard in Spain, because nowadays there are no instructions or rules determining the possible effects of the microorganisms' presence in concrete. Taking as its starting point some of the existing regulations in other countries and being aware of the potential impact on humans of the microbial presence in concrete, it is necessary to develop statewide regulations setting concrete recommended dosages in these circumstances.
- It is necessary to study different ways to apply the active chemicals to the concrete. The solutions proposed in this work are based on mass treatments causing them to have a very high economic cost. To increase the economic viability of such solutions, effective surface treatments must be developed employing a smaller quantity of product to reduce the cost without losing effectiveness. Nowadays, more economical surface treatments are being tested giving excellent results, as shown in the Figure 8.1. Certainly, this should be a line of research to develop.

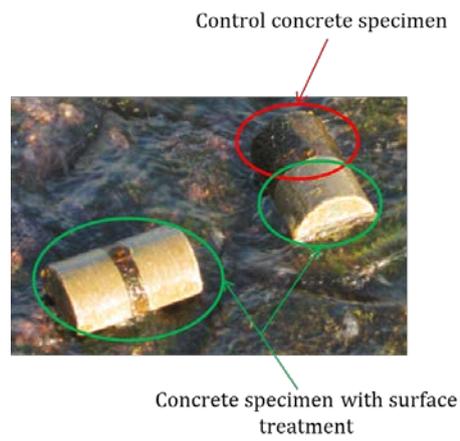


Figure 8.1.- Concrete specimens with and without surface treatment located in the port of Barcelona.

