



UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA
BARCELONATECH

*Estabilización de suelos con bacterias *Sporosarcina pasteurii**

Elitsa Ivanova Téneva

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 repositori institucional UPCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) i el repositori cooperatiu TDX (<http://www.tdx.cat/>) 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 UPCommons o TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a UPCommons (*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 repositorio institucional UPCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) y el repositorio cooperativo TDR (<http://www.tdx.cat/?locale-attribute=es>) 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 UPCommons No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a UPCommons (*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 institutional repository UPCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) and the cooperative repository TDX (<http://www.tdx.cat/?locale-attribute=en>) 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 nor availability from a site foreign to the UPCommons service. Introducing its content in a window or frame foreign to the UPCommons service is not authorized (*framing*). These 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.



**Laboratori per a la Innovació
Tecnològica d'Estructures i Materials**

Tesis Doctoral

Estabilización de suelos con bacterias *Sporosarcina pasteurii*

Autora:

Elitsa Ivanova Téneva

Directores:

Lluís Gil Espert

Ernest Bernat Masó

Tesis presentada para obtener el título de Doctora por la Universitat
Politécnica de Catalunya

Programa de doctorado en: Enginyeria Mecànica, Fluids i Aeronàutica

Escola Superior d'Enginyeries Industrial, Aeroespacial i Audiovisual de
Terrassa. Universitat Politècnica de Catalunya, *BarcelonaTECH*

Terrassa, Julio del 2019

En memoria de mi abuelo Теньо Тенев

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, querría expresar mi más sincero agradecimiento a Ernest Bernat Masó y Lluís Gil Espert, los directores de la presente Tesis Doctoral, por ofrecerme una oportunidad excepcional. Éste proyecto se ha realizado gracias a su gran apoyo y valiosa guía.

También me gustaría mostrar mi agradecimiento a Manuel José Lis Arias por su ayuda y sus preciados consejos siempre que lo he necesitado.

Un agradecimiento especial a mis compañeros del laboratorio, Nur, Asyraf, Abdul y Joan por ayudarme a desarrollar el proyecto y por estar allí para colaborar conmigo cuando lo necesité.

Finalmente, quisiera agradecer a mi familia la posibilidad que me han brindado de estar aquí y a mis amigos, el apoyo moral que me han aportado a lo largo de éste camino.

Gracias a ti también, Daniel, por leer cada página de éste trabajo, pacientemente, conmigo, sugerirme mejoras y apoyarme. ¡Te quiero!

Elitsa Ivanova Téneva

Terrassa, Julio del 2019

RESUMEN

La tierra es uno de los materiales más antiguos y predominantes en la construcción. Además de ser natural y reciclable, es el más abundante en la mayoría de las regiones del mundo. En la actualidad un tercio de la humanidad vive en viviendas de tierra, y en países en vías de desarrollo esto representa más del 50%.

Las construcciones de tierra sin estabilizantes son vulnerables frente al agua y los sismos, dando como resultado muy poca resistencia y durabilidad. Los estabilizantes utilizados en los países industrializados, como el cemento que es el aglomerante más universal, contaminan el medio ambiente y generan residuos difíciles de gestionar. Por ésta razón, en los últimos años, las biotecnologías han avanzado significativamente permitiendo estabilizar suelos y minimizando el impacto ambiental; siendo un método 100% natural que al mismo tiempo permite reducir los costes de producción.

La precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) es un proceso biológico natural que induce carbonato cálcico en el suelo a través de la hidrólisis de urea por las bacterias. Además, tiene varias aplicaciones en la estabilización y la restauración de diversos materiales en la construcción y permite una alta cantidad de producción de CaCO_3 en poco tiempo.

La presente tesis se ha centrado en el estudio de la tecnología de la MICP y su capacidad resistente en cuatro tipos de suelos diferentes, considerados prioritarios para la aplicación de la bioestabilización. La bacteria elegida para la realización de los ensayos ha sido la *Sporosarcina pasteurii*, debido a que sus propiedades favorecen éstos procesos. Para conseguir caracterizar los diferentes parámetros que nos permiten optimizar la bioestabilización, en primer lugar se han realizado diversos estudios experimentales para determinar las características del cultivo de la bacteria *Sporosarcina pasteurii* y su aplicación en el proceso de bioestabilización.

En segundo lugar, se han llevado a cabo ensayos a compresión uniaxial no confinada sobre probetas cilíndricas de tamaño reducido, tratadas con MICP y realizadas con tres procedimientos experimentales diferentes. El primer procedimiento ha consistido en someter las probetas a tratamientos de estabilización con concentraciones bacterianas diferentes. En el segundo procedimiento experimental, las probetas se han realizado con el ciclo hielo-deshielo y en el tercero, se ha incorporado el proceso de compactación antes o después del tratamiento con MICP. En los primeros dos procedimientos experimentales se ha considerado la humedad inicial del suelo en términos de capacidad de absorción, con el objetivo de limitar el aporte total de suspensiones y disoluciones durante el proceso de estabilización. En el tercero, se han realizado unos ensayos previos a los de compresión para la determinación de la humedad óptima de compactación conforme la norma UNE 103-501-94 (Proctor Modificado), que sería preferible en el momento de la compactación de los suelos bioestabilizados.

En tercer lugar, se ha determinado la resistencia a corte directo conforme la norma UNE 103-401-98 de probetas cúbicas de suelo que permitieron realizar los ensayos y que habían sido tratadas con MICP y diferentes concentraciones de bacterias.

En cuarto lugar, la tecnología de bioestabilización ha sido desarrollada en moldes de mayores dimensiones y ha sido validada a través de la determinación de su capacidad portante. Para ello, primero se han definido los tipos de suelo a estudiar y se han realizado cálculos de cantidades de bacterias necesarias y riegos enriquecidos. Posteriormente, se ha ejecutado la bioestabilización y se ha implementado el control del proceso de secado mediante ultrasonidos.

Por último, se ha estudiado la influencia a la permeabilidad de los suelos bioestabilizados, realizados con dos estudios experimentales. En el primero, se han analizado la permeabilidad y la porosidad de probetas cilíndricas compactadas que validarían el efecto de los diferentes tipos de compactación sobre la resistencia a compresión. En el segundo, se ha estudiado la permeabilidad de probetas de suelo con mayores dimensiones en corte transversal.

Los resultados muestran que en el caso de controlar la concentración de bacterias y también la fuente y la concentración de calcio, se puede influir en la morfología final del cristal de carbonato cálcico obtenido; controlando la cantidad de cristales unitarios, el tamaño del cristal y la formación de conglomerados. También se describen los tratamientos y las concentraciones de bacterias óptimas para cada tipo de suelo. Se consiguen aumentos de resistencia a compresión uniaxial no confinada de hasta 790% y 900% para suelos de arena fina y arena gruesa, respectivamente. Por otra parte, el método de determinación de la humedad mediante ultrasonidos se muestra especialmente útil y permite distinguir el momento en el que las probetas alcanzan el equilibrio higrométrico.

Finalmente, se han tabulado los resultados obtenidos, permitiendo conocer los procedimientos y parámetros óptimos que permiten maximizar el rendimiento de la bioestabilización en función de cada uno de los diferentes tipos de suelos estudiados.

ABSTRACT

Earth is one of the oldest and predominant construction materials. Besides being natural and recyclable, it is the most abundant in most regions of the world. Even today, one third of the human population lives in earthen buildings and in the developing countries this figure is more than 50%.

Earthen constructions without stabilizers are vulnerable to water and earthquakes, giving as a result low resistance and durability. The stabilizers used in industrialized countries, such as cement, (which is the most universal binder) pollute the environment and generate waste that is difficult to manage. For this reason, in the last few years, biotechnologies have progressed significantly in stabilizing soils and minimizing environmental impact; being a 100% natural method that may allow reducing production costs at the same time.

Microbiologically induced calcite precipitation (MICP) is a natural biological process that induces calcium carbonate in the soil through the hydrolysis of urea by bacteria. In addition, it has several applications in the stabilization and restoration of various construction materials. Furthermore allows a high amount of CaCO_3 production in a short time.

This thesis has been focused on the study of MICP technology and its stabilizer capacity in four different representative types of soils. The bacteria chosen to carry out the tests is *Sporosarcina Pasteurii*, because of its properties that favor these processes. In order to characterize the different parameters that allow optimizing bio stabilization, first several experimental studies have been carried out to determine the characteristics of the culture of the bacteria *Sporosarcina Pasteurii* and its application to the bio stabilization process.

Secondly, unconfined uniaxial compression tests have been carried out on cylindrical soil specimens treated with MICP to assess three different experimental procedures:

1. The first procedure consisted of subjecting the specimens to stabilization treatments with different bacterial concentrations.
2. In the second experimental procedure, the specimens were subjected to freeze - thaw cycle and the compaction process was incorporated before or after the MICP treatment. In the first two experimental procedures, the initial humidity of the soil has been considered in terms of absorption capacity, with the aim of limiting the total volume of suspensions and solutions added during the stabilization process.
3. In the third, compaction tests have been carried out to determine the optimum moisture for compaction according to the UNE 103-501-94 standard (Modified Proctor), which would be preferable at the time of compaction of bio stabilized soils.

Thirdly, direct cutting resistance according to the UNE 103-401-98 standard has been determined from cubic soil test specimens, treated with MICP and different concentrations of bacteria.

Fourth, bio stabilization technology has been applied in larger specimens and has been validated through the determination of its bearing capacity. For that purpose, first the types of soil to be studied have been defined and calculations of the quantities of necessary bacteria and enriched irrigation have been carried out. Subsequently, bio stabilization has been carried out and control of the drying process by means of ultrasound has been implemented.

Finally, the influence of bio-stabilization on the permeability of soils has been studied with two experimental approaches: the permeability and porosity of compacted cylindrical specimens that would validate the effect of the different types of compaction on the compressive strength have been analyzed. Afterwards, the permeability of soil test with larger dimensions in cross section has been studied.

The results show that in the case of controlling the concentration of bacteria and the source and concentration of calcium, the final morphology of the obtained calcium carbonate crystal can be influenced; controlling the amount of unitary crystals, the size of the crystal and the formation of conglomerates may be modified. The treatments and optimum bacterial concentrations for each type of soil are also described. Increases of unconfined uniaxial compression strength reach values up to 790% and 900% for fine sand and coarse sand soils, respectively. On the other hand, the method of determination of the moisture content by means of ultrasounds is especially useful and allows distinguishing the moment in which the test pieces reach the hygrometric equilibrium.

To conclude, the obtained results have been tabulated and allowed to know the optimal procedures and parameters that allow maximizing the performance of the bio stabilization depending on the properties of each one of the different types of soils studied.

CONTENIDOS

Publicaciones	XXIV
Capítulo 1: Introducción y objetivos.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Objetivos.....	2
1.3. Metodología de la investigación.....	3
1.4. Descripción de los contenidos.....	4
Capítulo 2: Estado del arte.....	9
2.1. El uso de la tierra como material de construcción de edificios.....	9
2.1.1. Técnicas de construcción con tierra.....	9
2.1.2. Construcción con tierra armada	13
2.2. Estabilización para la construcción de líneas ferroviarias y carreteras.....	16
2.2.1. Elementos constructivos.....	16
2.2.2. Materiales para la estabilización.....	17
2.3. Estabilización de estructuras geotécnicas con aglomerantes.....	18
2.4. Estabilización (biomineralización) de estructuras geotécnicas con bacterias.....	20
2.4.1 Microorganismos en la construcción microbiana.....	21
2.4.2 Materiales biotecnológicos microbianos.....	21
2.5. Biomineralización de estructuras geotécnicas con carbonato de calcio y bacterias <i>Sporosarcina pasteurii</i>	27
2.5.1 Un ejemplo de mineralización inducida biológicamente sería la precipitación de carbonato de calcio (CaCO ₃).....	27
2.5.2 Mineralización inducida biológicamente por precipitación de carbonato de calcio a través de la hidrólisis de urea.....	28
2.5.3 Mineralización inducida biológicamente de precipitación de carbonato de calcio a través de la hidrólisis de urea y <i>Sporosarcina pasteurii</i>	30
2.6. Conclusiones	35
Capítulo 3: Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias en medio acuoso.....	37
3.1. Introducción.....	37
3.2. Preparación de las probetas.....	37
3.3. Procedimiento y configuración de los ensayos.....	38
3.3.1. Consumo de Urea	38
3.3.2. Carbonato de calcio precipitado.....	38
3.3.3. PH.....	39

3.3.4.	Cinética de la reacción.....	39
3.4.	Resultados obtenidos de los ensayos.....	39
3.4.1.	Consumo de urea y formación de carbonato de calcio.....	39
3.4.2.	Representación de la cinética de la reacción.....	42
3.4.3.	Forma del carbonato cálcico obtenido.....	44
3.5.	Análisis de los resultados obtenidos.....	46
3.5.1.	Temperatura.....	46
3.5.2.	Fuente de calcio.....	46
3.5.3.	Concentración de calcio.....	47
3.5.4.	Concentración de bacterias.....	47
3.5.5.	Efecto de aumentar la concentración de calcio cuando la de bacterias es alta.....	47
3.6.	Conclusiones.....	47
Capítulo 4: Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión uniaxial.....		
4.1.	Introducción.....	49
4.2.	Materiales utilizados.....	49
4.3.	MICP en probetas cilíndricas de suelo sin compactación.....	50
4.3.1.	Procedimiento experimental.....	50
4.3.2.	Configuración de los ensayos.....	50
4.3.3.	Resultados obtenidos de los ensayos.....	52
4.3.4.	Análisis de los resultados obtenidos.....	58
4.3.5.	Conclusiones.....	60
4.4.	MICP en probeta cilíndrica compactada.....	60
4.4.1.	Procedimiento experimental.....	60
4.4.2.	Configuración de los ensayos.....	61
4.4.3.	Resultados obtenidos de los ensayos.....	61
4.4.4.	Análisis de los resultados obtenidos.....	67
4.4.5.	Conclusiones.....	67
Capítulo 5: Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo.....		
5.1.	Introducción.....	69
5.2.	Materiales utilizados.....	69
5.3.	Procedimiento experimental.....	69
5.4.	Resultados obtenidos de los ensayos.....	70
5.5.	Análisis de los resultados obtenidos.....	72

5.6.	Conclusiones.	73
Capítulo 6: Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probetas de suelo con el objetivo de determinar su capacidad portante.		
6.1.	Introducción.	75
6.2.	Materiales utilizados.	75
6.3.	Procedimiento experimental.	75
6.3.1.	Configuración de los ensayos.....	76
6.4.	Resultados obtenidos de los ensayos.	77
6.4.1.	Pruebas de placa de carga.	77
6.4.2.	Humedad del suelo en el momento del ensayo.	78
6.4.3.	Control de la evolución de la humedad mediante ultrasonidos.....	79
6.5.	Conclusiones.	79
6.5.1.	Pruebas de placa de carga.	80
6.5.2.	Control de la evolución de la humedad mediante ultrasonidos.....	80
6.5.3.	Procedimiento de ejecución del ensayo.....	80
Capítulo 7: Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP).		
7.1.	Introducción.	83
7.2.	Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas cilíndricas compactadas y tratadas con MICP.	83
7.2.1.	Materiales utilizados.....	83
7.2.2.	Procedimiento experimental.	84
7.2.3.	Resultados obtenidos de los ensayos.	84
7.2.4.	Análisis de los resultados obtenidos.....	92
7.2.5.	Conclusiones.	93
7.3.	Determinación de la permeabilidad de las probetas de suelo compactadas y tratadas con MICP.	93
7.3.1.	Materiales utilizados.....	93
7.3.2.	Procedimiento experimental.	94
7.3.3.	Resultados obtenidos.	94
7.3.4.	Análisis de los resultados obtenidos.....	106
7.3.5.	Conclusiones.	106
Capítulo 8: Conclusiones y futuras investigaciones.....		
8.1.	Conclusiones.	109
8.2.	Futuras investigaciones.....	113
Referencias bibliográficas.....		115

Anexo A.	Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias en medio acuoso.....	121
A.1.	Introducción.....	121
A.2.	Materiales.....	121
A.2.1.	Materiales para preparar la solución de cementación.....	121
A.2.2.	Materiales para preparar Bang media.....	124
A.2.3.	Materiales (reactivos) necesarios para realizar la determinación de urea.....	129
A.3.	Procedimiento experimental.....	132
A.3.1.	Procedimiento de preparación de disoluciones.....	132
A.3.2.	Procedimiento y configuración de los ensayos.....	136
A.4.	Resultados obtenidos.....	142
A.4.1.	PH, consumo de urea y formación de carbonato de calcio.....	142
A.4.2.	Representación de la cinética de la reacción.....	146
A.4.3.	Forma del carbonato cálcico obtenido.....	149
Anexo B.	Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión.....	153
B.1.	MICP en probetas cilíndricas de suelo sin compactación.....	153
B.1.1.	Introducción.....	153
B.1.2.	Materiales.....	153
B.1.3.	Procedimiento experimental.....	155
B.1.4.	Cálculo de los resultados obtenidos.....	165
B.2.	MICP en probeta cilíndrica compactada.....	174
B.2.1.	Introducción.....	174
B.2.2.	Materiales.....	174
B.2.3.	Procedimiento experimental.....	174
B.2.4.	Cálculo de los resultados obtenidos.....	187
Anexo C.	Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo.....	193
C.1.	Introducción.....	193
C.2.	Materiales.....	193
C.3.	Procedimiento del ensayo.....	193
C.3.1.	Metodología y producción de las probetas.....	193
C.3.2.	Procedimiento de preparación de disoluciones.....	198
C.3.3.	Determinación de la aportación máxima de líquido en una probeta.....	198
C.3.4.	Determinación de la influencia del cultivo.....	198
C.3.5.	Determinación de los riegos enriquecidos.....	199

C.3.6.	Proceso para desmoldar las probetas.....	199
C.3.7.	Metodología de los ensayos a corte directo.....	200
C.4.	Cálculo de los resultados obtenidos.....	201
C.4.1.	Tabla resumen.	209
Anexo D. Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probeta de suelo con el objetivo de determinar su capacidad portante.....		
D.1.	Introducción.	211
D.2.	Materiales.	211
D.2.1.	Suelos a estabilizar.....	211
D.2.2.	Materiales para preparar la solución de cementación.....	212
D.2.3.	Materiales para preparar medio Bang.....	212
D.2.4.	Preparación de suspensión de Sporosarcina pasteurii.	212
D.3.	Procedimiento experimental.	213
D.3.1.	Metodología y producción de las probetas.	213
D.3.2.	Determinación del volumen de inoculación.....	214
D.3.3.	Determinación de los riegos enriquecidos.	215
D.3.4.	Compactación de las probetas.....	216
D.3.5.	Control de la evolución de la humedad mediante ultrasonidos.....	220
D.3.6.	Pruebas de carga.....	222
D.4.	Resultados obtenidos.....	223
Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP).		
E.1.	Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas cilíndricas compactadas y tratadas con MICP.	227
E.1.1	Introducción.....	227
E.1.2	Materiales.	227
E.1.3	Procedimiento experimental.	227
E.1.4	Cálculo de los resultados obtenidos.	231
E.2.	Determinación de la permeabilidad de las probetas de suelo compactadas y tratadas con MICP. 237	
E.2.1	Introducción.....	237
E.2.2	Materiales.	237
E.2.3	Procedimiento experimental.	237
E.2.4	Resultados obtenidos.	243

LISTADO DE FIGURAS

<i>Figura 2. 1: Distribución global de las construcciones de tierra [2].</i>	9
<i>Figura 2. 2: Casas típicas de Adobe [5].</i>	11
<i>Figura 2. 3: Construcción de tierra apisonada Tapia [6] [7].</i>	11
<i>Figura 2. 4: Construcción de COB [8].</i>	11
<i>Figura 2. 5: Clasificación de las partículas por su tamaño [13].</i>	12
<i>Figura 2. 6: Casas de adobe destruidas [21].</i>	14
<i>Figura 2. 7: Deficiencias Sísmicas de Albañilería de Adobe [5].</i>	15
<i>Figura 2. 8: Colocación del Refuerzo de Caña en Perú [5].</i>	15
<i>Figura 2. 9: Edificación de adobe con Contrafuertes y Pilastras [5].</i>	16
<i>Figura 2. 10: Elementos constructivos de la sección transversal ferroviaria y de las carreteras [23].</i>	17
<i>Figura 2. 11: Precios del cemento en los países [35].</i>	20
<i>Figura 2. 12: Las direcciones de la biotecnología en la construcción [36].</i>	22
<i>Figura 2. 13: Los resultados de las biotecnologías en la construcción [36].</i>	24
<i>Figura 2. 14: Imágenes de microscopio de muestras tratadas con el mecanismo de auto reparación A: sin bacteria y B: con bacteria, antes y después del tratamiento [46].</i>	26
<i>Figura 2. 15: Biomineralización de carbonato de calcio en las estructuras naturales A: corales, B: montañas de termitas C: cuevas de caliza [49].</i>	27
<i>Figura 2. 16: Valores de amonio, calcio y pH en el final de incubación de las muestras con Ni [59].</i>	29
<i>Figura 2. 17^a: Imagen obtenida con SEM (x2000), donde se observan cristales romboédricos de calcita. Figura 2. 17b: Análisis EDX obtenido para los cristales presentados en 17a [62].</i>	30
<i>Figura 2. 18: Análisis de Microscopio electrónico de Barrido (SEM) muestra las bacterias insertadas en los cristales del material cementado de columnas de arena. A: Los cristales de calcita se han formado sobre las partículas de arena en la rotura de la columna. B: Formación de cristales, similares de los de imagen A. Los cristales en esta imagen son más distinguibles. C: Sporosarcina pasteurii dentro de los cristales de imagen B. D: Imagen C aumentada. Los túneles vasillos y las formas de esfera representan el espacio ocupado por las bacterias [65].</i>	32
<i>Figura 2. 19: Mineralización inducida biológicamente de precipitación de carbonato de calcio en presencia de Sporosarcina pasteurii. Los puntos representan los promedios de los ensayos y sus repeticiones [65].</i>	32
<i>Figura 2. 20: Efectos de precipitación de calcita inducida microbiológicamente sobre el módulo de la elasticidad y la fuerza de tracción del poliuretano [70].</i>	34
<i>Figura 2. 21: Microscopio electrónico (SEM) de Sporosarcina pasteurii en precipitación de calcita y poliuretano [70].</i>	35
<i>Figura 3. 1: Grafico de consumo de urea en las pruebas 1, 2, 3, 4 y 5.</i>	39
<i>Figura 3. 2: Grafico de formación de CaCo3 en las pruebas 1, 2, 3, 4 y 5.</i>	40
<i>Figura 3. 3: Gráfico de consumo de urea y formación de CaCO3 en la prueba 6.</i>	40
<i>Figura 3. 4: Gráfico de la cinética del test 1, 2, 3 y 4.</i>	43
<i>Figura 3. 5: Gráfico de la cinética del test 5 y 6.</i>	43

<i>Figura 3. 6: Fotografía de los cristales obtenidos en las pruebas 1, 2, 3, 4, 5 y 6.</i>	45
<i>Figura 4. 1: Influencia del proceso de curado en la arena fina.</i>	52
<i>Figura 4. 2: Influencia del proceso de curado en la arena gruesa.</i>	54
<i>Figura 4. 3: Influencia del proceso de curado en la mezcla 1.</i>	55
<i>Figura 4. 4: Influencia del proceso de curado en la mezcla 2.</i>	57
<i>Figura 4. 5: Influencia del proceso de compactación en la arena fina (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang).</i>	62
<i>Figura 4. 6: Influencia del proceso de compactación en la arena fina (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en agua destilada).</i>	62
<i>Figura 4. 7: Influencia del proceso de compactación en la arena gruesa (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang).</i>	63
<i>Figura 4. 8: Influencia del proceso de compactación en la arena gruesa (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en agua destilada).</i>	63
<i>Figura 4. 9: Influencia del proceso de compactación en la mezcla 1 (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang).</i>	64
<i>Figura 4. 10: Influencia del proceso de compactación en la mezcla 1 (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en agua destilada).</i>	65
<i>Figura 4. 11: Influencia del proceso de compactación en la mezcla 2 (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang).</i>	66
<i>Figura 4. 12: Influencia del proceso de compactación en la mezcla 2 (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en agua destilada).</i>	66
<i>Figura 6. 1: Comparativa de los resultados del ensayo de placa de carga de los suelos tipo M2.</i>	77
<i>Figura 6. 2: Comparativa de los resultados del ensayo de palca de carga de los suelos tipo SS.</i>	78
<i>Figura 7. 1: Altura crítica: ejemplo.</i>	85
<i>Figura 7. 2: Porosidad de la arena fina.</i>	85
<i>Figura 7. 3: Porosidad de la arena gruesa.</i>	86
<i>Figura 7. 4: Porosidad de la mezcla 1.</i>	87
<i>Figura 7. 5: Porosidad de la mezcla 2.</i>	88
<i>Figura 7. 6: Trayectoria del fluido en la arena fina.</i>	89
<i>Figura 7. 7: Trayectoria del fluido en la arena gruesa.</i>	90
<i>Figura 7. 8: Altura del nivel del agua en el cilindro superior de la mezcla 1.</i>	91
<i>Figura 7. 9: Altura del nivel del agua en el cilindro superior de la mezcla 2.</i>	92
<i>Figura 7. 10: Trayectoria del fluido en las direcciones axial y radial, M2 bioestabilizada.</i>	95
<i>Figura 7. 11: Trayectoria del fluido en las direcciones axial y radial, M2 control.</i>	96
<i>Figura 7. 12: Trayectoria del fluido en las direcciones axial y radial, SS bioestabilizada.</i>	97
<i>Figura 7. 13: Trayectoria del fluido en las direcciones axial y radial, SS control.</i>	98
<i>Figura 7. 14: Avance de fluido en el minutos 15 en las probetas M2 bioestabilizada y M2 control.</i>	99
<i>Figura 7. 15: Avance de fluido en el minuto 105 en las probetas M2 bioestabilizada y M2 control.</i>	99
<i>Figura 7. 16: Avance de fluido en 20 min en las probetas SS bioestabilizada y SS control.</i>	100
<i>Figura 7. 17: Avance de fluido en 105 min en las probetas SS bioestabilizada y SS control.</i>	101

<i>Figura 7. 18: Intensidad del avance de fluido en el vector 1, en las probetas M2 bioestabilizada y M2 control.</i>	102
<i>Figura 7. 19: Intensidad del avance de fluido en el vector 3, en las probetas M2 bioestabilizada y M2 control.</i>	103
<i>Figura 7. 20: Intensidad del avance de fluido en el vector 5, en las probetas M2 bioestabilizada y M2 control.</i>	103
<i>Figura 7. 21: Intensidad del avance de fluido en el vector 1, en las probetas SS bioestabilizada y SS control.</i>	104
<i>Figura 7. 22: Intensidad del avance de fluido en el vector 3, en las probetas SS bioestabilizada y SS control.</i>	105
<i>Figura 7. 23: Intensidad del avance de fluido en el vector 5, en las probetas SS bioestabilizada y SS control.</i>	105
<i>Figura A1. 1: Perlas de urea T3Q 5 kg.</i>	122
<i>Figura A1. 2: Cloruro de calcio di hidrato Riedel-de Haën 500 g.</i>	123
<i>Figura A1. 3: Lactato de calcio hidrato Sigma-Aldrich 500 g.</i>	124
<i>Figura A1. 4: Triptona Labkem 500 g.</i>	125
<i>Figura A1. 5: Extracto de levadura Labkem 500 g.</i>	126
<i>Figura A1. 6: Tricina Sigma-Aldrich 250 g.</i>	127
<i>Figura A1. 7: Sulfato de amonio Sigma-Aldrich 500 g.</i>	128
<i>Figura A1. 8: Ácido l-glutámico Sigma-Aldrich 100 g.</i>	129
<i>Figura A1. 9: O-ftalaldehído Alfa Aesar 10 g.</i>	129
<i>Figura A1. 10: Di-sodio tetraborato decahidratado para análisis 500 g.</i>	130
<i>Figura A1. 11: Ácido sulfúrico 96 % QP 1l ≈ 1,84 kg.</i>	131
<i>Figura A1. 12: Sporosarcina pasteurii (concentración 1x10⁸ – 1x10⁹ cfu/ml) con medio Bang.</i>	133
<i>Figura A1. 13: Medio Bang recomendado por UAB.</i>	133
<i>Figura A1. 14: Concentración de urea de 250 g/l.</i>	134
<i>Figura A1. 15: Concentración de cloruro cálcico 300 g/l.</i>	135
<i>Figura A1. 16: Concentración de lactato de calcio 54,5 g/l.</i>	136
<i>Figura A1. 17: Posición de las probetas utilizado.</i>	
<i>Figura A1. 18: Baño térmico con agitación utilizado.</i>	137
<i>Figura A1. 19: Proceso de filtración mediante un embudo Büchner conectado a un Kitasato y una bomba de vacío.</i>	139
<i>Figura A1. 20: Medidor de pH CRISON GLP21.</i>	140
<i>Figura A1. 21: Gráfico de consumo de urea y formación de CaCO₃ en la prueba 1.</i>	142
<i>Figura A1. 22: Gráfico de consumo de urea y formación de CaCO₃ en la prueba 2.</i>	143
<i>Figura A1. 23: Gráfico de consumo de urea y formación de CaCO₃ en la prueba 3.</i>	143
<i>Figura A1. 24: Gráfico de consumo de urea y formación de CaCO₃ en la prueba 4.</i>	144
<i>Figura A1. 25: Gráfico de consumo de urea y formación de CaCO₃ en la prueba 5.</i>	145
<i>Figura A1. 26: Gráfico de consumo de urea y formación de CaCO₃ en la prueba 6.</i>	145
<i>Figura A1. 27: Gráfico de la cinética del test 1.</i>	146
<i>Figura A1. 28: Gráfico de la cinética del test 2.</i>	146
<i>Figura A1. 29: Gráfico de la cinética del test 3.</i>	147
<i>Figura A1. 30: Gráfico de la cinética del test 4.</i>	147

<i>Figura A1. 31: Gráfico de la cinética del test 5.</i>	148
<i>Figura A1. 32: Gráfico de la cinética del test 6.</i>	148
<i>Figura A1. 33: Microscopio óptico OLYMPUS.</i>	149
<i>Figura A1. 34: Fotografía de los cristales obtenidos en la prueba 1.</i>	149
<i>Figura A1. 35: Fotografía de los cristales obtenidos en la prueba 2.</i>	150
<i>Figura A1. 36: Fotografía de los cristales obtenidos en la prueba 3.</i>	150
<i>Figura A1. 37: Fotografía de los cristales obtenidos en la prueba 4.</i>	151
<i>Figura A1. 38: Fotografía de los cristales obtenidos en la prueba 5.</i>	151
<i>Figura A1. 39: Fotografía de los cristales obtenidos en la prueba 6.</i>	152
<i>Figura B1. 1: Distribución granulométrica de los suelos arenosos.</i>	154
<i>Figura B1. 2: Distribución granulométrica de los suelos arcillosos.</i>	155
<i>Figura B1. 3: Tabla de las distintas relaciones entre la altura y el diámetro y el factor de corrección correspondiente.</i>	156
<i>Figura B1. 4: Sierra cinta.</i>	156
<i>Figura B1. 5a: Malla metálica y arandela, utilizadas en el ensayo; B1. 4b: Recipiente preparado con suelo.</i>	157
<i>Figura B1. 6: Posición de las varias probetas en el perfil cuadrado de aluminio.</i>	157
<i>Figura B1. 7: Proceso de desmoldar la probeta.</i>	162
<i>Figura B1. 8: Cilindro cortado verticalmente utilizado para desmoldar.</i>	162
<i>Figura B1. 9: Muestras desmoldadas.</i>	163
<i>Figura B1. 10: Muestras envueltas en film transparente antes de estar colocadas en el congelador.</i>	163
<i>Figura B1. 11: Instalación donde se realizaron los ensayos.</i>	164
<i>Figura B1. 12a: La probeta introducida dentro del equipo; B1. 12b: La probeta durante el ensayo.</i>	165
<i>Figura B2. 1: El mecanismo utilizado para compactar las probetas en el ensayo Proctor Modificado.</i>	175
<i>Figura B2. 2: Probetas fabricadas.</i>	182
<i>Figura B2. 3: Instantánea durante el proceso de desmoldado de probetas en la máquina de compresión.</i>	185
<i>Figura B2. 4a: La probeta dentro del cilindro cortado, situados horizontalmente. Figura B2 4b: El cilindro desmoldado.</i>	185
<i>Figura B2. 5: Las probetas desmoldadas.</i>	186
<i>Figura B2. 6: Una probeta durante el ensayo a compresión.</i>	187
<i>Figura C1. 1: Moldes cúbicos de 10 cm x 10 cm x 10 cm. Figura C1. 2: Probetas cúbicas realizadas.</i>	194
<i>Figura C1. 3a: Rejillas metálicas sólidas de ventilación; Figura C1. 3b: mallas de 75 μm de apertura utilizadas en las probetas cilíndricas.</i>	194
<i>Figura C1. 4: La rejilla metálica y la malla posicionadas dentro del molde cúbico.</i>	195
<i>Figura C1. 5: Probetas de M1 y M2 tratadas solo con agua corriente.</i>	195
<i>Figura C1. 6: Instantánea durante el proceso de desmoldado de las probetas.</i>	200
<i>Figura C1. 7: Ensayos de corte directo con actuador horizontal y con actuador vertical</i>	201
<i>Figura C1. 8: Ajuste sobre los resultados de las probetas SS-0. Datos en MPa.</i>	202
<i>Figura C1. 9: Ajuste sobre los resultados de las probetas CS-0. Datos en MPa.</i>	203

<i>Figura C1. 10: Ajuste sobre los resultados de las probetas M1-0. Datos en MPa.</i>	204
<i>Figura C1. 11: Ajuste sobre los resultados de las probetas M2-0. Datos en MPa.</i>	204
<i>Figura C1. 12: Ajuste sobre los resultados de las probetas SS-2. Datos en MPa.</i>	205
<i>Figura C1. 13: Ajuste sobre los resultados de las probetas SS-1. Datos en MPa.</i>	205
<i>Figura C1. 14: Ajuste sobre los resultados de las probetas CS-2. Datos en MPa.</i>	206
<i>Figura C1. 15: Ajuste sobre los resultados de las probetas CS-1. Datos en MPa.</i>	206
<i>Figura C1. 16: Ajuste sobre los resultados de las probetas M1-2. Datos en MPa.</i>	207
<i>Figura C1. 17: Ajuste sobre los resultados de las probetas M1-1. Datos en MPa.</i>	207
<i>Figura C1. 18: Ajuste sobre los resultados de las probetas M2-2. Datos en MPa.</i>	208
<i>Figura C1. 19: Ajuste sobre los resultados de las probetas M2-1. Datos en MPa.</i>	208
<i>Figura D1. 1: Distribución granulométrica de los suelos empleados en este ensayo.</i>	212
<i>Figura D1. 2a: Sistema del control del volumen de relleno; D1. 2b: Moldes utilizados en este ensayo.</i>	213
<i>Figura D1. 3a: Probetas de SS; D1. 3b: Probetas de M2.</i>	214
<i>Figura D1. 4: Método de pesar los moldes.</i>	216
<i>Figura D1. 5a: Sistema para la compactación de los suelos de arena; 5b: Sistema para la compactación de los suelos de mezcla 2.</i>	217
<i>Figura D1. 6a: Suspensión bacteriana diluida en medio Bang y el posterior riego en 4 horas; 6b: El suelo de M2 mezclado con la suspensión bacteriana diluida en medio Bang.</i>	217
<i>Figura D1. 7a: Placa de compactación de los suelos M2; 7b: Foco halógeno de 500W instalado.</i>	218
<i>Figura D1. 8: Placa de compactación colocada encima de M2 de control antes de la compactación.</i>	219
<i>Figura D1. 9: Instantánea durante el proceso de mezclado de arena fina bioestabilizada.</i>	220
<i>Figura D1. 10: Evolución de la velocidad de trasmisión para el demostrador M2 de control.</i>	221
<i>Figura D1. 11: Evolución de la velocidad de trasmisión para el demostrador SS de control.</i>	222
<i>Figura D1. 12: Sistema del ensayo.</i>	223
<i>Figura D1. 13: Gráfico de tensión-deflexión obtenido en el ensayo de palca de carga sobre un suelo tipo SS control.</i>	224
<i>Figura D1. 14: Gráfico de tensión-deflexión obtenido en el ensayo de palca de carga sobre un suelo tipo SS Bioestabilizado.</i>	224
<i>Figura D1. 15: Gráfico de tensión-deflexión obtenido en el ensayo de palca de carga sobre un suelo tipo M2 control.</i>	225
<i>Figura D1. 16: Gráfico de tensión-deflexión obtenido en el ensayo de palca de carga sobre un suelo tipo M2 bioestabilizado.</i>	225
<i>Figura E1. 1: Permeámetro modificado.</i>	230
<i>Figura E1. 2: El permeámetro modificado en el soporte vertical.</i>	230
<i>Figura E1. 3: Altura de la probeta (L), dividida en 1 cm.</i>	231
<i>Figura E2 1: El cubo con el agua, los goteros y la probeta desmoldada.</i>	239
<i>Figura E2 2: Posición de los goteros en la probeta.</i>	239
<i>Figura E2 3: Probeta M2 bioestabilizada y posición de los puntos.</i>	241
<i>Figura E2 4: Probeta M2 control y posición de los puntos.</i>	241
<i>Figura E2 5: Probeta SS bioestabilizada y posición de los puntos.</i>	242
<i>Figura E2 6: Probeta SS control y posición de los puntos.</i>	242

<i>Figura E2 7: La distancia en dirección axial y radial de la probeta M2 de control en el punto A1.</i>	243
<i>Figura E2 8: La distancia en dirección axial y radial tras 20 minutos en el mismo punto.</i>	244
<i>Figura E2 9: Puntos de contorno y medición de las componentes axial y radial de los puntos de contorno.</i>	251
<i>Figura E2 10: Posición de los vectores y colocación de los puntos en función del tiempo.</i>	252
<i>Figura E2 11: Avance del flujo en T1 de la probeta M2 bioestabilizada.</i>	257
<i>Figura E2 12: Avance del flujo en T2 de la probeta M2 bioestabilizada.</i>	257
<i>Figura E2 13: Avance del flujo en T3 de la probeta M2 bioestabilizada.</i>	257
<i>Figura E2 14: Avance del flujo en T4 de la probeta M2 bioestabilizada.</i>	258
<i>Figura E2 15: Avance del flujo en T1 de la probeta M2 control.</i>	263
<i>Figura E2 16: Avance del flujo en T2 de la probeta M2 control.</i>	263
<i>Figura E2 17: Avance del flujo en T3 de la probeta M2 control.</i>	263
<i>Figura E2 18: Avance del flujo en T4 de la probeta M2 control.</i>	264
<i>Figura E2 19: Avance del flujo en T1 de la probeta SS bioestabilizada.</i>	269
<i>Figura E2 20: Avance del flujo en T2 de la probeta SS bioestabilizada.</i>	269
<i>Figura E2 21: Avance del flujo en T3 de la probeta SS bioestabilizada.</i>	269
<i>Figura E2 22: Avance del flujo en T4 de la probeta SS bioestabilizada.</i>	270
<i>Figura E2 23: Avance del flujo en T1 de la probeta SS control.</i>	275
<i>Figura E2 24: Avance del flujo en T2 de la probeta SS control.</i>	275
<i>Figura E2 25: Avance del flujo en T3 de la probeta SS control.</i>	275
<i>Figura E2 26: Avance del flujo en T4 de la probeta SS control.</i>	276
<i>Figura E2 27: Intensidad del avance del fluido en vector 1, M2 bioestabilizada.</i>	278
<i>Figura E2 28: Intensidad del avance del fluido en vector 2, M2 bioestabilizada.</i>	279
<i>Figura E2 28: Intensidad del avance del fluido en vector 3, M2 bioestabilizada.</i>	279
<i>Figura E2 30: Intensidad del avance del fluido en vector 4, M2 bioestabilizada.</i>	280
<i>Figura E2 31: Intensidad del avance del fluido en vector 5, M2 bioestabilizada.</i>	280
<i>Figura E2 32: Intensidad del avance del fluido en vector 1, de M2 control.</i>	282
<i>Figura E2 33: Intensidad del avance del fluido en vector 2, de M2 control.</i>	283
<i>Figura E2 34: Intensidad del avance del fluido en vector 3, de M2 control.</i>	283
<i>Figura E2 35: Intensidad del avance del fluido en vector 4, de M2 control.</i>	284
<i>Figura E2 36: Intensidad del avance del fluido en vector 5, de M2 control.</i>	284
<i>Figura E2 37: Intensidad del avance del fluido en vector 1, de SS bioestabilizada.</i>	286
<i>Figura E2 38: Intensidad del avance del fluido en vector 2, de SS bioestabilizada.</i>	287
<i>Figura E2 39: Intensidad del avance del fluido en vector 3, de SS bioestabilizada.</i>	287
<i>Figura E2 40: Intensidad del avance del fluido en vector 5, de SS bioestabilizada.</i>	288
<i>Figura E2 41: Intensidad del avance del fluido en vector 5, de SS bioestabilizada.</i>	288
<i>Figura E2 42: Intensidad del avance del fluido en vector 1, de SS control.</i>	290
<i>Figura E2 43: Intensidad del avance del fluido en vector 2, de SS control.</i>	291
<i>Figura E2 44: Intensidad del avance del fluido en vector 3, de SS control.</i>	291
<i>Figura E2 45: Intensidad del avance del fluido en vector 4, de SS control.</i>	292
<i>Figura E2 46: Intensidad del avance del fluido en vector 5, de SS control.</i>	292

LISTADO DE TABLAS

<i>Tabla 5. 1: Resumen de resultados de los ensayos de corte directo.</i>	71
<i>Tabla 6. 1: Humedad relativa de los suelos en el momento de ensayo.</i>	79
<i>Tabla A1 1: Especificaciones del producto T3Q para 5 kg.</i>	122
<i>Tabla A1 2: Especificaciones del producto Riedel-de Haën 500 g.</i>	123
<i>Tabla A1 3: Especificaciones del producto Aldrich 500 g.</i>	124
<i>Tabla A1 4: Especificaciones del producto Triptona Labkem 500 g.</i>	125
<i>Tabla A1 5: Especificaciones del producto Extracto de levadura Labkem 500 g.</i>	126
<i>Tabla A1 6: Especificaciones del producto Tricina Sigma-Aldrich 250 g.</i>	127
<i>Tabla A1 7: Especificaciones del producto Sulfato de amonio Sigma-Aldrich 500 g.</i>	128
<i>Tabla A1 8: Especificaciones del producto Ácido l-glutámico Sigma-Aldrich 100 g.</i>	129
<i>Tabla A1 9: Especificaciones del producto O-ftalaldehído, 98 % Alfa Aesar 10 g.</i>	130
<i>Tabla A1 10: Especificaciones del producto Di-sodio tetraborato decahidratado para análisis 500 g.</i>	131
<i>Tabla A1 11: Especificaciones del producto Ácido sulfúrico 96 % QP 1l ≈ 1,84 kg.</i>	132
<i>Tabla A1 12: Tabla resumen de las cantidades del medio Bang.</i>	133
<i>Tabla A1 13: Condiciones de las pruebas a realizar.</i>	138
<i>Tabla A1 14: Tabla resumen de los contrastes de las pruebas.</i>	138
<i>Tabla A1 15: Reactivos necesarios para realizar la determinación de urea [1].</i>	139
<i>Tabla B1 1: Tabla con las cantidades máximas de agua que se pueden añadir a la probeta cilíndrica seca.</i>	159
<i>Tabla B1 2: Cantidad de agua a añadir en probetas cilíndricas húmedas para cada tipo de suelo hasta su escorrentía.</i>	159
<i>Tabla B1 3: Pruebas realizadas para determinar la influencia de los riegos enriquecidos.</i>	160
<i>Tabla B1 4: Tabla de las comparaciones entre pruebas.</i>	161
<i>Tabla B1 5: Resultados obtenidos en arena fina, SS.</i>	167
<i>Tabla B1 6: Resultados obtenidos en arena gruesa, CS.</i>	168
<i>Tabla B1 7: Resultados obtenidos en mezcla 1, M1.</i>	169
<i>Tabla B1 8: Resultados obtenidos en mezcla 2, M2.</i>	170
<i>Tabla B1 9: Resultados obtenidos de las probetas SS sometidas al ciclo hielo-deshielo.</i>	171
<i>Tabla B1 10: Resultados obtenidos de las probetas CS sometidas al ciclo hielo-deshielo.</i>	171
<i>Tabla B1 11: Resultados obtenidos de las probetas M1 sometidas al ciclo hielo-deshielo.</i>	172
<i>Tabla B1 12: Resultados obtenidos de las probetas M2 sometidas al ciclo hielo-deshielo.</i>	172
<i>Tabla B1 13: Influencia de las adiciones bacterianas (variación en % respecto las probetas de control) sobre la capacidad resistente a compresión después de un ciclo de hielo/deshielo. ..</i>	173
<i>Tabla B1 14: Procedimiento de curado óptimo para cada tipo de suelo.</i>	173
<i>Tabla B2 1: Listado de las probetas fabricadas en este ensayo.</i>	180
<i>Tabla B2 2: La humedad óptima de compactación de los 4 tipos de suelo.</i>	180
<i>Tabla B2 3: Concentración de bacterias añadida en los 4 tipos de suelo.</i>	181
<i>Tabla B2 4: Condiciones e intervalos de los riegos enriquecidos.</i>	182

<i>Tabla B2 5: Humedad real y humedad óptima de compactación de las probetas tratadas con urea, cloruro cálcico, diluidos en agua destilada.</i>	184
<i>Tabla B2 6: Humedad real y humedad óptima de compactación de las probetas tratadas con urea, cloruro cálcico, diluidos en medio Bang.</i>	184
<i>Tabla B2 7: Resultados para las probetas de arena fina (SS), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en agua destilada.</i>	188
<i>Tabla B2 8: Resultados para las probetas de arena gruesa (CS), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en agua destilada.</i>	188
<i>Tabla B2 9: Resultados para las probetas de mezcla 1 (M1), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en agua destilada.</i>	189
<i>Tabla B2 10: Resultados para las probetas de mezcla 2 (M2), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en agua destilada.</i>	189
<i>Tabla B2 11: Resultados para las probetas de arena fina (SS), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en medio Bang.</i>	190
<i>Tabla B2 12: Resultados para las probetas de arena gruesa (CS), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en medio Bang.</i>	190
<i>Tabla B2 13: Resultados para las probetas de mezcla 1 (M1), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en medio Bang.</i>	191
<i>Tabla B2 14: Resultados para la mezcla 2 (M2), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en medio Bang.</i>	191
<i>Tabla B2 15: Tabla resumen de los resultados obtenidos.</i>	192
<i>Tabla C1 1: Listado de las probetas fabricadas en este ensayo.</i>	198
<i>Tabla C1 2: Tabla con las cantidades máximas de agua que se pueden añadir a la probeta cúbica seca.</i>	198
<i>Tabla C1 3: Pruebas realizadas para determinar la influencia de la actividad bacteriana.</i>	199
<i>Tabla C1 4: Tratamiento: período entre el riego enriquecido para las probetas cúbicas.</i>	199
<i>Tabla C1 5: Resultados del ensayo de corte directo de las probetas SS-0.</i>	202
<i>Tabla C1 6: Resultados del ensayo de corte directo de las probetas CS-0.</i>	203
<i>Tabla C1 7: Resultados del ensayo de corte directo de las probetas M1-0.</i>	203
<i>Tabla C1 8: Resultados del ensayo de corte directo de las probetas M2-0.</i>	204
<i>Tabla C1 9: Resultados de las probetas SS-2.; Tabla C1 10: Resultados de las probetas SS-1.</i>	205
<i>Tabla C1 11: Resultados de las probetas CS-2; Tabla C1 12: Resultados de las probetas CS-1.</i>	206
<i>Tabla C1 13: Resultados de las probetas M1-2.; Tabla C1 14: Resultados de las probetas M1-1.</i>	207
<i>Tabla C1 15: Resultados de las probetas M2-2.; Tabla C1 16: Resultados de las probetas M2-1.</i>	208
<i>Tabla C1 17: Selección de la concentración de la adición bacteriana en función de la propiedad a mejorar.</i>	209
<i>Tabla D1 1: Tratamiento óptimo para cada tipo de suelo.</i>	215
<i>Tabla D1 2: Condiciones e intervalos de tratamiento para cada tipo de suelo.</i>	215
<i>Tabla D1 3: Humedades real y óptima de compactación de las probetas bioestabilizadas.</i>	220
<i>Tabla D1 4: Evolución del coeficiente de balasto a lo largo del ensayo de placa de carga.</i>	226

<i>Tabla E1 1: Listado de las probetas fabricadas en este ensayo.</i>	228
<i>Tabla E1 2: Trayectoria del fluido desplazado en el suelo, SS.</i>	232
<i>Tabla E1 3: Altura del nivel del agua en el cilindro superior, SS.</i>	233
<i>Tabla E1 4: Trayectoria del fluido desplazado en el suelo, CS.</i>	233
<i>Tabla E1 5: Altura del nivel del agua en el cilindro superior, CS.</i>	234
<i>Tabla E1 6: Altura del nivel del agua en el cilindro superior, M1.</i>	234
<i>Tabla E1 7: Altura del nivel del agua en el cilindro superior, M2.</i>	235
<i>Tabla E1 8: Porosidad de la arena fina.</i>	235
<i>Tabla E1 9: Porosidad de la arena gruesa.</i>	236
<i>Tabla E1 10: Porosidad de la mezcla 1.</i>	236
<i>Tabla E1 11: Porosidad de la mezcla 2.</i>	236
<i>Tabla E2 1: Tabla de los puntos seleccionados en las 4 probetas.</i>	240
<i>Tabla E2 2: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto A1.</i>	244
<i>Tabla E2 3: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto A2.</i>	244
<i>Tabla E2 4: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto A3.</i>	244
<i>Tabla E2 5: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto B1.</i>	244
<i>Tabla E2 6: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto B2.</i>	245
<i>Tabla E2 7: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto C1.</i>	245
<i>Tabla E2 8: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto C2.</i>	245
<i>Tabla E2 9: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto C3.</i>	245
<i>Tabla E2 10: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto D1.</i>	245
<i>Tabla E2 11: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto C3.</i>	245
<i>Tabla E2 12: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto A1.</i>	246
<i>Tabla E2 13: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto A2.</i>	246
<i>Tabla E2 14: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto A3.</i>	246
<i>Tabla E2 15: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto B1.</i>	246
<i>Tabla E2 16: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto B2.</i>	246
<i>Tabla E2 17: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto C1.</i>	246

<i>Tabla E2 18: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto C2.</i>	247
<i>Tabla E2 19: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto C3.</i>	247
<i>Tabla E2 20: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto D1.</i>	247
<i>Tabla E2 21: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto D2.</i>	247
<i>Tabla E2 22: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto A1.</i>	247
<i>Tabla E2 23: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto A2.</i>	247
<i>Tabla E2 24: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto A3.</i>	248
<i>Tabla E2 25: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto B1.</i>	248
<i>Tabla E2 26: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto B2.</i>	248
<i>Tabla E2 27: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto C1.</i>	248
<i>Tabla E2 28: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto C2.</i>	248
<i>Tabla E2 29: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto C3.</i>	248
<i>Tabla E2 30: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto D1.</i>	249
<i>Tabla E2 31: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto D2.</i>	249
<i>Tabla E2 32: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto A1.</i>	249
<i>Tabla E2 33: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto A2.</i>	249
<i>Tabla E2 34: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto A3.</i>	249
<i>Tabla E2 35: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto B1.</i>	249
<i>Tabla E2 36: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto B2.</i>	250
<i>Tabla E2 37: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto C1.</i>	250
<i>Tabla E2 38: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto C2.</i>	250
<i>Tabla E2 39: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto C3.</i>	250

<i>Tabla E2 40: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto D1.</i>	250
<i>Tabla E2 41: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto D2.</i>	250
<i>Tabla E2 42: Avance del flujo en 15 minutos de la probeta M2 bioestabilizada.</i>	253
<i>Tabla E2 43: Avance del flujo en 1 hora de la probeta M2 bioestabilizada.</i>	254
<i>Tabla E2 44: Avance del flujo en 2 horas de la probeta M2 bioestabilizada.</i>	255
<i>Tabla E2 45: Avance del flujo en 3 horas de la probeta M2 bioestabilizada.</i>	256
<i>Tabla E2 46: Avance del flujo en 20 minutos de la probeta M2 de control.</i>	259
<i>Tabla E2 47: Avance del flujo en 40 minutos de la probeta M2 de control.</i>	260
<i>Tabla E2 48: Avance del flujo en 1:15 h de la probeta M2 de control.</i>	261
<i>Tabla E2 49: Avance del flujo en 1:30 h de la probeta M2 de control.</i>	262
<i>Tabla E2 50: Avance del flujo en 20 minutos de la probeta SS bioestabilizada.</i>	265
<i>Tabla E2 51: Avance del flujo en 40 minutos de la probeta SS bioestabilizada.</i>	266
<i>Tabla E2 52: Avance del flujo en 1:30 h de la probeta SS bioestabilizada.</i>	267
<i>Tabla E2 53: Avance del flujo en 2:30 h de la probeta SS bioestabilizada.</i>	268
<i>Tabla E2 54: Avance del flujo en 15 minutos de la probeta SS control.</i>	271
<i>Tabla E2 55: Avance del flujo en 50 minutos de la probeta SS control.</i>	272
<i>Tabla E2 56: Avance del flujo en 1:15 h de la probeta SS control.</i>	273
<i>Tabla E2 57: Avance del flujo en 1:40 h de la probeta SS control.</i>	274
<i>Tabla E2 58: Intensidad del avance del fluido en vector 1, M2 bioestabilizada.</i>	277
<i>Tabla E2 59: Intensidad del avance del fluido en vector 2, M2 bioestabilizada.</i>	277
<i>Tabla E2 60: Intensidad del avance del fluido en vector 3, M2 bioestabilizada.</i>	277
<i>Tabla E2 61: Intensidad del avance del fluido en vector 4, M2 bioestabilizada.</i>	278
<i>Tabla E2 62: Intensidad del avance del fluido en vector 5, M2 bioestabilizada.</i>	278
<i>Tabla E2 63: Intensidad del avance del fluido en vector 1, M2 control.</i>	281
<i>Tabla E2 64: Intensidad del avance del fluido en vector 2, M2 control.</i>	281
<i>Tabla E2 65: Intensidad del avance del fluido en vector 3, M2 control.</i>	281
<i>Tabla E2 66: Intensidad del avance del fluido en vector 4, M2 control.</i>	282
<i>Tabla E2 67: Intensidad del avance del fluido en vector 5, M2 control.</i>	282
<i>Tabla E2 68: Intensidad del avance del fluido en vector 1, SS bioestabilizada.</i>	285
<i>Tabla E2 69: Intensidad del avance del fluido en vector 2, SS bioestabilizada.</i>	285
<i>Tabla E2 70: Intensidad del avance del fluido en vector 3, SS bioestabilizada.</i>	285
<i>Tabla E2 71: Intensidad del avance del fluido en vector 4, SS bioestabilizada.</i>	286
<i>Tabla E2 72: Intensidad del avance del fluido en vector 5, SS bioestabilizada.</i>	286
<i>Tabla E2 73: Intensidad del avance del fluido en vector 1, SS control.</i>	289
<i>Tabla E2 74: Intensidad del avance del fluido en vector 2, SS control.</i>	289
<i>Tabla E2 75: Intensidad del avance del fluido en vector 3, SS control.</i>	289
<i>Tabla E2 76: Intensidad del avance del fluido en vector 4, SS control.</i>	290
<i>Tabla E2 77: Intensidad del avance del fluido en vector 5, SS control.</i>	290

PUBLICACIONES

Ernest Bernat-Maso, Elitsa Teneva, Christian Escrig, Lluís Gil, “Ultrasound transmission method to assess raw earthen materials”, *Construction and Building Materials*, 2017.

Elitsa Teneva, Ernest Bernat-Maso, Lluís Gil, “Influence of compaction on mechanical properties of soils bioestabilized by *Sporosarcina pasteurii*”, en redacción.

Capítulo 1: Introducción y objetivos

1.1. Introducción.

Las técnicas de construcción con tierra datan de hace más de 9000 años. Éste material ha demostrado ser tan duradero que aún hoy en día existen construcciones de más de quinientos años. Algunos de los ejemplos más representativos son la Gran Muralla China que se construyó hace 4000 años; cimientos de tierra apisonada, encontrados en Asiria, que datan del 5000 a.C. y la Pirámide del Sol en Teotihuacán, México, construida entre los años 300 – 900. Todas las culturas antiguas utilizaron la tierra no solo en la construcción de viviendas sino también en fortalezas y obras religiosas [1].

En la técnica de construcción de carreteras, la tierra (o suelo como también será denominada en adelante) también es uno de los materiales más antiguos y más utilizados. Hace medio siglo, prácticamente todo valía para formar un relleno de una carretera o ferrocarril y cualquier procedimiento era admitido con tal de que fuera capaz de contribuir a conseguir el volumen proyectado. Los conocimientos en los suelos como materiales se ampliaron cuando la Mecánica de Suelo empezó a desarrollarse [2]. Dentro de las técnicas de construcción de explanadas, la estabilización de suelos se aproxima al ámbito de aplicación de la presente investigación.

En el pasado la humanidad ha tenido una estrecha relación con los materiales tradicionales (como la arena, la arcilla y la madera) y los sistemas constructivos correspondientes. Sus construcciones se han adaptado y desarrollado a los distintos climas y entornos del planeta. Aunque éste material ha mostrado ser tan duradero e importante en la antigüedad, en las últimas épocas se ha avanzado hacia una construcción con materiales y sistemas industrializados que contaminan el medio ambiente.

Sin embargo, actualmente la tierra está recuperando su valor como material de construcción, tanto en los países industrializados como en aquellos en vías de desarrollo aunque en cada uno de ellos por distintos motivos. Los países industrializados valoran algunas de sus propiedades como por ejemplo:

- Permite disminuir los costes notablemente, debido a que está al alcance de todos y a menudo no requiere transporte.
- Se puede reutilizar de forma ilimitada.
- Su uso ahorra energía y disminuye la contaminación ambiental respecto a las técnicas modernas.
- Garantiza un aislamiento tanto térmico como acústico muy por encima del ofrecido por los materiales convencionales.
- Regula la humedad ambiental, ya que tiene la capacidad de absorber y liberar humedad más rápido y en mayor cantidad que muchos otros materiales.

Capítulo 1. Introducción y objetivos

Por otro lado, en los países en vías de desarrollo, la construcción con tierra es una necesidad principalmente por el bajo coste de éste material.

La preocupación por la conservación del medio ambiente crece Incluso en la técnica de construcción de carreteras. La cada vez menor posibilidad de utilización de zonas para vertedero, al menos en determinadas regiones, recomienda por ello con frecuencia aprovechar al máximo posible los materiales disponibles. La estética de la carretera también es un aspecto que cada vez se tiene más en cuenta, obligando a controlar la erosión, a efectuar plantaciones y tender los taludes en determinados puntos por razones de estabilidad [2].

Por todo lo anterior, la tendencia en el sector de la construcción está cambiando y la investigación en éste sector sobre la tierra ha empezado a avanzar significativamente.

Una de las áreas en las que los ingenieros están investigando en la última década es la biotecnología. Siendo sostenible y respetuosa con el medio ambiente, permite estabilizar suelos y reparar estructuras minimizando el impacto ambiental.

Una dirección en la que se han centrado parte de las investigaciones en biotecnología aplicada a la construcción es la mineralización inducida biológicamente por precipitación de carbonato de calcio a través de la hidrólisis de urea (MICP). Debido a la actividad microbiana, este método permite una gran producción de carbonato en poco tiempo.

Profundizando en estos estudios, cabe destacar que las bacterias *Sporosarcina pasteurii* juegan un papel muy importante en la precipitación del carbonato cálcico, dado que hidrolizan mayor cantidad de urea en comparación con el resto de bacterias que precipitan CaCO_3 .

Se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre las propiedades físicas y bioquímicas de precipitación de CaCO_3 a través de *Sporosarcina pasteurii*. Sin embargo, todavía queda por profundizar en la estabilización de los diferentes tipos de suelos y el incremento de sus propiedades mecánicas mediante este método.

1.2. Objetivos.

El objetivo principal de la presente Tesis doctoral es optimizar la capacidad resistente de suelos granulares finos y suelos arcillosos y para conseguirlo se propone utilizar un tratamiento con precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP). Las bacterias que se utilizarían para inducir la precipitación de carbonato cálcico serían *Sporosarcina pasteurii*. Para realizar éste trabajo se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Recopilar información acerca de:
 - Las bacterias *Sporosarcina Pasteurii*, su ciclo vital, sus propiedades y los elementos que pueden influir en su rendimiento para la aplicación propuesta.
 - Los suelos que podrían ser considerados prioritarios para la bioestabilización y su distribución granulométrica.
 - La determinación de la humedad inicial, la humedad real y la humedad óptima de compactación de los diferentes tipos de suelo.

- Determinar los parámetros del cultivo en condiciones totalmente controladas y análisis de la influencia de las condiciones ambientales (temperatura, tipo de sustrato y cantidad de aportación de sustrato) sobre el crecimiento bacteriano.
- Determinar y tabular el tratamiento óptimo y los parámetros que muestran mayor influencia positiva en la capacidad resistente de cada tipo de suelo.
 - Análisis comparativo de la capacidad resistente a compresión uniaxial y a corte directo del suelo reforzado con tratamiento biológico y sin él.
- Estudiar la influencia de la precipitación bacteriana sobre la resistencia a compresión uniaxial y corte directo de los diferentes tipos de suelo.
 - Determinar la resistencia de compresión uniaxial de muestras de los suelos, tratadas con diferentes concentraciones de soluciones y bacterias.
 - Determinar la resistencia de corte directo de muestras de los suelos, tratadas con diferentes concentraciones bacterianas.
- Analizar la influencia del proceso de compactación sobre la resistencia a compresión uniaxial no confinada y la resistencia a placa de carga de los suelos reforzados con tratamiento biológico.
 - Determinar la humedad óptima de compactación en función del material obteniendo una ley analítica.
 - Determinar el volumen de inoculación de bacterias para cada tipo de suelo con diferentes tamaños de probetas obteniendo una ley analítica.
 - Analizar el proceso de compactación sobre probetas de mayores dimensiones.
- Estudiar la influencia del proceso de compactación sobre la permeabilidad de los diferentes tipos de suelo tratados con MICP.
 - Determinar la permeabilidad y la porosidad de los diferentes tipos de suelo y tabular los resultados.
 - Determinar el avance del flujo en direcciones axial y radial obteniendo una ley analítica.

1.3. Metodología de la investigación.

Para conseguir los objetivos anteriormente planteados, la metodología de investigación elegida ha sido:

- Para recopilar información:
 - Se revisaron los artículos relacionados de las revistas y congresos más relevantes acerca de la estabilización de suelos con bacterias *Sporosarcina pasteurii* a lo largo de la investigación.
- Para determinar los parámetros de cultivo más significativos para su reproducción:
 - Se seleccionaron los diferentes tipos de concentraciones para el medio, su cantidad y se prepararon las soluciones correspondientes.
 - Se realizaron diferentes pruebas sobre los factores que mostraron mayor influencia para el crecimiento de las bacterias. Para realizar el contraste entre pruebas, se llevaron a cabo ensayos sobre su cinética y posteriormente se analizaron las diferencias entre los resultados.
- Para determinar y tabular el tratamiento óptimo para cada tipo de suelo:

Capítulo 1. Introducción y objetivos

- Se crearon probetas de dos tipos: bioestabilizadas y sin aportar ningún tratamiento (control). Las probetas bioestabilizadas se realizaron con diferentes concentraciones, condiciones e intervalos de tratamiento.
- Se ensayaron las diferentes probetas, realizando dos tipos de ensayos: a compresión uniaxial (en moldes cilíndricos) y a corte directo (en moldes cúbicos).
- Se compararon los resultados obtenidos de las probetas bioestabilizadas y de control, en cada ensayo.
- Para estudiar la influencia de la precipitación bacteriana sobre la resistencia a compresión uniaxial y corte directo de los diferentes tipos de suelo:
 - Se realizaron probetas con diferentes concentraciones de soluciones y suspensiones bacterianas en moldes cilíndricos y posteriormente, su resistencia a compresión uniaxial fue ensayada.
 - Se realizaron probetas con diferentes concentraciones bacterianas en moldes cúbicos y posteriormente, su resistencia a cortante fue ensayada.
- Para analizar la influencia del proceso de compactación sobre la resistencia a compresión y a placa de carga de los suelos bioestabilizados:
 - Se realizaron probetas con diferentes grados de humedad pero con el mismo método de compactación.
 - Se calculó la correspondiente cantidad de bacterias que se debía aportar para cada tipo de suelo.
 - Se determinó la humedad óptima y el modo de compactación (antes o después de la aportación de las bacterias y los nutrientes) para probetas de mayores dimensiones.
- Para analizar la influencia del proceso de compactación sobre la permeabilidad de los suelos bioestabilizados:
 - Se montó un permeámetro de carga constante y se documentaron las pruebas mediante grabaciones.
 - Se calculó la porosidad de los diferentes tipos de suelo.
 - Se midió la penetración del fluido en las direcciones axial y radial, se calcularon sus vectores y se documentaron los resultados.

1.4. Descripción de los contenidos.

La presente tesis doctoral está organizada en ocho capítulos y seis anexos. A continuación se detallan cada uno de ellos:

Capítulo 1: Introducción y objetivos.

El primer capítulo resume los elementos introductorios de la presente tesis. Se incluyen los siguientes aspectos formales:

- Introducción.
- Objetivos.
- Metodología de la investigación.
- Descripción de los contenidos.

Capítulo 2: Estado del arte.

Resumen de la bibliografía actualizada más relevante en los temas concernientes al presente trabajo. Se han analizado publicaciones en forma de tesis doctorales, artículos de revistas y congresos y libros. También se ha revisado la normativa técnica asociada.

Capítulo 3: Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias en medio acuoso.

Estudio paramétrico del cultivo y la reproducción en medio acuoso de las bacterias (*Sporosarcina pasteurii*), seleccionadas para la estabilización de diferentes tipos de suelo.

Capítulo 4: Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión uniaxial.

Tras una introducción y una breve descripción (tratados en profundidad en el anexo B), se analizan los resultados y se presentan las conclusiones de sendos ensayos con probetas cilíndricas: En el primer experimento se pretendía obtener el tratamiento óptimo en función del tipo de suelo. Mientras que en segundo lugar se aprovechaban los resultados del primer ensayo para estudiar la influencia del método de compactación (antes o después) de realizar el tratamiento óptimo.

Capítulo 5: Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo.

Estudio de la influencia de la concentración bacteriana en la cohesión y el ángulo de fricción interna de las probetas sometidas a ensayos de corte directo y presentación de conclusiones (la casuística del ensayo se detalla en el anexo C).

Capítulo 6: Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probetas de suelo con el objetivo de determinar su capacidad portante.

Se presentan los resultados y se obtienen las conclusiones del ensayo de placa de carga (y de ultrasonidos, explicados detalladamente en el anexo D) de probetas que presentaban la particularidad de poseer mayores dimensiones que en los ensayos anteriores. El objetivo era validar la tecnología de bioconsolidación de suelos compactados mediante el método que se concluyó óptimo en la segunda parte del capítulo 4.

Capítulo 7: Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP).

Presentación de resultados y conclusiones de dos ensayos realizados con el objetivo de medir la influencia del método de compactación en la permeabilidad de los diferentes tipos de suelo. En el primer ensayo con probetas cilíndricas se determinó que, dado a las restricciones debidas a las dimensiones de los moldes no se podía caracterizar la distribución del carbonato cálcico generado durante el tratamiento. Por ésta razón se repitieron las pruebas con probetas de grandes dimensiones, en corte transversal.

Capítulo 8: Conclusiones y futuras investigaciones.

Capítulo 1. Introducción y objetivos

Finalmente se presentan las conclusiones del trabajo realizado poniéndolas en perspectiva del estado del arte actual y se presentan líneas de trabajo futuras en función de los resultados obtenidos.

Anexo A. Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias en medio acuoso.

Descripción pormenorizada del cálculo de concentraciones de los diferentes componentes de los nutrientes para optimizar el rendimiento de las bacterias. Presentación de los ensayos realizados para obtener la cantidad del carbonato cálcico, la cinética de la reacción de las bacterias y las tablas de resultados.

Anexo B. Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión.

Se detallan dos ensayos de resistencia a compresión con diferentes propósitos:

- En el primer ensayo se prueban diferentes tipos de tratamiento para obtener el óptimo en función de la composición de cada tipo de suelo.
- En el segundo ensayo se prueba la influencia de la compactación sobre los diferentes tipos de suelo utilizando el tratamiento óptimo hallado en el ensayo anterior.

Finalmente, se muestran las tablas de resultados.

Anexo C. Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo.

Para medir la cohesión y el ángulo de fricción interna de los diferentes tipos de suelo, se implementan probetas cúbicas y se someten a ensayos de corte directo. Se presentan asimismo los resultados obtenidos.

Anexo D. Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probeta de suelo con el objetivo de determinar su capacidad portante.

Para determinar la capacidad portante de los diferentes tipos de suelo sometidos a tratamiento, se crearon probetas de grandes dimensiones y se sometieron a ensayos de placa de carga. Todo el proceso está detallado y se presentan los resultados mediante gráficos y tablas.

Se presenta como novedad el ensayo mediante ultrasonidos que permite estimar con gran precisión la humedad en cada momento del suelo colocando los aparatos emisor y receptor paralelamente sobre la superficie.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP).

En primer lugar se realiza un ensayo inicial con probetas cilíndricas para medir la permeabilidad y la porosidad de los diferentes tipos de suelos tratados. Debido a las limitaciones impuestas por los moldes de las probetas, se decide ampliar el estudio creando

nuevas probetas de grandes dimensiones que permitan soslayar las restricciones anteriores. Los resultados son presentados en tablas y gráficos que facilitan la comprensión.

Capítulo 1. Introducción y objetivos

Capítulo 2: Estado del arte

2.1. El uso de la tierra como material de construcción de edificios.

La tierra es uno de los materiales más antiguos para la construcción y todavía es el más extensamente usado en muchos países. Más de una tercera parte de la población mundial vive en construcciones de adobe [3] (Figura 2. 1, [4]). La tierra, como material de construcción es barata, respetuosa con el medio ambiente y está disponible en abundancia. Ha sido utilizada en todo el mundo para la construcción de muros, y aún lo es de forma habitual en los países en vías de desarrollo. Además, las estructuras de tierra muestran un comportamiento muy satisfactorio bajo determinadas condiciones ambientales (reduce la contaminación ambiental, regula la humedad y la temperatura interior[5]) [6].

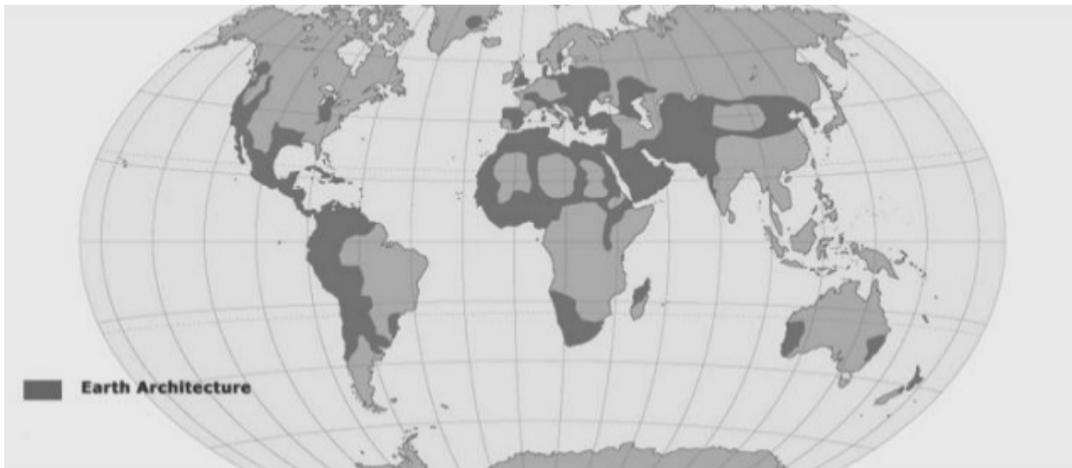


Figura 2. 1: Distribución global de las construcciones de tierra [4].

2.1.1. Técnicas de construcción con tierra.

Existen diferentes técnicas de construcción con tierra. Las tres técnicas más habituales son:

- La construcción con bloques de tierra denominados Adobe (Figura 2. 2, [7]): Las construcciones de adobe están hechas de bloques de barro creados a mano en moldes y secados al aire libre. Cuando la tierra húmeda se compacta en una prensa manual o mecánica se denominan bloques de tierra comprimida (BTC).
- La construcción con tierra apisonada denominada Tapial (Figura 2. 3, [8] [9]): Esta técnica consiste en rellenar un encofrado, normalmente de madera, con capas de tierra (los materiales varían en función de la disponibilidad) de 10 a 15 cm, compactando cada una de ellas con un pisón.
- Finalmente, a la construcción más artesanal se la denomina COB (Figura 2. 4, [10]): Es una técnica de construcción manual con arcilla, arena, paja y agua. Utilizada desde el

Capítulo 2. Estado del arte

periodo neolítico, que no necesita encofrados ni se ha de trabajar construyendo bloques. Simplemente se parte de unos buenos cimientos y se va añadiendo la mezcla conforme se va realizando.

La composición ideal para la producción de barro crudo para adobe y tapial debe tener entre el 15% y el 30% de arcilla para cohesionar el material y un 70% de arena o áridos más gruesos. Demasiada arcilla puede producir fisuras, mientras que una falta de ésta, produciría fragmentación por falta de cohesión. Con el ensayo de “la prueba de bolita” [11] se podría estimar la humedad del material después de añadir el agua. La tierra en el momento de la compactación o la preparación de los ladrillos debe encontrarse en estado húmedo (entre los estados seco y plástico). No es posible establecer un tiempo de secado exacto, ya que el proceso depende del clima y el flujo de aire [12].

El COB tiene tres elementos básicos: 60% de arena, que es el elemento resistente a la compresión en la mezcla; 40% de arcilla para conglomerar el material y fibra vegetal que sirve para aumentar la resistencia a la tracción. Es el método más artesanal, ya que todo se hace a mano pero el proceso se puede facilitar utilizando mezcladoras. Las paredes se levantan por capas ascendentes de alrededor de 30 cm. Los techos entrepisos se hacen comúnmente de madera, sin embargo el bambú está siendo muy estudiado, apreciado y utilizado actualmente como alternativa económica [13].

Las construcciones de tierra no necesitan grandes sistemas de calefacción o refrigeración, ya que aíslan mejor el frío y el calor exterior. No acumulan humedad, ya que el material es transpirable y los muros permiten la regulación natural de la humedad del interior de la casa de modo que se evitan las condensaciones.

La resistencia a la compresión de elementos de construcción secos, como por ejemplo bloques de tierra y tierra compactada varía generalmente de 5 a 50 kg/cm². Ésta depende no solo de la cantidad y tipo de arcilla sino también de la distribución granulométrica del limo, arena y agregados mayores así como del método de preparación y compactación.

La resistencia a la tracción del barro en estado plástico se denomina cohesividad. La cohesividad del barro depende del contenido de agua, arcilla y del tipo de minerales arcillosos. Sus valores fluctúan normalmente entre 25 y 500 g/cm².

La densidad de un suelo recientemente excavado es de 1200 a 1500 kg/m³. Si este suelo se compacta tal y como se realiza en técnicas de tapial o en bloques de suelo, su densidad aumenta de 1700 a 2200 kg/m³. Esta densidad, se define por la relación de la masa seca con respecto al volumen (incluyendo el volumen de los poros).

El grado de porosidad se define por el volumen de todos los poros del barro. Más importante que el volumen de los poros son las dimensiones de los mismos. Cuanto mayor sea la porosidad, mayor será la difusión de vapor y mayor será la resistencia a las heladas.

El módulo de elasticidad del barro varía normalmente entre 600 y 700 kg/mm² [1].



Figura 2. 2: Casas típicas de Adobe [7].



Figura 2. 3: Construcción de tierra apisonada Tapia [8] [9].



Figura 2. 4: Construcción de COB [10].

Capítulo 2. Estado del arte

La tierra como material de construcción es accesible y de bajo costo. Se caracteriza por sus componentes: arcilla, limo, arena y grava, que se definen por el tamaño de sus partículas. Las partículas con diámetros menores a 0.005 mm se denominan arcilla, entre 0,005 y 0,074 mm limo, entre 0,074 y 0,42 mm arena fina y entre 0,42 y 2 mm arena gruesa. Las partículas mayores se denominan gravas y piedras (Figura 2. 5, [14]).

La arcilla es producto de la erosión del feldespato y otros minerales y tiene capacidad aglutinante. Sin embargo el limo, la arena y la grava no tienen fuerza aglutinante y están formados a partir de rocas erosionadas.

El agua activa las fuerzas aglutinantes de la arcilla, que cambia de estado sólido a plástico. El porcentaje de la plasticidad de un suelo depende de la cantidad de arcilla y la distribución granulométrica del limo y la arena [1].

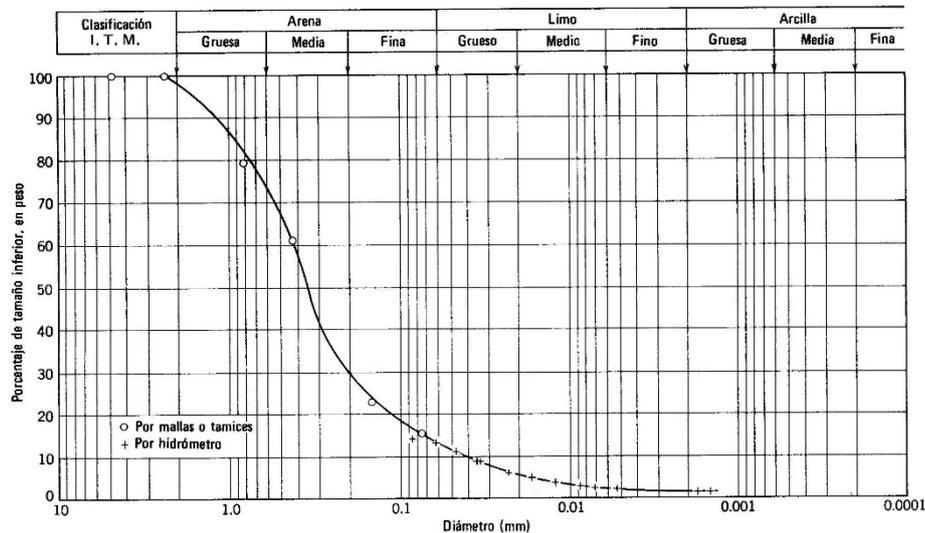


Figura 2. 5: Clasificación de las partículas por su tamaño [14].

Además de su bajo coste, la construcción con tierra ofrece excelentes propiedades en cuanto. Las principales razones del crecimiento del interés en la tierra como material de construcción moderno y sostenible en los últimos años son [15] [16]:

- El ahorro de energía de fabricación en comparación con los ladrillos de arcilla.
- La inferior necesidad de cemento en comparación con los bloques de hormigón.
- El ahorro en el transporte si el material proviene del mismo lugar de construcción.
- La apariencia natural y los colores que ayudan a los edificios a integrarse en el paisaje.
- Inercia térmica.
- Aislamiento acústico.
- Sostenibilidad ambiental.

Debido al creciente interés sobre este material, es esencial para la seguridad y su uso efectivo conocer mejor sus parámetros físico-mecánico-resistentes. Mousa F. Attom [17] investigó el efecto de la energía de compactación y cantidad óptima de agua en la compactación de tierra arcillosa durante la década de los 90. En los ensayos probó el efecto de

variar la cantidad de agua para buscar el estado óptimo. Llevó a cabo dos ensayos diferentes: compresión y permeabilidad. Para un estado más seco, la conclusión obtenida fue que si aumentaba la energía de compactación disminuía la permeabilidad y aumentaba la presión que ejerce la arcilla cuando absorbe agua, de la tierra compactada. Sin embargo, con un nivel de humedad óptima la resistencia de la tierra arcillosa aumentaba significativamente cuando se incrementaba la energía de compactación.

Posteriormente, Brendon Taylor [18] también realizó ensayos de compresión durante el 2006 para investigar el efecto de la humedad, las condiciones y el tiempo de secado y el contenido de arcilla en bloques de tierra. Una de las conclusiones a las que llegó es que cuando la cantidad de arcilla aumenta, también aumenta significativamente la resistencia a la compresión de los bloques. Por otro lado, incrementar el contenido de humedad inicial, no produce ningún efecto perceptible sobre la resistencia y la elasticidad. Sin embargo, al aumentar el tiempo de secado de los yesos de tierra se obtiene un incremento significativo del módulo de la elasticidad.

Posteriormente los estudios concernientes a la construcción con tierra se han centrado en dos temas concretos: las cantidades óptimas de agua y de arcilla en la mezcla.

En lo referente a la cantidad óptima de agua en la tierra, Matthew Hall (2009) [19] investigó las propiedades de la higrometría en bloques de tierra estabilizados y cómo sus parámetros (la permeabilidad de vapor, conductividad de líquidos, la conductividad térmica y la capacidad térmica) influían en el material. Comparó los resultados de tres mezclas diferentes de tierra en forma de bloques estabilizados y halló que la porosidad elevada del material aumentaba la permanencia de vapor. También dedujo que las propiedades higrométricas en la tierra se podían predecir manipulando la distribución del tamaño de las partículas y la energía de compactación. Y. Liang [20] (2012) investigó la influencia del contenido de agua y sus propiedades mecánicas al mezclar arcilla y escoria de acero. A través de ensayos de compresión, investigando la diferencia de tensión máxima, concluyó que con la cantidad adecuada de escoria de acero y de agua se podría obtener un material para su uso en construcción.

Existen muchos estudios realizados con Tapia y Adobe, pero los ensayos con bloques de tierra son escasos. Por esta razón, durante 2015 Mehmet Emiroglu [21] realizó ensayos de compresión con yesos de arcilla roja y amarilla mezclada con arena. Investigó la cantidad óptima de agua y la mezcla óptima de arcilla y arena de los yesos. De sus resultados se extrae que aumentando la cantidad de agua, las grietas en la mezcla disminuyen. Sin embargo una cantidad excesiva de agua reduce la resistencia a compresión.

2.1.2. Construcción con tierra armada

La tierra seca, gracias a la presencia de arcilla, ofrece una alta resistencia a la compresión. Tiene, sin embargo, escasa resistencia a la tracción. Los muros, que son los elementos estructurales más importantes de las construcciones de tierra, poseen buena capacidad resistente a cargas de gravedad y son estables frente al vuelco. Cuando ocurre un sismo se generan esfuerzos sísmicos de tracción que la tierra simple es incapaz de soportar. Los muros

se agrietan y se separan en pedazos que luego se caen, arrastrando consigo los techos (Figura 2. 6) [22].



Figura 2. 6: Casas de adobe destruidas [22].

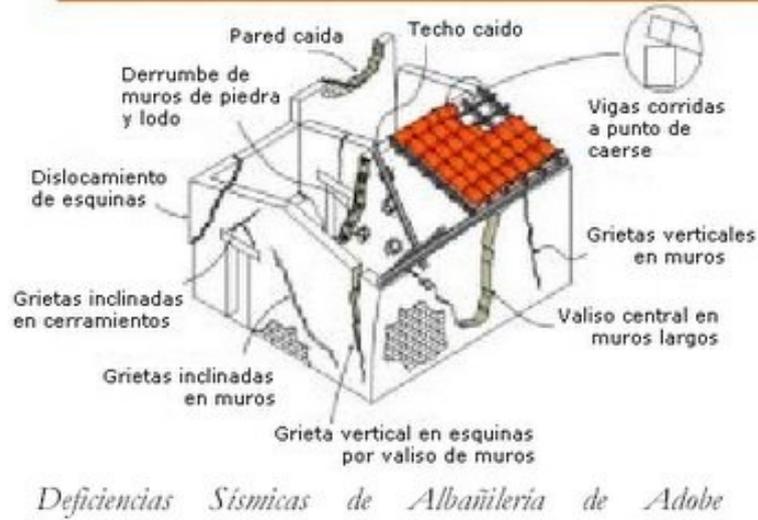
Es posible aumentar la resistencia sísmica de los muros si se refuerzan con materiales compatibles con la tierra. Unos de los materiales que se utilizan en la tierra armada son: cañas, sogas naturales, tubos de PVC y mallas plásticas. En la Pontificia Universidad Católica de Perú llevan 35 años ensayando el comportamiento sísmico de los muros. De los estudios realizados durante este periodo, se pueden sacar las siguientes conclusiones sobre el diseño:

- Las mallas exteriores colocadas en los muros, deben envolverlos completamente y estar unidas entre sí con sogas naturales o artificiales que atraviesen los muros.
- El diseño de edificaciones en tierra armada debe realizarse en muros anchos, poco esbeltos, plantas con habitaciones preferentemente cuadradas, con distribución simétrica y ventanas centradas y pequeñas.
- Las mallas de refuerzo deben ser de materiales compatibles con la mampostería de tierra y deben estar en los muros de manera que envuelvan todos los muros y los unan entre sí.

Posteriormente, durante 2003, en la PUCP se realizó otro estudio sobre el comportamiento sísmico de las construcciones de tierra [7]. La Figura 2. 7 muestra los modos típicos de falla durante un terremoto. A continuación se muestran los factores clave para mejorar las construcciones de Adobe y su resistencia:

- La cantidad de arcilla: genera la resistencia seca y causa la contracción por secado del suelo.
- Control de la microfisuración del mortero de barro debida a la contracción por secado: requerido para mejorar la resistencia de la albañilería de adobe. Paja y en una menor proporción arena gruesa son aditivos que controlan la mencionada microfisuración.
- Construcción: la calidad de la mano de obra es importante para obtener una albañilería de adobe fuerte, resultando en variaciones de resistencia globales del orden del 100%.

Daños comunes en vivienda rural



Deficiencias Sísmicas de Albañilería de Adobe

Figura 2. 7: Deficiencias Sísmicas de Albañilería de Adobe [7].

Dos de las tecnologías constructivas mejoradas son: el uso de refuerzo horizontal y vertical y el uso de contrafuertes y pilastras:

- Unos de los materiales que se utilizan para el refuerzo horizontal y vertical son caña (Figura 2. 8, [7]), bambú, parra, sogá y madera. El refuerzo vertical ayuda a mantener la integridad del muro fijándolo a la cimentación y a las vigas y restringe la flexión perpendicular al plano. El refuerzo horizontal ayuda a transmitir la flexión y las fuerzas de inercia en los muros transversales. Los refuerzos vertical y horizontal deberían estar unidos dado que proveen una matriz estable más fuerte que sus componentes individuales.

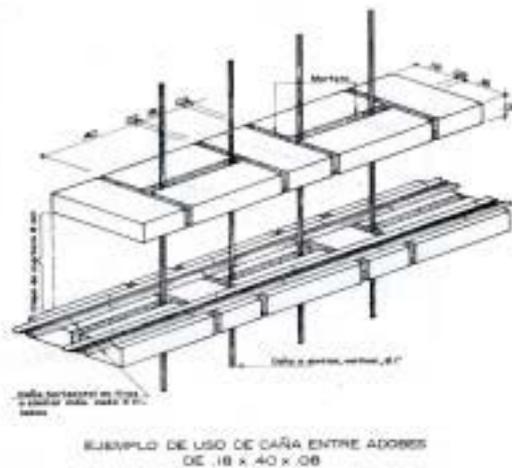


Figura 2. 8: Colocación del Refuerzo de Caña en Perú [7].

- Los contrafuertes y pilastras en las partes críticas (Figura 2. 9, [7]) aumentan la estabilidad y el esfuerzo resistente. Los contrafuertes actúan como soportes que pueden prevenir el

desplome del muro hacia el interior o el exterior. Los contrafuertes y las pilastras también mejoran la integración de los muros que se concentran en las esquinas.

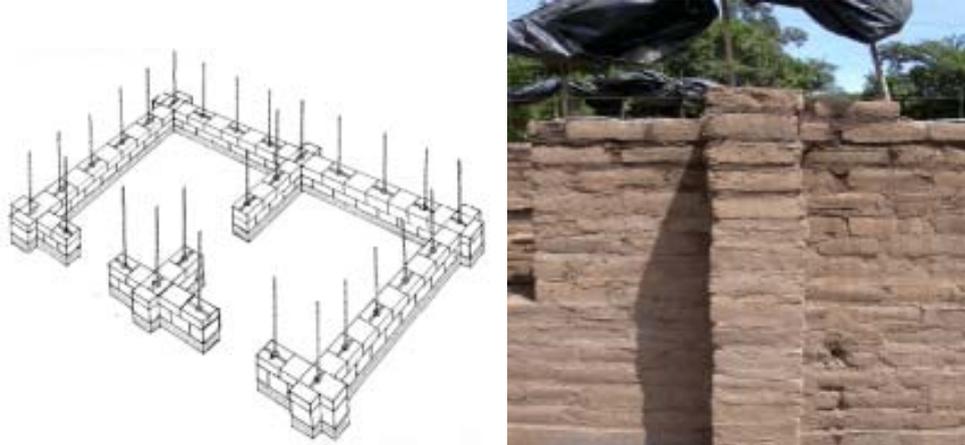


Figura 2. 9: Edificación de adobe con Contrafuertes y Pilastras [7].

La PUCP también realizó ensayos de simulación sísmica en muros con y sin refuerzos. Los ensayos dinámicos demostraron que el mejor refuerzo es la malla soldada eléctricamente, clavada mediante tapones metálicos de botella contra el Adobe.

2.2. Estabilización para la construcción de líneas ferroviarias y carreteras.

La tierra compactada también se utiliza en la construcción de líneas ferroviarias y carreteras. Los materiales usados se han ido modificando a lo largo del tiempo y se ha producido una evolución tecnológica de los materiales y de los sistemas de construcción específicos de firmes y pavimentos. También se han producido cambios: desde la nomenclatura de diversos materiales hasta la aplicación de técnicas innovadoras que ayudan a disminuir las temperaturas de fabricación y puesta en obra. Se ha mejorado la calidad de los áridos en las capas de rodadura y actualmente se fomenta la sostenibilidad y el respeto del medio ambiente mediante de la utilización de una serie de residuos, subproductos inertes y materiales reciclados. [23]

Para analizar los firmes y pavimentos se recurre al análisis de una sección transversal. El presente estudio se centrará en estabilización de la denominada: Explanada o capa de forma. Sin embargo para ello es necesario previamente explicar de forma genérica los elementos constructivos de este tipo de firmes y pavimentos.

2.2.1. Elementos constructivos.

Los elementos constructivos de la sección transversal ferroviaria y de las carreteras son los que se muestran en la Figura 2. 10 [24].

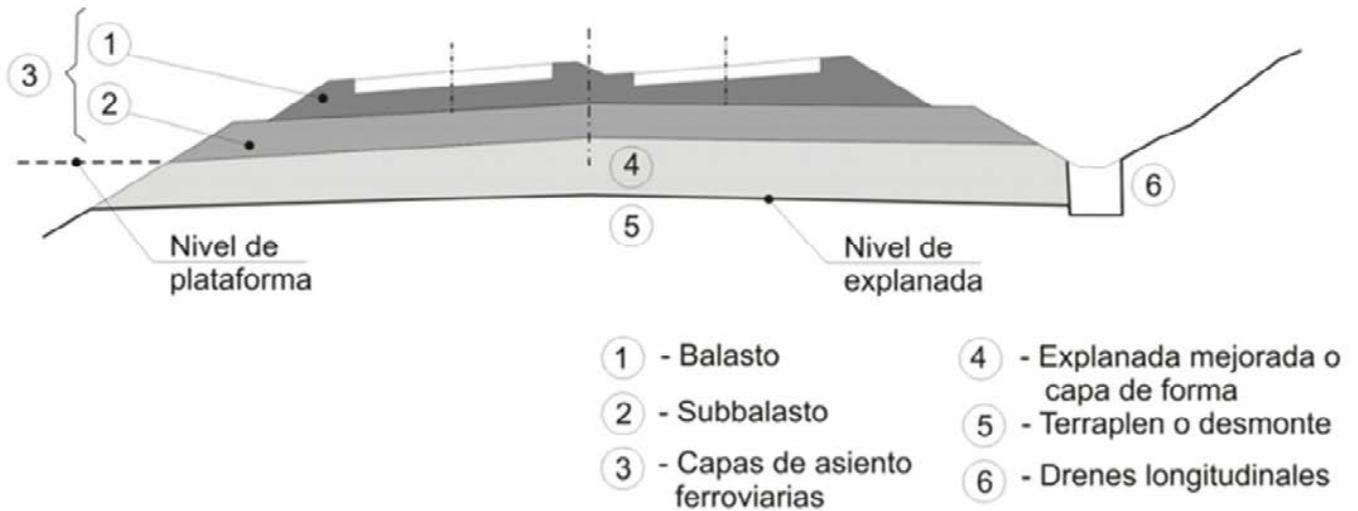


Figura 2. 10: Elementos constructivos de la sección transversal ferroviaria y de las carreteras [24].

La “explanada mejorada o capa de forma” (4) es la capa que se sobrepone para coronar la parte superior del terreno natural. Su función principal es mejorar la capacidad portante. Ha de ser compactable y de mejores características que las capas del nivel de terraplén/desmonte (capas inferiores). Para su preparación se utiliza tierra bien graduada. Un factor muy importante para mejorar las propiedades de la capa y de las estructuras geotécnicas en general (por ejemplo, la resistencia a la compresión del material), es la utilización de estabilizantes.

2.2.2. Materiales para la estabilización.

Los materiales que se utilizan para la estabilización son:

- Cales: conglomerantes constituidos principalmente por óxidos o hidróxidos de calcio que pueden contener magnesio y pocas cantidades de silicio, hierro y aluminio.
- Cementos: conglomerantes hidráulicos. Su componente principal es clínker (material granulado que se obtiene por la calcinación de caliza y arcilla) de cemento o clínker de cemento de aluminato (compuesto formado por la alúmina en combinación con ciertas bases) de calcio. Cuando se mezclan con agua forman pastas que endurecen. Son mecánicamente resistentes y estables al aire y bajo agua.
- Betunes asfálticos: ligantes (mezclas de diversas sustancias) hidrocarbonados que se obtienen a partir del crudo de petróleo o presentes en asfaltos naturales, que son casi o totalmente solubles en tolueno, y con viscosidad elevada a temperatura ambiente.
- Betunes modificados con polímeros: ligantes hidrocarbonados que han sido modificadas durante su fabricación, por el empleo de uno o más polímeros orgánicos.
- Emulsiones bituminosas: son las dispersiones de pequeñas partículas de un ligante hidrocarbonado y eventualmente un polímero, en una solución de agua y un agente emulsionante.

- Geotextiles: material textil plano, permeable y polimérico (sintético o natural), que se emplea en contacto con suelos u otros materiales en aplicaciones geotécnicas y de ingeniería civil.

Las condiciones climáticas, en particular la temperatura y la humedad, influyen de forma importante en las características resistentes de las mezclas tierra-aglomerantes. En [25] se investigaron las condiciones óptimas de temperatura, humedad y relación suelo-aglomerante para mezclas de loess colapsable y cementante. Los resultados obtenidos mostraron que el aumento del tiempo de curado provoca un incremento de resistencia. También se demostró que las temperaturas extremas de curado influyen significativamente en el proceso de hidratación del cemento. Las condiciones iniciales en el momento de la preparación del material influyen significativamente en la resistencia del nuevo material.

2.3. Estabilización de estructuras geotécnicas con aglomerantes.

Los aglomerantes tradicionales como el cemento y la cal han sido utilizados durante décadas para la estabilización de construcciones de tierra. Sin embargo, la comunidad de ingenieros geotécnicos sigue investigando en busca de nuevos materiales estabilizantes como alternativa donde los estabilizadores tradicionales no pueden aplicarse.

La búsqueda de nuevos aglomerantes se ha centrado en dos vertientes, en primer lugar, el uso de polímeros y en segundo lugar en el aprovechamiento de escorias para este cometido.

- Estabilización con polímeros: En las publicaciones consultadas [26] [27] [28] se investigó la efectividad de la tierra estabilizada con polímeros y su resistencia después de sumergir las probetas en agua, llevando a cabo ensayos de compresión. De los resultados se pudieron sacar las siguientes conclusiones:
 - Añadir polímero en las probetas de tierra aumenta su resistencia a la compresión.
 - Los polímeros naturales reducen la porosidad en la tierra.
 - El polímero líquido aumenta en mayor medida la resistencia a la compresión de la arcilla en comparación con la arena.
 - Sumergir en agua las probetas a las que se ha añadido polímero líquido aumenta su resistencia.
 - El material que mostró una mayor resistencia a la compresión se obtuvo cuando en la mezcla se añadió primero el agua y posteriormente el polímero.
- Estabilización con escoria. Pese a existir diferentes tipos de escoria. Los estudios se centran en la denominada escoria de horno [29] [30] [31] (sustancia de deshecho producto de la fundición de metales). Éste material está basado en varios compuestos como el aluminato de calcio y los óxidos de calcio y magnesio. Dichos compuestos muestran reactividad hidráulica, reaccionando entre ellos y con el entorno de forma que mezclados con tierra mejoran sus propiedades geotécnicas. A continuación se detallan las conclusiones más relevantes de los estudios de estabilización de tierra con escoria de horno de diferentes metales:
 - La escoria de horno se puede utilizar eficientemente para estabilización de tierra. Esto es debido a que las mezclas de escoria y tierra aumentan la resistencia del material.

- La escoria de horno es de muy fácil aplicación para la estabilización de tierra. Ha mostrado excelentes propiedades para la preparación de terraplenes, capas de forma, subbases y bases.
- La resistencia del material obtenido aumenta proporcionalmente con el tiempo de secado.
- La escoria de horno granulada muestra una mayor influencia en las características de compactación de la tierra y por lo tanto mejores propiedades que la escoria de horno oxigenada. Sin embargo, ésta última se muestra más efectiva al utilizarse en suelos con tendencia a la disgregación.

La estabilización de tierra exige una gran cantidad de pruebas de laboratorio hasta obtener la dosis de aglomerante óptima y alcanzar las mejores propiedades mecánicas e hidráulicas en las estructuras geotécnicas. En las referencias consultadas [32] [33] [34] [35], se realizaron ensayos de laboratorio para valorar las técnicas y las herramientas empleadas en el estudio de la estabilización de tierra.

Los ensayos de compresión se han utilizado en la mayoría de programas experimentales publicados en la literatura para comprobar la efectividad de la estabilización con cementos y de los factores que influyen al material. En los artículos [32] y [33] se realizaron ensayos de compresión para investigar la influencia de la cantidad del cemento en la tierra, la porosidad y la densidad de las muestras. Los resultados mostraron que:

- El contenido del cemento tiene gran efecto sobre la resistencia. La resistencia aumentó aproximadamente lineal con el aumento de la cantidad del cemento.
- La resistencia de compresión aumentó con la reducción en la porosidad en la mezcla compactada.
- La densidad de la arena tuvo menor efecto sobre aumentar la resistencia de compresión.

Además, la resistencia se relaciona con la permeabilidad, la cual a su vez define la conductividad hidráulica. En éste sentido, éste parámetro debe ser estudiado. En el artículo [34], la conductividad hidráulica de pavimentos permeables fue medida con el objetivo de evaluar su infiltración superficial. Éste estudio está basado en la ley de Darcy y fue elaborado desde dos puntos de vista: teórico y práctico. El estudio teórico se presentó a través de un tratamiento integrado de infiltración superficial de un pavimento permeable durante su diseño, construcción y mantenimiento. El práctico se expuso mediante los siguientes aspectos: coherencia entre las pruebas de laboratorio y campo, uniformidad en el conjunto de los datos obtenidos en las mediciones de prueba, racionalidad en el control de la calidad de la construcción, efectividad en la representación monitorizada de la infiltración superficial y capacidad mejorada para implementar una gestión de mantenimiento eficaz. Según los resultados obtenidos: La conductividad hidráulica, que está medida a base de la ecuación de Darcy, es una propiedad hidráulica fundamental para un material como el pavimento permeable. Su uso permite realizar un análisis riguroso de la superficie, seleccionar el material de cobertura y diseñar el grosor del pavimento con el objetivo de cumplir con el requisito para la utilización con agua pluvial.

Capítulo 2. Estado del arte

En el artículo [35] presentaron ensayos de laboratorio avanzados, modelos que utilizan códigos y computación para valorar las características mecánicas de la tierra estabilizada con cemento. Más concreto, estas técnicas pueden:

- Predecir el comportamiento mecánico de la tierra estabilizada a partir de los datos obtenidos en años anteriores, que ahorra tiempo en ensayos de laboratorio.
- Predecir el comportamiento mecánico de la tierra estabilizada a partir de parámetros básicos (tipo de tierra, estabilizante utilizado), que evita ensayos de laboratorio mecánicos.
- Incorporar unas herramientas innovadoras para estimar el módulo de resistencia a la compresión uniaxial (UCS), haciendo más económicas y sostenibles las soluciones geotécnicas.

Los resultados se presentaron solo por un tipo de aglomerante, pero la misma metodología se podría adaptar para otros materiales también. Se demostró cómo las técnicas de computación podrían utilizarse para predecir el comportamiento mecánico a tiempo cuando la base de datos histórica es disponible. Por último están presentadas unas herramientas innovadoras para el cálculo del módulo de diseño, basadas a los resultados convencionales de los ensayos de compresión.

2.4. Estabilización (biomineralización) de estructuras geotécnicas con bacterias.

Las construcciones de tierra sin estabilizantes son vulnerables frente al agua y los sismos, dando como resultado muy poca resistencia y durabilidad. Su poca utilización en África, Oriente Medio y el sudoeste Asiático se debe a las diferencias en los precios de los estabilizantes entre los países. En particular, los precios del cemento en estos países son extremadamente altos en comparación con la tendencia global de consumo de materiales (Figura 2. 11).

Continents	Countries	Cement price (USD/ton)	Continents	Countries	Cement price (USD/ton)
Africa	Niger	280	Asia	South Korea	68
	Kenya	190		China	57
	Mali	203		Japan	125
	Mozambique	160		India	98
	Nigeria	223		Pakistan	106
	Cameroon	200		Bangladesh	112
	Rwanda	200		Indonesia	125
	Morocco	150		Peru	202
Middle East	Egypt	65	America	United States	91
	Yemen	214	Russia	89	
	Afghanistan	91	Germany	93	
	Iraq	120	France	132	
	Kuwait	74	UK	102	

Figura 2. 11: Precios del cemento en los países [36].

Los estabilizantes para la construcción han sido extensamente utilizados en la tierra pero su producción también conlleva una generación de dióxido de carbono. El proceso de producción

de cemento, que es el aglomerante más universal en la construcción, es la fuente de alrededor del 5% de las emisiones de gases de efecto invernadero (CO₂) y por lo tanto su utilización ha sido restringida [36].

Por otro lado el uso de bacterias ha sido introducido como alternativa para la estabilización de tierra. La biotecnología microbiana es un área nueva en la ciencia y en la ingeniería. Posee aplicaciones en el campo de la medicina, la farmacia, la agricultura y la industria. Está basada en la actividad biológica de diferentes microorganismos. Es barata, sostenible y respetuosa con el medio ambiente. Los materiales como cementos bacterianos, lechadas, polisacáridos, y bioplásticos son utilizables en la construcción y la ingeniería geotécnica. La biotecnología microbiana tiene muchas ventajas en la construcción [37].

2.4.1 Microorganismos en la construcción microbiana.

Los organismos que se aplican más en la construcción son arqueas, bacterias, hongos y también otras especies animales y vegetales. En conjunto se representan como bacterias por su pequeño tamaño (0,5-10 µm) aunque científicamente no todas lo sean. Tienen gran diversidad e entornos compatibles (pH 2-10, temperaturas de -10 a 110 °C), gran espectro de reacciones bio-químicas y alto ritmo metabólico.

2.4.2 Materiales biotecnológicos microbianos.

Actualmente, se pueden diferenciar dos nuevas tendencias en la biotecnología microbiana aplicada a la construcción (Figura 2. 12):

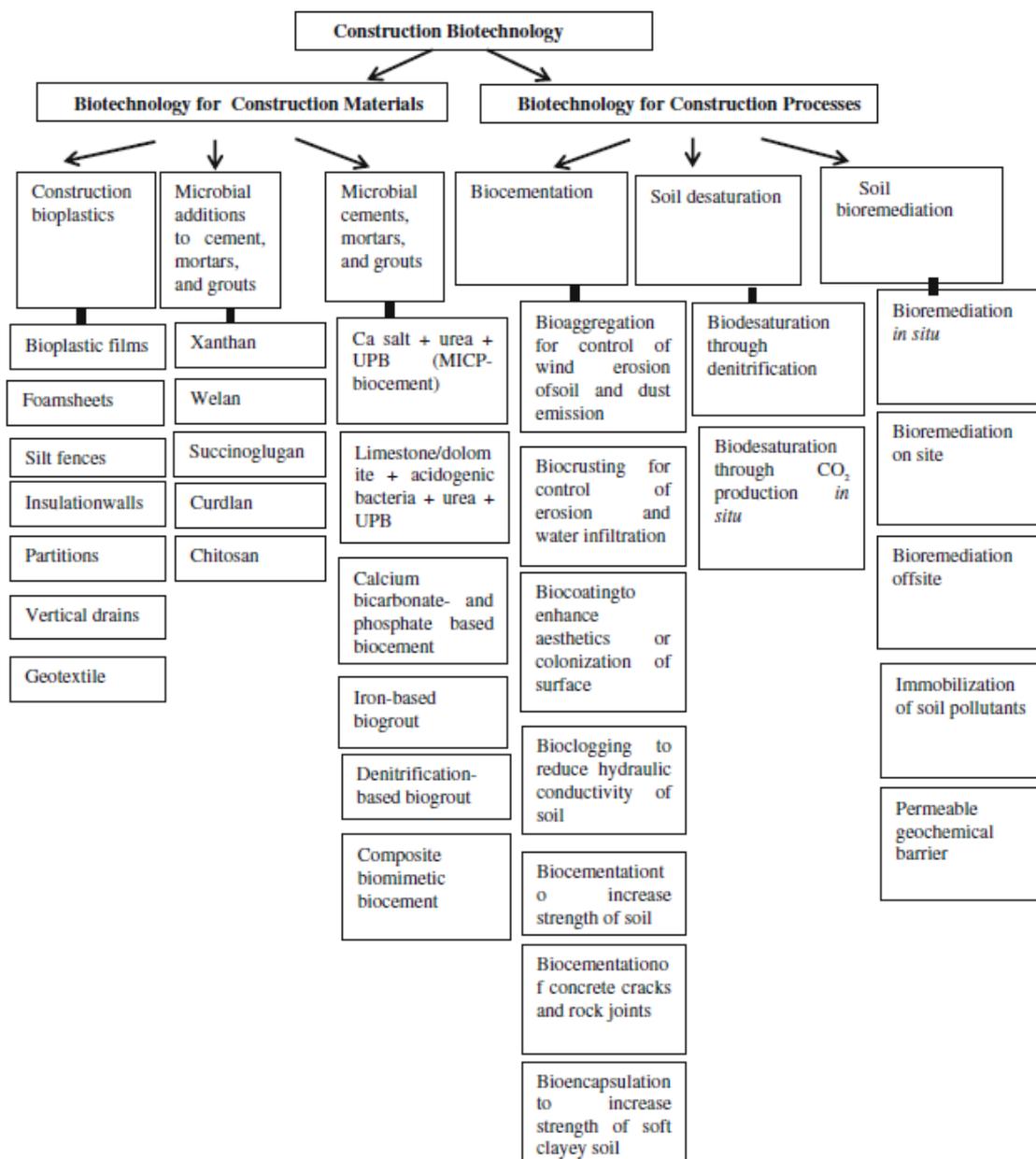


Figura 2. 12: Las direcciones de la biotecnología en la construcción [37].

- Producción microbiana de materiales de construcción.

Tipos de materiales utilizados en la construcción son:

- Biocementos.
- Polisacáridos microbianos que se añaden en morteros y cementos.
- Polisacáridos microbianos producidos in situ después de adición de células de bacterias y los nutrientes necesarios, que se usan para modificar las propiedades de la tierra.

- Aplicaciones de microorganismos en el proceso de construcción. Los procesos de construcción son resultado de un tratamiento biológico.

Los ocho procesos más importantes de los que existen son:

- Bio agregación (bioaggregation) de suelo o partículas – es un proceso que incrementa el tamaño de las partículas finas para reducir la erosión de la tierra debida al agua y al viento.
- Bio costra (biocrusting) de la superficie del suelo – es el proceso de formar una capa mineral u orgánica sobre la superficie de la tierra para reducir la emisión del polvo, la erosión y la infiltración de agua.
- Bio cubierta (biocoating) de una superficie sólida – es el proceso de formar una capa sobre una superficie sólida para mejorar la estética o la superficie.
- Bio rellenado (bioclogging) de suelo o matrices de poros – es el proceso de rellenar los poros o los canales en la tierra o la matriz para reducir su conductividad hidráulica.
- Bio cementación (biocementation) de suelo o partículas – es un proceso para aumentar significativamente la resistencia del suelo o las partículas.
- Bio desaturación (biodesaturation) de suelo – es un proceso que permite disminuir la saturación o la licuación del suelo a través de producción de biogás “in situ”.
- Bio encapsulado (bioencapsulation) de arcilla, partículas o suelo – es el proceso de aumentar la resistencia de una tierra arcillosa blanda formando una capsula alrededor de la tierra.
- Bio rehabilitación (bioremediation) de suelo – es el proceso de quitar o inmovilizar contaminantes en el suelo antes de utilizarlo en la construcción.

En la Figura 2. 13 se muestra la clasificación de los procesos de construcción según los resultados de sus aplicaciones.

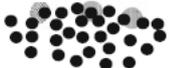
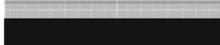
Soil particles before biotreatment	Type of biotreatment process	Soil particles (dark color shows soil particles) after biotreatment (grey color shows biocement)
	Bioaggregation of soil – increase of soil particles size so that soil erosion and dust emission will be reduced	
	Biocrusting – formation of crust on soil so that wind and water erosions, dust emission, and water infiltration will be reduced	
	Biocoating – formation of a layer on solid surface so that colonization or aesthetics of surface will be enhanced	
	Bioclogging – filling the pores and channels in soil so that hydraulic conductivity of soil will be significantly reduced	
	Biocementation – binding of the soil particles significantly increasing strength of soil	
 Water	Biodesaturation – production of biogas bubbles <i>in situ</i> to reduce saturation and liquefaction potential of soil	 Water Gas bubbles
 Clay ball/cylinder	Bioencapsulation - increase of the strength of soft clayey soil, saturated loose soil, quick sand, muck (drained swampland) soil	 Encapsulede lay ball/cylinder
 Soil with pollutant	Bioremediation - bioremoval from soil or bioimmobilization of the soil pollutant before construction	

Figura 2. 13: Los resultados de las biotecnologías en la construcción [37].

La contaminación ambiental y la diferencia en los precios de los estabilizantes son solo algunas de las razones por las que crece el interés sobre la biotecnología. Esta tecnología debe ser eficiente y respetuosa con el medio ambiente. El coste de la energía necesaria para la producción del cemento, representa entre el 20 y el 40% del coste total de la construcción; debido a que la temperatura necesaria para transformar la cal en Clinker de cemento es 950 °C. Nuevos materiales de construcción de biocementos microbianos se pueden producir con cal, dolomita o hierro a temperaturas entre 20 y 60 °C con menos del 10% de la energía utilizada para la producción del cemento. Otras ventajas que tienen los materiales microbianos son por ejemplo la sostenibilidad, menor viscosidad y menor riesgo de consecuencias negativas para el medio ambiente. Un factor muy importante es que el biocemento se produce con las mismas materias primas que el cemento.

Una clasificación de los biocementos en función de su composición sería:

- Carbonatos de bacteria heterotrófica.
- Biocementaciones basadas en hierro.
- Biocemento Eco eficiente, que utiliza materiales de desecho orgánicos.
- Precipitación de calcio y magnesio.
- Precipitación de calcio y fosfato.

- Precipitación de bicarbonato de calcio.
 - Precipitación de carbonato de calcio.
- El tipo más popular de biocemento está basado en la precipitación de carbonato de calcio. La precipitación está formada por minerales de carbonato de calcio en la superficie de las partículas. De esta manera, se crean cristales de calcita debido a la conversión de urea en ureasa mediante hidrólisis. Los cristales de carbonato de calcio forman puentes entre las partículas del suelo incrementando la resistencia compresiva del material [38].

En lo referente a las propiedades del biocemento, su caracterización y desarrollo requiere muchos ensayos y ha sido objeto de múltiples publicaciones [39] [40] [41] [42] [43]. Desde el efecto del tratamiento biológico, las técnicas y la influencia de las bacterias, hasta los problemas relacionados con la precipitación microbiana. A través de experimentos en laboratorio se demostraron las propiedades mecánicas (la elevada resistencia a la compresión) de muestras de mortero, bloques de tierra y diferentes mezclas de tierra, tratadas con bacterias que producían la precipitación de carbonato de calcio. Se investigó también el comportamiento de construcciones de tierra aplicando estos materiales (la energía de compactación, retención de agua, conductividad hidráulica y rigidez) con ensayos de compresión. Según los resultados obtenidos:

- Los vínculos organogénicos que crea la precipitación de carbonato aumenta la rigidez del material.
 - La cantidad de nutrientes y la disposición de los iones de calcio dependen de la riqueza de la tierra natural y del agua para la compactación.
 - Una baja cantidad de nutrientes es capaz de formar un vínculo entre las partículas pero no es suficiente para cambiar la microestructura de la arena.
 - La precipitación de calcita de las bacterias tiene lugar en los poros de la tierra y su tamaño es ligeramente superior al tamaño característico de las bacterias.
 - En caso de que el material contenga cemento, este tratamiento actúa como una capa que cubre la superficie, debido a la penetración limitada de la bacteria en los poros del material. Esto confirma que los mecanismos de transporte de la bacteria y de degradación del material están relacionados.
 - Todas las probetas mostraron un incremento del módulo de elasticidad (E) y la cohesión, que indica que el tratamiento es exitoso y que la rigidez de la arena aumenta.
 - El cambio de densidad en los poros de la tierra afecta a la retención de agua, lo que reduce su permeabilidad y aumenta la resistencia compresiva en los bloques tratados con microbios.
- Una aplicación novedosa del biocemento Eco eficiente es la reparación de grietas en el hormigón. Las grietas pequeñas así como las grandes pueden reducir su durabilidad. Al permitir la entrada de agua o sustancias químicas puede causar degradación o corrosión del material de refuerzo, por lo que no es recomendable. El mantenimiento manual y la reparación de la construcción de hormigón son caros y en algunos casos en particular, imposibles. Sin embargo, el mecanismo de auto reparación puede reducir el mantenimiento y aumentar la durabilidad del material. Este método consiste en mezclar bacterias y compuestos orgánicos para favorecer la precipitación de carbonato de calcio. El

mecanismo principal de este método supone que las bacterias actúan como catalizador, transformando el compuesto y convirtiéndolo en material apto de relleno. La precipitación de carbonato de calcio actúa como biocemento y sella las grietas. Para que el método sea efectivo las bacterias y el compuesto de biocemento deben ser integrados en material de matriz. En las publicaciones [44] [45] [46] [47] [48] [49] investigaron (con el fin de desarrollarlo) el mecanismo de auto reparación del hormigón. El método también se comparó con muestras sin bacterias mediante ensayos de permeabilidad de agua y técnicas microscópicas (Figura 2. 14). Se llevaron a cabo ensayos de transmisión de ultrasonidos y ciclo de "seco-mojado". Lo que los resultados muestran sobre el mecanismo es:

- La proporción de reparación en las muestras con bacterias es mayor que en las probetas sin bacterias.
- La permeabilidad del agua en las probetas con bacterias decrece en comparación con las probetas sin bacterias.
- El ciclo "seco-mojado" demostró que es el mejor método de incubación para probetas con bacterias. El agua destilada es un componente esencial para la auto reparación.
- La transmisión de ultrasonidos mostró incrementos en la velocidad del pulso ultrasónico, lo que indicó que la reparación se había realizado.
- Un examen visual de las grietas comprobó que las grietas estaban rellenadas por completo.



Figura 2. 14: Imágenes de microscopio de muestras tratadas con el mecanismo de auto reparación A: sin bacteria y B: con bacteria, antes y después del tratamiento [47].

2.5. Biomineralización de estructuras geotécnicas con carbonato de calcio y bacterias *Sporosarcina pasteurii*.

Los biominerales están en todas partes, a nuestro alrededor: los corales, las montañas, las cuevas, las conchas de moluscos, los dientes, los huesos y las rocas (Figura 2. 15). Este área está adquiriendo gran interés por parte de los investigadores en los últimos años [50].

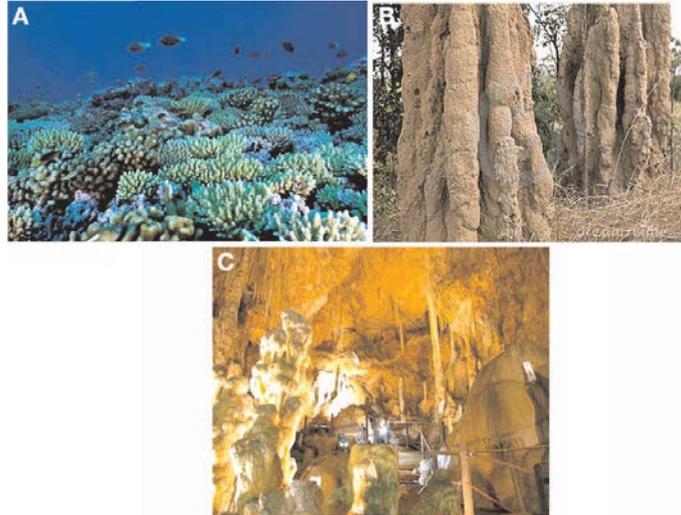


Figura 2. 15: Biomineralización de carbonato de calcio en las estructuras naturales A: corales, B: montañas de termitas C: cuevas de caliza [50].

La biomineralización es un proceso en el que los organismos producen minerales. La síntesis de minerales de los microorganismos procariontes en general está clasificada en dos categorías:

- Mineralización controlada biológicamente, donde los minerales están sintetizados directamente dentro de la célula en ciertas condiciones.
- Mineralización inducida biológicamente, donde los minerales están formados como resultado de la actividad metabólica del organismo.

La mineralización inducida biológicamente es resultado de la actividad de las bacterias y esto la convierte en la más extensamente estudiada. Los minerales que se forman incluyen Fe, Mn, y otros óxidos de metales, hematites (α -Fe₂O₃), sulfatos metálicos, fosfatos y carbonatos. De todos los minerales que se asocian con la biomineralización, los carbonatos son los más utilizados [50].

2.5.1 Un ejemplo de mineralización inducida biológicamente sería la precipitación de carbonato de calcio (CaCO₃).

Cuatro grupos de bacterias se implican en el proceso químico:

- Organismos fotosintéticos como cianobacterias y algas.
- Bacterias sulfato-reducidas. Son responsables de la reducción de sulfatos.
- Organismos que utilizan ácidos orgánicos.

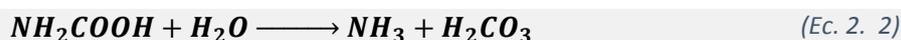
- Los organismos que están incluidos en el ciclo nitrogenado (la reducción de nitratos y la hidrólisis de urea).

El método más utilizado es la mineralización inducida biológicamente de precipitación de carbonato de calcio a través de la hidrólisis de urea.

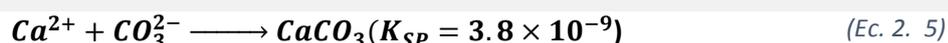
La urea es uno de los productos finales del metabolismo de los animales. Se produce en el hígado y el cuerpo la utiliza para desechar los compuestos nitrogenados. La urea se utiliza en muchos sectores de la industria para producir adhesivos, aglutinantes, selladores, resinas, rellenos, catalizadores, humectantes y agentes deshidratantes. Es una de las sustancias más solicitadas para analizar tanto de forma rutinaria como en situaciones de emergencia en todos los laboratorios. Los métodos para determinación de la urea tienen gran variedad y se investigan en todos los sectores [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57] [58].

2.5.2 Mineralización inducida biológicamente por precipitación de carbonato de calcio a través de la hidrólisis de urea.

Este método permite alta cantidad de producción de carbonato en poco tiempo. Durante la actividad de la ureasa microbiana en agua se hidroliza 1 mol de urea en 1 mol de amonio y 1 mol de ácido carbámico (Ec. 2. 1). De forma espontánea, el carbonato resultante anterior se hidroliza de nuevo en 1 mol de amonio y ácido carbónico (Ec. 2. 2).



Estos productos forman en el agua bicarbonato, 1 mol de amonio e iones de hidróxido, aumentando el pH (Ec. 2. 3) y (Ec. 2. 4). En la presencia del calcio disuelto se produce carbonato de calcio (Ec. 2. 5).



K_{SP} indica la solubilidad del compuesto iónico en la ecuación.

La precipitación de carbonato de calcio depende de cuatro procesos químicos en general:

- El carbono orgánico disuelto.

- El pH.
- La cantidad de nucleación.
- La concentración de calcio.

Los primeros tres parámetros están afectados de la hidrólisis de urea (la actividad de las bacterias) y la abundancia de las células bacterianas [59].

La superficie celular de las bacterias también tiene mucha importancia en la precipitación de calcio. Normalmente, la precipitación de carbonato de calcio se desarrolla en la superficie exterior de las células de las bacterias.

Las bacterias que precipitan carbonato de calcio a través de la urea incluyen: *Sporosarcina pasteurii*, *Pseudomonas sp.*, *Variovorax sp.*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Deleya halophila*, *Halomonas eurihalina* y *Muxococcus xanthus* [50].

La toxicidad de los metales tiene un papel muy importante en la degradación del sustrato microbiano. Los metales pesados pueden estimular, inhibir e incluso intoxicar la reacción bioquímica (dependiendo de su concentración). Los metales pesados con valencia cero no tienen actividad biológica. Sin embargo, los metales pesados ionizados pueden afectar la actividad en gran medida. Algunos metales pesados (como Fe, Zn, Ni, Cu, Co) pueden estimular el crecimiento de los microbios. En [60] se investigó el efecto de añadir éstos metales sobre el sustrato. En los resultados, todos los metales mostraron el efecto de estimular la degradación en concentraciones bajas del sustrato. La degradación aumentó en orden: Cd > Cu > Pb > Cr > Ni > Zn. En los resultados también se mostró que las concentraciones de Ni aumentan los niveles de solubilidad del calcio. Sin embargo los niveles de amonio y el pH bajan (Figura 2. 16).

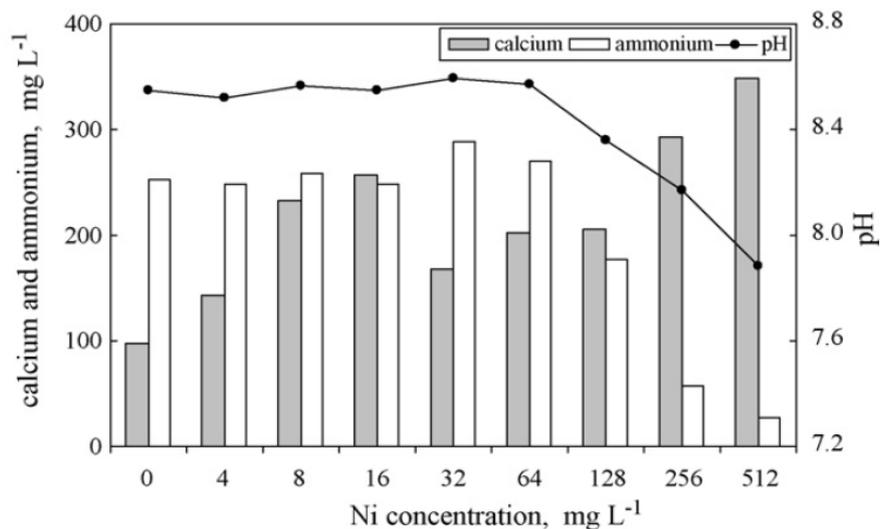


Figura 2. 16: Valores de amonio, calcio y pH en el final de incubación de las muestras con Ni [60].

En los artículos [61] y [62] también se investigó la actividad de ureasa en la precipitación de calcita y la influencia de la concentración de níquel. Se utilizó la bacteria *E. coli*, que contenía

plásmido para codificar los genes de la ureasa de *Sp. pasteurii*. La ureasa de *Sp. pasteurii* fue inmovilizada en Poliuretano. También realizaron un ensayo de Microscopio electrónico de Barrido. Los análisis mostraron que:

- Añadir una baja concentración de níquel aumenta significativamente la precipitación de calcita.
- La ureasa de *Sp. pasteurii* es heteropolimérica y contiene dos núcleos que son níquel-activos.
- El escaneo del microscopio electrónico identificó que la precipitación de calcita ocurre entre matrices de Poliuretano.
- La matriz de poliuretano inmoviliza la ureasa, reteniendo la actividad enzimática y la temperatura. Esta inmovilización también protege la actividad enzimática de los cambios ambientales.

Para llevar a cabo los estudios de crecimiento de cristales, se han desarrollado diferentes ensayos de caracterización mineralógica, mediante Microscopio electrónico de Barrido (SEM) y Microscopía electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM), junto con análisis químico por Espectroscopia de Energías dispersivas de Rayos X (EDX), así como difracción de Rayos X (XRD), espectrofotómetro de transformada de Fourier (FTIR) y microscopio óptico (Figura 2. 17^a y Figura 2. 17^b) [63].

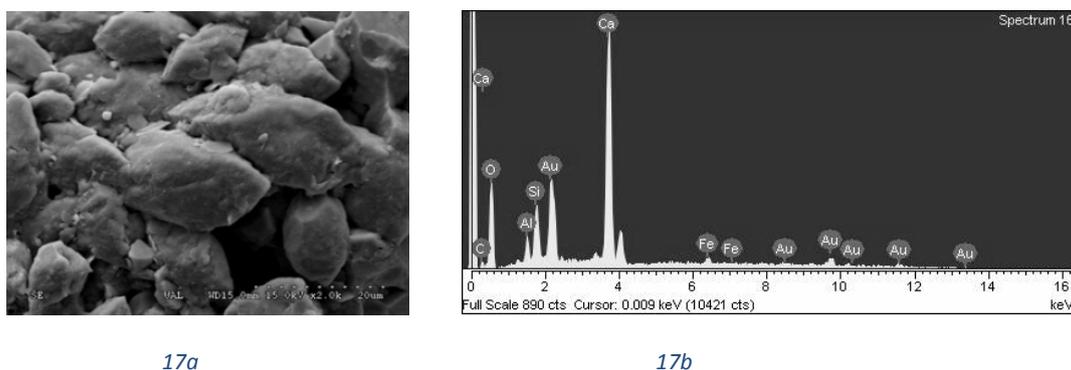


Figura 2. 17^a: Imagen obtenida con SEM (x2000), donde se observan cristales romboédricos de calcita.
Figura 2. 17^b: Análisis EDX obtenido para los cristales presentados en 17^a [63].

2.5.3 Mineralización inducida biológicamente de precipitación de carbonato de calcio a través de la hidrólisis de urea y *Sporosarcina pasteurii*.

El carbonato de calcio es un mineral en abundancia. Constituye alrededor del 4% de la corteza terrestre. Éste compuesto (CaCO_3) tiene tres polimorfos: calcita, aragonita, y vaterita. Entre estos tres la calcita tiene las mejores propiedades industriales y se utiliza en la fabricación de: papel, pintura, plástico y medicinas. En las aplicaciones industriales se requieren partículas precipitadas de nano carbonato de calcio con formas bien definidas y cristales semejantes. En [64] y [65] a través de microscopio electrónico de Barrido (SEM), difracción de Rayos X (XRD) y espectrofotómetro de transformada de Fourier (FTIR) se analizó

la producción de carbonato de calcio de varias bacterias y la precipitación de nano carbonato de calcio. Los ensayos comprobaron que:

- Las precipitaciones de carbonato de calcio de diferentes bacterias pueden aplicarse en la reparación de varios materiales.
- La nano calcita puede ser sintetizada en poco tiempo utilizando un reactor. El proceso es más eficiente y tiene un mejor ratio coste-beneficio que otros métodos convencionales.

Por otra parte, la bacteria *Sporosarcina pasteurii* es muy importante para la producción de ureasa y la precipitación de carbonato de calcio. Esta bacteria produce gran cantidad de ureasa y suficiente cantidad de amonio para mantener el pH alto en la precipitación. El pH alto y la actividad elevada de la enzima ureasa están relacionados con la producción de CaCO_3 . Por eso es fundamental entender cómo los diferentes tratamientos puedan afectar la producción de carbonato cálcico y la mineralización. En las publicaciones consultadas [66] y [67] se investigaron las propiedades físicas y bioquímicas de precipitación de CaCO_3 inducida a través de *Sporosarcina pasteurii*. A través de análisis de XRD y SEM se identificaron los cristales de carbonato cálcico como calcita y la bacteria en el centro de los cristales (Figura 2. 18). En ocasiones las bacterias pueden quedar rodeadas de cristal y permanecer en el centro.

Otros ensayos de laboratorio investigaron el efecto del cambio de los tratamientos (la concentración química, tiempo de retención de los reactivos y los índices mol/L/h). Se estudió la cinética de la ureasa de *Sp. pasteurii* para conocer mejor el proceso microbiológico (Figura 2. 19). De los resultados se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- Los estudios cinéticos indicaron que la actividad de la ureasa y su afinidad a urea incrementan significativamente cuando la precipitación de calcita es favorable. La precipitación de CaCO_3 está relacionada con el crecimiento de las células de las bacterias.
- La habilidad de la bacteria de hidrolizar urea y precipitar carbonato cálcico, a índices bajos (mol/L/h), empezó a declinar con el tiempo, incluso después de añadir los nutrientes para su crecimiento.
- El flujo periódico genera mayor distribución de la cementación y mejor control del tiempo de retención de las bacterias y las sustancias químicas.
- El análisis SEM de diferentes niveles de cementación con la misma cantidad de precipitación mostró que inyectar pocas concentraciones químicas de la media distribuye mejor la precipitación de calcita (particularmente en los niveles bajos de cementación).
- La precipitación de calcita y bacterias se puede utilizar para la reparación de grietas.

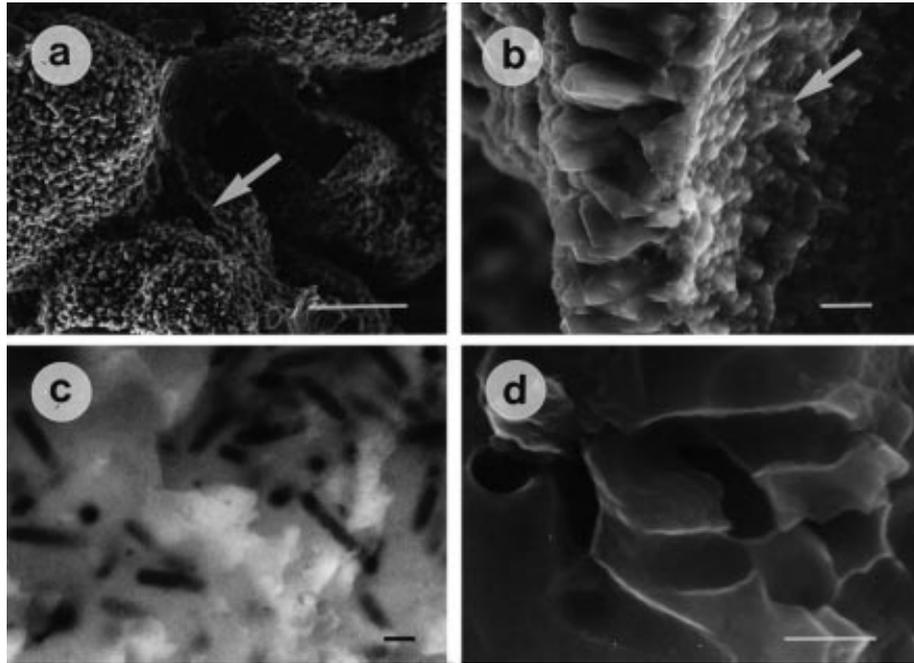


Figura 2. 18: Análisis de Microscopio electrónico de Barrido (SEM) muestra las bacterias insertadas en los cristales del material cementado de columnas de arena. A: Los cristales de calcita se han formado sobre las partículas de arena en la rotura de la columna. B: Formación de cristales, similares de los de imagen A. Los cristales en esta imagen son más distinguibles. C: *Sporosarcina pasteurii* dentro de los cristales de imagen B. D: Imagen C aumentada. Los túneles vasillos y las formas de esfera representan el espacio ocupado por las bacterias [66].

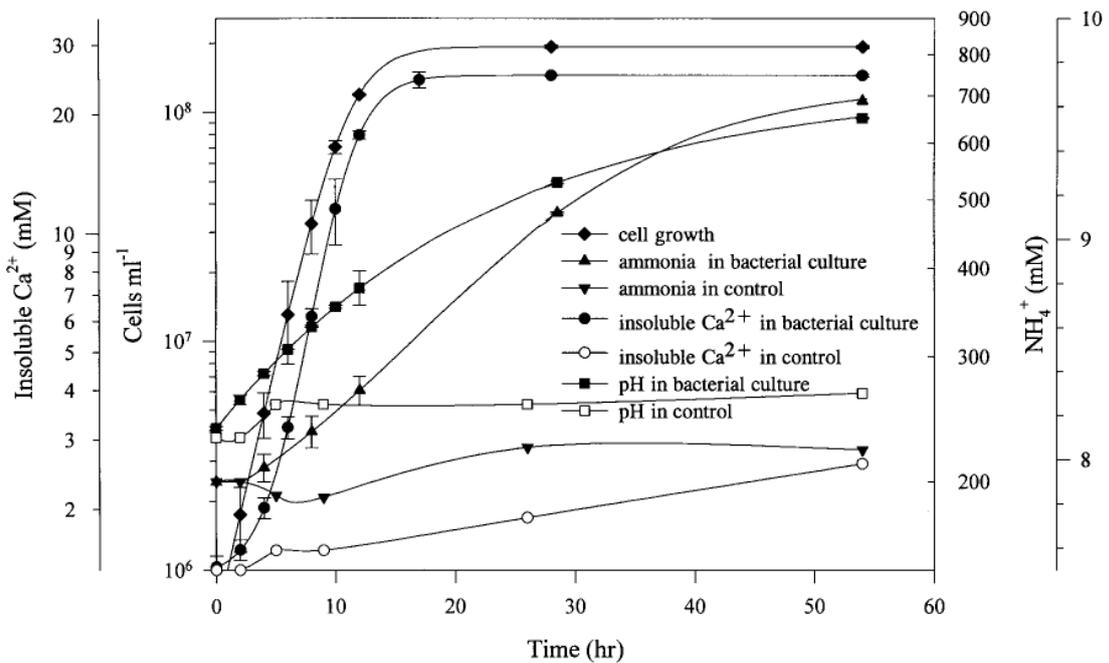


Figura 2. 19: Mineralización inducida biológicamente de precipitación de carbonato de calcio en presencia de *Sporosarcina pasteurii*. Los puntos representan los promedios de los ensayos y sus repeticiones [66].

La precipitación microbiana de CaCO_3 es un mecanismo complejo. Los estudios cinéticos indican que la precipitación de calcita es función de la concentración de las células, la fuerza iónica y el pH en el medio. Los microorganismos con carga negativa atraen cationes del ambiente (incluyendo Ca^{2+}) y los depositan de las superficies de sus células. Las ecuaciones (Ec. 2. 6) y (Ec. 2. 7) resumen reacciones bioquímicas posibles en el medio que precipitan CaCO_3 en la superficie de las células.



En [68], [69] y [70] se investigó la capacidad de reparar grietas en estructuras mediante la precipitación de carbonato de calcio y *Sporosarcina pasteurii*. Se investigó también su habilidad de formar una capa protectora de carbonato de calcio en la superficie de un material basado en cemento. A través de análisis XRD y SEM se investigaron la morfología de las partículas y la implicación de las bacterias en la precipitación de CaCO_3 . Se realizaron también ensayos de compresión de las muestras de cemento. Las conclusiones que se pueden obtener son:

- Desarrollar las bacterias *Sporosarcina pasteurii* a través de radiación UV es más eficaz que el uso de mutantes de otras bacterias; producen más cantidad de ureasa y calcita en comparación. La producción de sustancias poliméricas también es la más alta en comparación con otras bacterias.
- La actividad de las bacterias y el método de añadir Ca^{2+} y urea tienen gran efecto sobre las propiedades de la capa de carbonato de calcio.
- Añadir Ca^{2+} antes de la urea en la precipitación puede mejorar la resistencia de la superficie a la penetración de agua en la capa de carbonato de calcio.
- La resistencia a compresión de las muestras de cemento que contienen poca concentración de células vivas aumenta significativamente.
- La resistencia a compresión de las grietas reparadas con bacterias y arena es más alta en comparación con las grietas reparadas sin bacterias.
- Análisis de SEM, EDX y XRD mostraron la implicación directa de las bacterias en la producción de CaCO_3 .
- El análisis de microscopio electrónico (SEM) identificó que la precipitación de calcita ocurre en la superficie de las grietas.
- La mineralización de calcita a través de bacterias desarrolladas a través de radiación UV es altamente efectiva y es muy útil para reparar grietas y fisuras en todas las estructuras de construcción.

Las estructuras de hormigón suelen estar expuestas a la intemperie y a cambios climáticos durante años. Por esta razón, la aparición de grietas y fisuras es inevitable. La reparación de grietas a través de precipitación microbiana y sus propiedades para detener el deterioro debido a los cambios ambientales deben ser estudiadas y consideradas antes de utilizar este método por completo en la práctica. Una de las razones principales es que el pH se mantiene

extremadamente alto, incluso después del final del proceso de reparación (alrededor de 12,5). En la publicación [71] se investigó la reparación de grietas utilizando células de *Sporosarcina pasteurii* inmovilizadas en espuma de poliuretano. Las células inmovilizadas muestran índices más altos de la precipitación de calcita y la producción de amonio que las células libres.

En primer lugar, los índices de la precipitación de calcita y la producción de amonio de células inmovilizadas se compararon con los índices de la precipitación con células libres. En segundo lugar se cuantificaron los cambios en la fuerza de tracción y la elasticidad de la matriz del poliuretano. Por último se realizaron ensayos de compresión en muestras cúbicas con grietas simuladas y rellenas de la precipitación con poliuretano para mostrar la efectividad del método. Según los resultados:

- La calcita en poliuretano mostró poco efecto sobre el módulo de la elasticidad y la fuerza de tracción del poliuretano (Figura 2. 20). Sin embargo la resistencia de compresión de las muestras rellenas de la precipitación de células inmovilizadas incrementó significativamente.
- Análisis de SEM identificaron las células de *Sp. pasteurii* dentro de los cristales de calcita en las matrices del poliuretano (Figura 2. 21).
- La calcita forma parte de la precipitación y no es un material para reparar grietas dentro de las matrices.

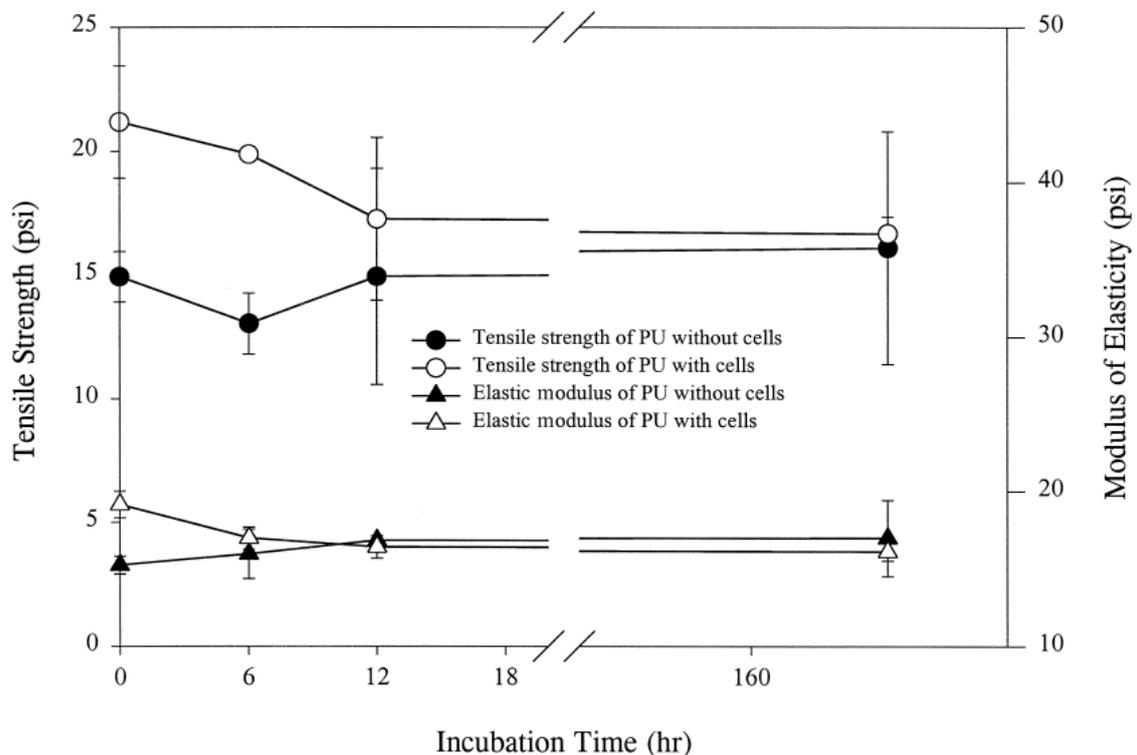


Figura 2. 20: Efectos de precipitación de calcita inducida microbiológicamente sobre el módulo de la elasticidad y la fuerza de tracción del poliuretano [71].

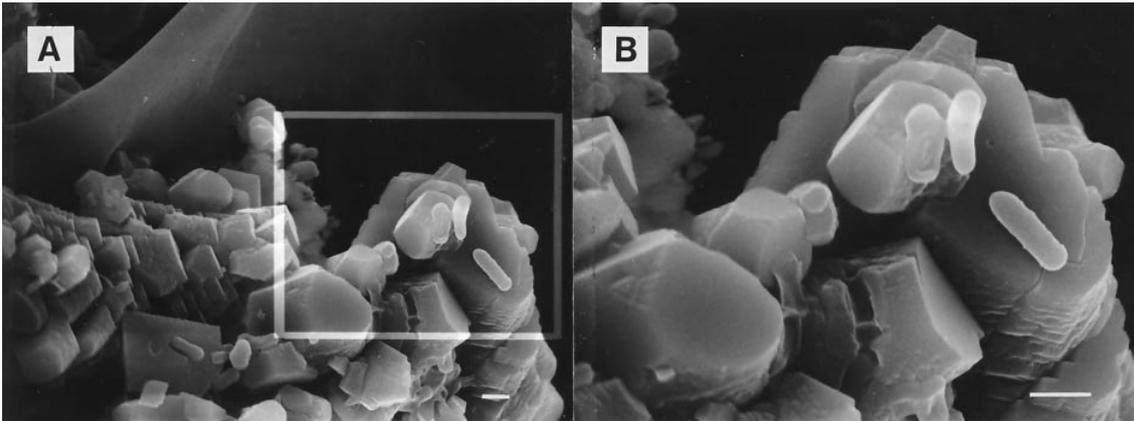


Figura 2. 21: Microscopio electrónico (SEM) de *Sporosarcina pasteurii* en precipitación de calcita y poliuretano [71].

2.6. Conclusiones

La tierra es uno de los materiales más antiguos y más utilizados en la construcción. El inicio de la utilización de bloques de adobe fecha de 8000 a. C. Actualmente, la tierra se sigue utilizando en la industria y la construcción y muchas personas siguen viviendo en construcciones de tierra. Sus buenas propiedades hacen que los ingenieros desarrollen nuevas técnicas de construcción y materiales para optimizar la estabilización.

En los últimos 10 años la biomineralización ha avanzado significativamente permitiendo estabilizar suelos minimizando el impacto ambiental siendo un método 100% natural que al mismo tiempo permite reducir los costes de producción. También destacan los resultados obtenidos reforzando las construcciones e incluso como forma de reparación de estructuras hechas con materiales convencionales. Sin embargo, debido a la todavía juventud de este campo de la construcción, la bibliografía sugiere múltiples aspectos en los que todavía se debería profundizar.

Algunos sectores en los que sería necesario ampliar las investigaciones referentes a las técnicas de construcción y a los métodos de estabilización serían:

- Profundizar en la tecnología constructiva y los materiales de refuerzo para aumentar la resistencia de las construcciones de tierra y mejorar su comportamiento sísmico.
- En los materiales estabilizados con aglomerantes:
 - Ampliando los conocimientos actuales en el área de los estabilizantes tradicionales y su refuerzo con fibras.
 - Continuando las investigaciones en la línea de la estabilización de construcciones de tierra con polímeros naturales.
- En los materiales estabilizados microbiológicamente se podrían ampliar los estudios actuales investigando:
 - Diferentes concentraciones de la precipitación microbiana y su efecto sobre las propiedades mecánicas de la tierra.

Capítulo 2. Estado del arte

- Incrementar el módulo de rigidez transversal para mejorar la durabilidad y la resistencia de la tierra a través del tratamiento químico.
- Aumentar la capacidad de soporte de un suelo para base y sub-base utilizando precipitación bacteriana.
- La durabilidad del tratamiento en diferentes condiciones.
- El comportamiento bioquímico de la ureasa a través de la actividad microbiana.
- Los tipos de suelo para saber cuáles son las más apropiadas para estabilización, puesto que la mayor parte de investigación se ha realizado en suelos normalizados e inertes.
- La utilización de la precipitación con diferentes polímeros para reparar grietas en estructuras de concreto.

Capítulo 3: Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias en medio acuoso

3.1. Introducción.

A continuación se presentarán los aspectos más relevantes de la precipitación de carbonato de calcio (MICP) durante el ciclo vital de la bacteria *Sporosarcina pasteurii*. Para establecer una relación entre los diferentes parámetros referentes a las bacterias y la MICP resultante de su ciclo vital se llevaron a cabo diversos estudios experimentales. Los factores estudiados fueron:

- Temperatura ambiental.
- Tipo de sustrato.
- Cantidad de sustrato.

Se describirán los materiales utilizados, su preparación y la configuración de las pruebas realizadas. Posteriormente, se presentan los resultados experimentales obtenidos y por último, se detallan las conclusiones que se extraen.

En el anexo A queda recogida información más detallada de estos estudios experimentales.

3.2. Preparación de las probetas.

En este ensayo se prepararon dos tipos de soluciones:

- Solución para la cementación de las probetas.
- Nutrientes para las bacterias *Sporosarcina pasteurii* (medio Bang)

Los materiales para preparar las diferentes soluciones fueron:

- Urea, cloruro de calcio di-hidrato y lactato de calcio hidrato para preparar la solución para la cementación de las probetas.
- El medio Bang se preparó a partir de los productos: triptona, extracto de levadura, tricina, sulfato de amonio y ácido l-glutámico. En el Anexo A se puede encontrar la descripción más detallada de los productos utilizados en el ensayo.

Las diferentes disoluciones se prepararon en condiciones de laboratorio:

- Las soluciones para la cementación de las probetas de urea, cloruro de calcio di-hidrato y lactato de calcio hidrato se prepararon de 250 g/L, 300 g/L y 54,5 g/L respectivamente.
- La suspensión de *Sporosarcina pasteurii* fue preparada por la Universidad Autónoma de Barcelona en dos flacones de 500 ml. Posteriormente, se preparó el medio Bang en un Erlenmayer de 2 L.

3.3. Procedimiento y configuración de los ensayos.

Mediante la realización de los siguientes 6 ensayos, se pretendía averiguar la cantidad que se obtiene de carbonato de calcio precipitado y el pH a lo largo del tiempo para cada una de las diferentes condiciones de cultivo:

1. La primera prueba se realizó con una concentración de bacterias entre 1.10E6 cfu/ml y 1.10E7 cfu/ml (baja concentración de bacterias), con una concentración de cloruro cálcico de 3,675 g/L, concentración de urea 20 g/L y en temperatura de 37 °C.
2. La segunda prueba se realizó con una concentración de bacterias entre 1.10E6 cfu/ml y 1.10E7 cfu/ml, con una concentración de lactato de calcio de 5,45 g/L, concentración de urea 20 g/L y en temperatura de 25 °C.
3. La tercera prueba se realizó con una concentración de bacterias entre 1.10E6 cfu/ml y 1.10E7 cfu/ml, con una concentración de cloruro cálcico de 3,675 g/L, concentración de urea 20 g/L y en temperatura de 25 °C.
4. La cuarta prueba se realizó con una concentración de bacterias entre 1.10E6 cfu/ml y 1.10E7 cfu/ml, con una concentración de cloruro cálcico de 367,5 g/L, concentración de urea 20 g/L y en temperatura de 25 °C.
5. La quinta prueba se realizó con una concentración de bacterias entre 1.10E8 cfu/ml y 1.10E9 cfu/ml (alta concentración de bacterias), con una concentración de cloruro cálcico de 3,675 g/L, concentración de urea 20 g/L y en temperatura de 25 °C.
6. La sexta y última prueba se realizó con una concentración de bacterias entre 1.10E8 cfu/ml y 1.10E9 cfu/ml, con una concentración de cloruro cálcico de 367,5 g/L, concentración de urea 20 g/L y en temperatura de 25 °C.

Una vez realizados los 6 ensayos, se contrastaron los resultados, determinando la cinética de las bacterias en los diferentes casos y comparando la influencia de los factores:

- 1 y 3: temperatura.
- 2 y 3: fuente de calcio.
- 4 y 3: concentración de calcio.
- 5 y 3: concentración de bacterias.
- 5 y 6: efecto de elevar la concentración de calcio cuando la de bacterias es alta.

3.3.1. Consumo de Urea

La cantidad de urea que consumían las bacterias se determinó de forma indirecta a través de la cantidad de carbonato de calcio formada. La producción de un mol carbonato cálcico equivale a un mol de urea consumida. El proceso se explica en el siguiente punto.

3.3.2. Carbonato de calcio precipitado.

La cantidad de carbonato de calcio precipitado se determinó a través de la filtración de los Erlenmeyers mediante un papel y una bomba en vacío. Este proceso permitió separar el carbonato de calcio del medio de la reacción y cuantificarlo, realizando a continuación una pesada indirecta del papel antes y después de la filtración. Ésta masa correspondía al carbonato cálcico y permitía determinar los moles producidos. Finalmente, habiendo sido

determinados los moles de carbonato de calcio, se podía calcular la urea consumida. En el Anexo A se puede encontrar una descripción más detallada del proceso.

3.3.3. PH.

La determinación del pH se realizó mediante un medidor de pH de forma directa. Para aumentar la exactitud de las medidas, previamente se calibró el equipo mediante unas disoluciones estándar con pH 4.01, posteriormente pH 7.01 y finalmente pH 10.01.

3.3.4. Cinética de la reacción.

La cinética enzimática de la reacción se obtuvo mediante el modelo de Michaelis-Menten, construyendo un gráfico de Lineweaver-Burk (doble gráfica recíproca). Éste gráfico permitió analizar la cinética de la ureasa en cada prueba, más detalladamente. En el anexo A se puede encontrar información más amplia acerca del modelo de Michaelis-Menten.

3.4. Resultados obtenidos de los ensayos.

A continuación se presentan los resultados obtenidos mediante las 6 pruebas realizadas. Los resultados se dividen en tres apartados diferenciados:

- Consumo de urea y formación de carbonato de calcio.
- Representación de la cinética de la reacción.
- Forma del carbonato cálcico obtenido.

3.4.1. Consumo de urea y formación de carbonato de calcio.

Los dos gráficos que se muestran en primer lugar, corresponden a los 5 primeros ensayos, pudiéndose apreciar en el primero el consumo de urea del compuesto a lo largo del tiempo y en el segundo el carbonato de calcio producido en función del tiempo.

El sexto ensayo se presenta independientemente del resto debido a que los resultados obtenidos son excesivamente diferentes para poder establecer una comparación.

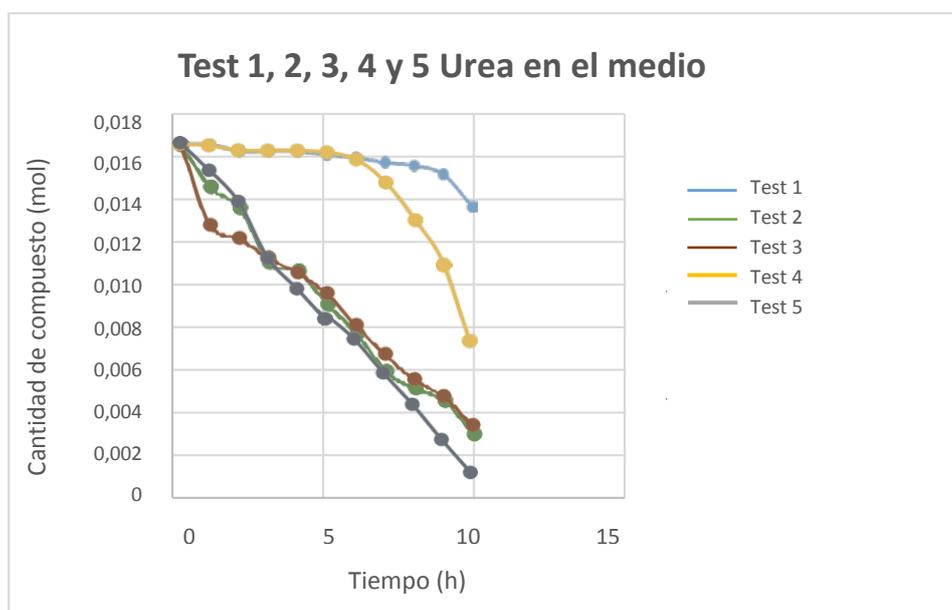


Figura 3. 1: Gráfico de consumo de urea en las pruebas 1, 2, 3, 4 y 5.

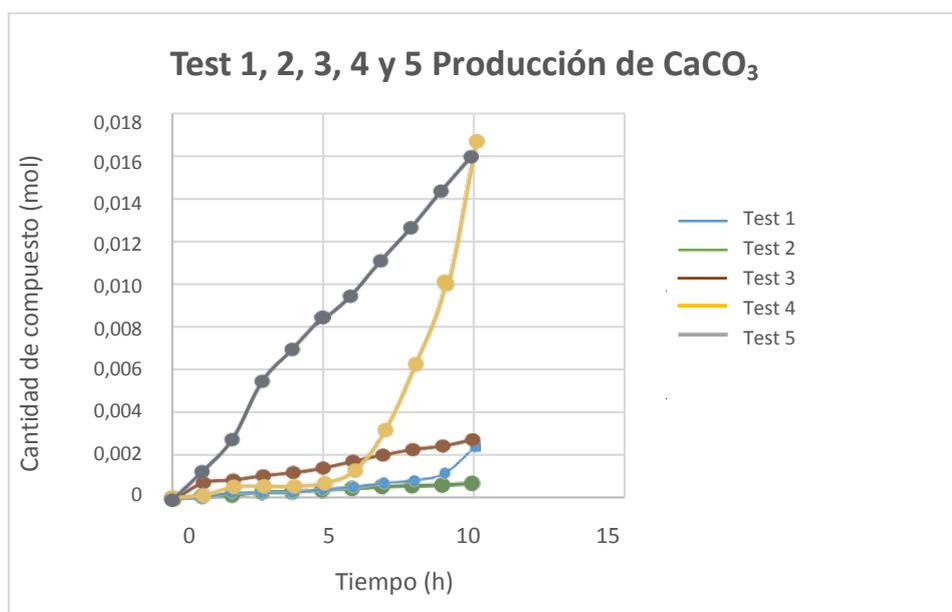


Figura 3. 2: Grafico de formación de CaCO_3 en las pruebas 1, 2, 3, 4 y 5.

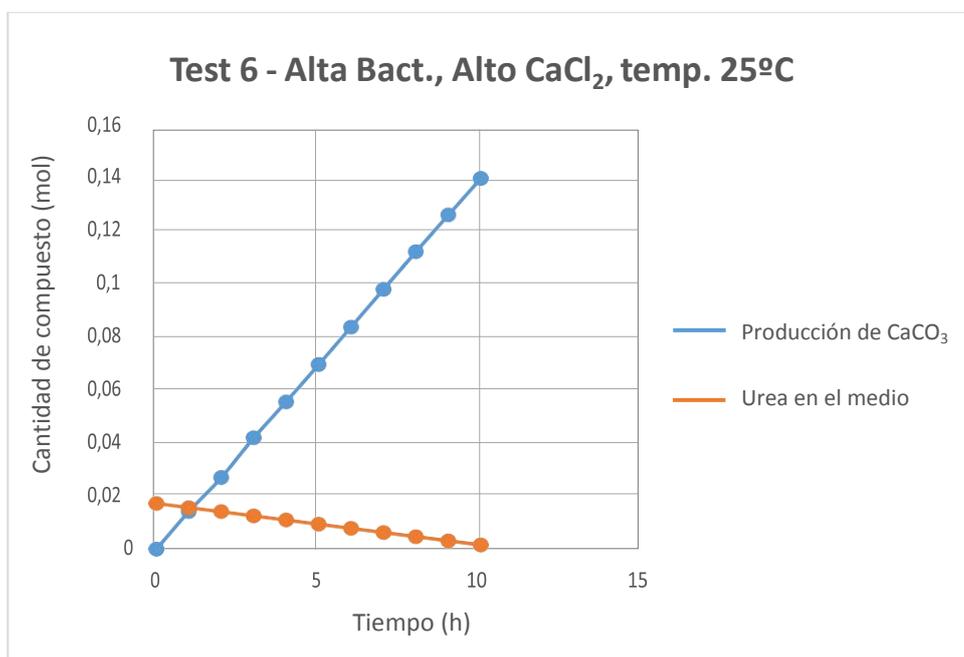


Figura 3. 3: Gráfico de consumo de urea y formación de CaCO_3 en la prueba 6.

En la Figura 3. 1 y Figura 3. 2 se muestra el resumen de los resultados obtenidos en los test del 1 al 5. El grafico en la Figura 3. 1 enseña la evolución de la urea en el medio durante 10 horas. Según el grafico, la velocidad del consumo de urea en el medio de las pruebas 1 y 4 es más lenta que la velocidad del consumo de las pruebas 2, 3 y 5. Esto se debe a una concentración menor de bacterias consumiendo la urea y produciendo enzimas.

El objetivo general de la prueba 1 era analizar la influencia de la temperatura. Comparando las pruebas 1 y 3, que se realizaron en las mismas condiciones pero con diferentes temperaturas (el test 1 se realizó con una temperatura de 37°C y el test 3 con una temperatura de 25°C dentro del baño térmico) se aprecia que las dos reacciones transcurren de forma gradual. Sin embargo la velocidad de la reacción en el test 3 es más rápida y en 10 horas la urea consumida es mayor que en el test 1. También se puede contrastar que durante la primera hora, en el test 3, existe un primer tramo donde la velocidad es más alta y por eso hay un consumo más alto de urea. De forma análoga al test 3 y por el mismo motivo, el consumo de urea en las pruebas 2 y 5 es más alto.

El gráfico en la Figura 3. 2 muestra la cantidad de carbonato cálcico producida en las pruebas 1, 2, 3, 4 y 5 a lo largo de 10 horas. En el gráfico se aprecia que en los test 4 y 5, la producción de carbonato de calcio es mayor. El resultado del test 4, en el que se utilizó una concentración de cloruro cálcico alta, muestra que uno de los factores más importantes es la concentración de iones de calcio. La velocidad de la reacción en las primeras 5 horas es lenta pero luego empieza a producirse carbonato cálcico de forma masiva. Tras las primeras 5 horas, el carbonato cálcico producido es mayor que el consumo de urea en el medio.

La cantidad del carbonato cálcico producido en el test 5 es similar a la del test 4, sin embargo, la velocidad de la reacción es mayor y permanece constante durante todo el ensayo. La notable diferencia en la evolución del ensayo 5, puede deberse a la alta concentración de bacterias, dado que ésta consume mayor cantidad de urea en el medio y como resultado del proceso se producen más iones de CO₃²⁻.

En las pruebas 1, 2 y 3 la producción del CaCO₃ es menor que en las pruebas 4 y 5. La velocidad de las reacciones en los tres primeros ensayos es baja:

- En el test 1, el incremento de la velocidad se aprecia a partir de las 8 horas, posiblemente debido a la alta temperatura. El tamaño de los cristales de CaCO₃ es inversamente proporcional a esta última, por lo que la cantidad de cristales lo suficientemente grandes como para ser retenidos (y posteriormente pesados) en el papel en el momento del filtrado es menor.
- En el test 2, la reacción transcurre de forma gradual pero debido a la baja solubilidad del calcio en el medio, la cantidad de carbonato cálcico producido es menor que en el resto de ensayos. Sin embargo, en este ensayo la cantidad de urea consumida es mayor que la cantidad de carbonato cálcico producida. Esto se debe a la fuente de calcio utilizada en el medio: La solubilidad del lactato de calcio es muy baja, alrededor de 10 veces menor que la del cloruro cálcico. De este modo, los iones de calcio producidos mediante la solución del lactato son insuficientes para generar el todo el carbonato cálcico posible al combinarse con cantidades mucho más elevadas de iones CO₃²⁻ (producto del consumo de urea de las bacterias). Para más información revisar el apartado 5.2. (Mineralización inducida biológicamente por precipitación de carbonato de calcio a través de la hidrólisis de urea) del estado del arte donde se muestra la formulación.
- En el test 3, debido a las bajas proporciones de calcio y bacterias, la producción de CaCO₃ es constante pero la cantidad de urea consumida en el medio es mayor que la de CaCO₃ producida.

Capítulo 3. Precipitación de CaCO₃ inducida por bacterias en medio acuoso

En la Figura 3. 3 se observan los resultados obtenidos de la urea consumida en el medio y el CaCO₃ producido en la prueba 6. El grafico en la figura muestra que la cantidad de carbonato cálcico producido es 10 veces mayor que el producido en las otras cinco pruebas. En el grafico también se puede ver que la cantidad de CaCO₃ producida es mayor que la cantidad de urea consumida y que durante toda la reacción su producción es constante. Esto se debe a la combinación de dos factores muy importantes que lo propician: la alta concentración de bacterias y de cloruro de calcio.

La cantidad de CaCO₃ producida en cada test no es igual debido a la influencia de los diferentes factores.

La temperatura óptima para el crecimiento de las bacterias según el proveedor es de 37°C. No obstante, los ensayos muestran que a 37°C el carbonato de calcio se genera más lentamente durante las 8 primeras horas y durante las dos últimas se produce un crecimiento exponencial; mientras que a 25°C la reacción se produce con una dinámica mucho más constante. Sin embargo, en ambos casos, la cantidad de CaCO₃ producida después de 10 horas es aproximadamente la misma. Esto destaca la importancia de la fuente de calcio.

El lactato de calcio tiene baja solubilidad y por lo tanto la cantidad de CaCO₃ producida es muy baja (aproximadamente 10 veces menor que en presencia de cloruro de calcio). Si la concentración de cloruro de calcio en el medio aumenta 10 veces, también aumenta la cantidad de producción de carbonato cálcico en la misma proporción. Por lo tanto, el aumento de la concentración de cloruro de calcio es linealmente proporcional a la producción de carbonato cálcico.

Por último, la presencia de una alta concentración de bacterias que consuman la urea produce más iones de CO₃²⁻ y provoca (si la cantidad de iones de calcio lo permite) una alta producción de CaCO₃. No obstante, este aumento no es linealmente proporcional a la producción de CaCO₃ como el de cloruro cálcico. Comparando ambos parámetros (la concentración de bacterias y la de cloruro cálcico) el segundo muestra mayor influencia sobre la producción de CaCO₃. La combinación de los dos parámetros de forma optimizada en la prueba 6 muestra la producción máxima de cloruro cálcico que es aproximadamente 50 veces mayor que en el ensayo con peor resultado (test 2).

3.4.2. Representación de la cinética de la reacción.

En este apartado se presentan las cinéticas (velocidad de la reacción respecto a la urea consumida) obtenidas para unas concentraciones de bacterias baja y alta. Se puede apreciar que en los ensayos del 1 al 4 y del 5 al 6, la cinética es comparable.

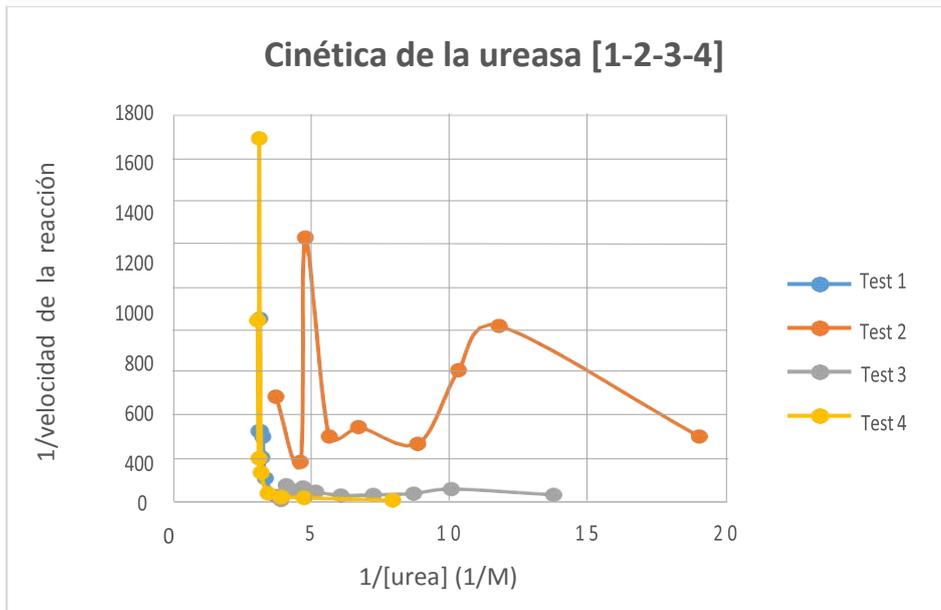


Figura 3. 4: Gráfico de la cinética del test 1, 2, 3 y 4.

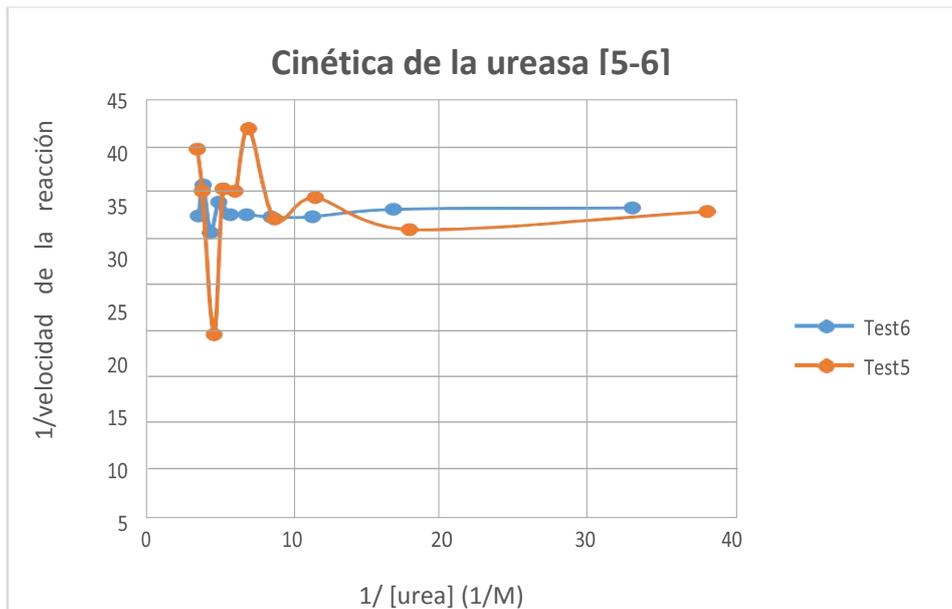


Figura 3. 5: Gráfico de la cinética del test 5 y 6.

En la Figura 3. 4 se muestra el gráfico de la cinética de las pruebas 1, 2, 3 y 4 con baja concentración de bacterias. Se puede observar que en el transitorio inicial, en todos los casos aparecen fluctuaciones de la ureasa (que se van atenuando conforme se alcanza la estabilidad del régimen permanente). Estas variaciones al inicio de las gráficas, son debidas al incumplimiento con las restricciones de la ecuación de Michaelis-Menten. Para ampliar esta información, consultar el anexo A, apartado A.3.2.6. (Cinética de la reacción).

Capítulo 3. Precipitación de CaCO₃ inducida por bacterias en medio acuoso

Las cinéticas de las pruebas 1 y 3 muestran comportamientos similares. Inicialmente la reacción oscila de forma brusca mientras que una vez se ha iniciado el consumo de urea, la reacción se estabiliza. En el test 1 se puede observar como la alta temperatura afecta la reacción, provocando una gran oscilación inicial que posteriormente necesita que se haya consumido una gran cantidad de urea para estabilizarse.

En el gráfico correspondiente a la prueba 2 se puede apreciar que la velocidad de la reacción es más lenta que las de las otras pruebas. Este resultado muestra que la presencia de cloruro cálcico favorece mucho más la reacción que la presencia de lactato cálcico.

El resultado de la prueba 4 muestra el efecto de añadir una alta concentración de cloruro cálcico y la importancia de establecer una relación entre la concentración de bacterias y la concentración de calcio. La presencia de la alta cantidad de iones de Ca²⁺ inhibe la enzima ureasa y causa desorden en el principio de la reacción. Finalmente, la reacción empezará a estabilizarse cuando en el sistema haya presencia de iones de CO₃²⁻ que empiecen a precipitarse con los iones de Ca²⁺.

Figura 3. 5 muestra la cinética de las pruebas 5 y 6, ambas con alta concentración de bacterias. En el gráfico se constata que en ambas pruebas la velocidad es casi idéntica y que los dos gráficos prácticamente comparten los mismos valores. A diferencia de las pruebas con baja concentración de bacterias, la reacción necesita menos tiempo para estabilizarse. Esta alta concentración de bacterias es la que favorece que la ureasa en el sistema aumente y la presencia de la misma cantidad de urea disminuya el grado de desorden en el sistema. En la prueba 5 se puede observar que debido a la baja concentración de cloruro cálcico el sistema es más desequilibrado que el de la prueba 6. La figura muestra nuevamente la importancia del equilibrio entre la concentración de calcio y la concentración de bacterias. La presencia de una alta cantidad de bacterias aumenta la cantidad de la enzima ureasa, la cual equilibra la presencia de una alta cantidad de iones de Ca²⁺. Por lo tanto, la urea tiene suficiente espacio para ser consumida por la enzima y el ion Ca²⁺ no actúa como inhibidor.

Tras todos estos ensayos, se puede concluir que altas concentraciones tanto de calcio como de bacterias resultan beneficiosas ya que permiten estabilizar mejor la reacción.

3.4.3. Forma del carbonato cálcico obtenido.

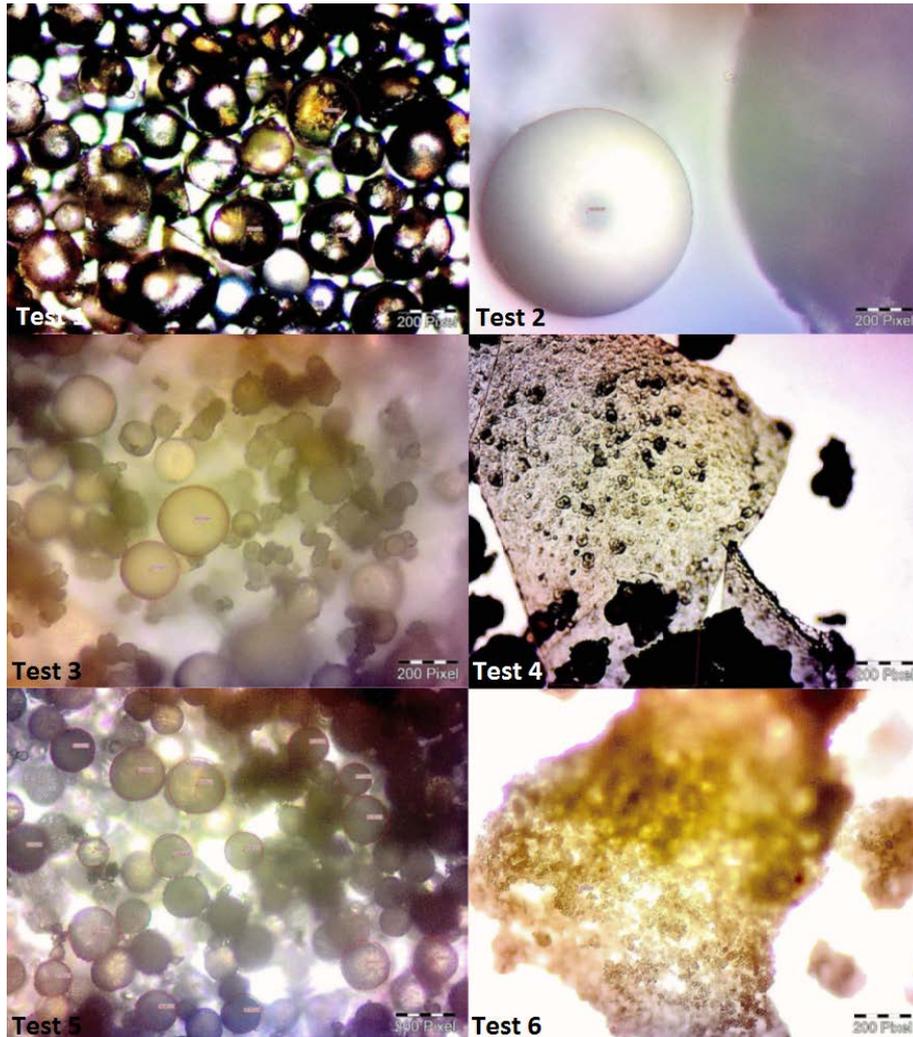


Figura 3. 6: Fotografía de los cristales obtenidos en las pruebas 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

En la Figura 3. 6 se muestran las fotografías de los cristales obtenidos en las 6 pruebas. En las fotografías se puede observar que los cristales obtenidos en los test tienen una forma esférica y que el tamaño de los cristales oscila entre 2 y 20 μm con un valor promedio de 10 μm .

La fotografía del test 1 muestra una gran cantidad de cristales pequeños de tamaño medio y con separación entre ellos. De igual modo, las fotografías del test 3 muestran que los cristales obtenidos tienen un tamaño inferior con una mayor separación entre ellos.

Los cristales obtenidos en test 2 son los de mayor tamaño y con una forma esférica más perfecta. El principal motivo es que la velocidad de reacción es mucho más lenta y el cristal ha dispuesto de más tiempo para ordenarse y poder crecer.

En la fotografía de la prueba 4 se aprecia que los cristales obtenidos forman agregados más grandes compuestos por cristales con forma esférica u ovalada. Al igual que en el test 3, el reducido tamaño de los cristales indica que la reacción se ha producido con una velocidad

media. Sin embargo en la prueba 4, la mayor concentración de calcio posibilita la formación de agregados de mayor tamaño.

En el test 5, de forma análoga al 3, también se ha obtenido una gran cantidad de cristales, entre los que no se han formado agregados. La cantidad de cristales del test 5 es mayor que la del test 3. El motivo es la alta concentración de bacterias en el medio. El tamaño de los cristales revela que la reacción se ha producido a una velocidad media debido a que no ha habido mucho tiempo que los cristales se formen ni para que crezcan más. Finalmente, dado que en el medio la concentración de calcio era baja, los cristales no se han unido formando conglomerados.

En la fotografía de test 6 se puede ver que los cristales formados son individualmente muy pequeños, están conglomerados en una forma amorfa y hay una gran cantidad. Este hecho afirma que la concentración de bacteria influye en la cantidad de cristales, ya que igual a test 5 este también se realiza con una alta concentración. Los cristales en prueba 6 están conglomerados del mismo modo que en prueba 4. Esto afirma que una concentración elevada de calcio induce a la formación de conglomerados entre ellos. Finalmente, comparando el test 2 y test 6, se puede afirmar que una mayor velocidad en que se realiza la reacción induce a un tamaño de formación de cristal más pequeño.

3.5. Análisis de los resultados obtenidos.

En este apartado se realiza un análisis de los resultados obtenidos en las 6 pruebas comentadas anteriormente y se describe la influencia de los cinco factores: temperatura, fuente de calcio, concentración de calcio, concentración de bacterias y efecto de elevar la concentración de calcio cuando la de bacterias es alta.

3.5.1. Temperatura.

En primer lugar, se buscaba entender el efecto de la temperatura realizando los test 1 y 3 con bajas concentraciones de bacterias y de calcio. Para ello, la temperatura del test 1 era de 37°C y la del test 3 de 25°C. Se concluye que un aumento en la temperatura, en este caso, no induce a un aumento en la producción de carbonato cálcico.

3.5.2. Fuente de calcio.

En segundo lugar, se pretendía entender la influencia de la fuente de calcio realizando los test 2 y 3 con la misma concentración de bacterias, iones de calcio y temperatura. Sin embargo, en el test 2 los iones de calcio provenían del lactato de calcio y los del test 3 provenían del cloruro de calcio. A tenor de los resultados, se concluye que el mejor substrato para realizar la biomineralización ha sido el cloruro cálcico.

También se ha observado que en el test 2, los cristales obtenidos son mucho más grandes que los hallados en el test 3. Al producirse la reacción más lentamente, el cristal tiene más tiempo para crecer.

3.5.3. Concentración de calcio.

En tercer lugar se ha pretendido comprender la influencia de la concentración de calcio en el proceso de la biomineralización, contrastando los resultados de los test 3 y 4. Siendo, el test 3 realizado con una temperatura de 25°C y concentración baja de bacterias y calcio, y el test 4 realizado con una temperatura de 25°C y con una concentración de bacterias baja, pero con una alta concentración de calcio. Los resultados muestran que uno de los factores más importantes para la producción de carbonato cálcico es la concentración de iones de calcio. Esto queda patente en las pruebas 4 y 6 donde se utilizó una alta concentración de calcio obteniéndose mayor cantidad de CaCO_3 . También se puede deducir a partir de las fotografías de los resultados obtenidos que aumentar la concentración de calcio induce a que los cristales obtenidos se agreguen entre ellos y formen compuestos más grandes.

3.5.4. Concentración de bacterias.

En cuarto lugar, se buscaba comprender la influencia de la concentración bacteriana mediante la comparación de los test 3 y 5, en ambos coincidían la concentración de calcio y la temperatura a la que se había realizado el ensayo, pero el test 3 tenía una concentración baja de bacterias y el 5, alta.

A partir de los resultados de las pruebas, se deduce que una concentración de bacterias mayor induce a una mayor cantidad de cristales formados. Esto es debido a que al haber un mayor número de bacterias, el calcio queda más repartido en las diversas superficies de las bacterias. Cuando cerca de estas bacterias está presente el carbonato, se inicia la precipitación formando los cristales.

3.5.5. Efecto de aumentar la concentración de calcio cuando la de bacterias es alta.

En quinto y último lugar, se deseaba conocer el comportamiento de la reacción con altas concentraciones de bacterias y cloruro cálcico y para ello se realizó el test 6.

A partir de éste test, se puede confirmar que en altas concentraciones de bacterias la formación de cristales es mayor y que si hay una gran concentración de calcio se forman conglomerados. Experimentalmente se ha obtenido, que en el test 6 los cristales formados son grandes conglomerados de multitud de cristales pequeños.

3.6. Conclusiones.

De esta primera parte, se puede concluir que podemos influir en la morfología final del cristal controlando tres factores: la cantidad de cristales unitarios, el tamaño del cristal y la formación de conglomerados.

Para poder controlar la cantidad de cristales unitarios, se debe controlar la concentración de bacterias que se añaden en el medio. A mayor concentración bacteriana, más puntos de nucleación disponibles para iniciar la formación de nuevos cristales.

Para poder influir en el tamaño del cristal, se debe controlar la velocidad con la que se forma. Para ello se puede manipular la adición de calcio de modo que el poco carbonato que

Capítulo 3. Precipitación de CaCO₃ inducida por bacterias en medio acuoso

se forme, tenga suficiente tiempo para ordenarse y crecer. Sin embargo, hay que tener en cuenta que introducir una concentración muy baja de calcio inducirá a que se forme muy poco carbonato de calcio, pero los cristales serán de gran tamaño.

Finalmente, para poder manipular la formación de conglomerados se debe controlar la concentración de calcio. Una concentración elevada de este último induce a la formación de conglomerados.

Capítulo 4: Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión uniaxial

4.1. Introducción.

En el presente capítulo se resume el estudio de la MICP en probetas cilíndricas de suelo en referencia a la determinación de la resistencia a compresión uniaxial. Las probetas fueron elaboradas con diferentes tipos de suelo y concentraciones de bacterias y riegos. Para conocer mejor las propiedades del suelo y el efecto de los diferentes tipos de tratamiento se realizaron dos ensayos:

- *MICP en probetas cilíndricas de suelo sin compactación:* el objetivo de éste ensayo fue determinar los parámetros más importantes del cultivo que permitirían optimizar el proceso de bioestabilización y aumentar la efectividad bacteriana en la precipitación del carbonato de calcio.
- *MICP en probetas cilíndricas compactadas:* Los objetivos de este ensayo fueron analizar cómo el proceso de compactación influía en la capacidad resistente de los suelos bioconsolidados y estudiar en qué momento resultaba óptimo realizar la compactación: antes o después de los riegos enriquecidos que constituyen el tratamiento de curado.

En primer lugar, se describirán las soluciones para el tratamiento y se caracterizarán los suelos en función de su distribución granulométrica. Posteriormente, se presentará el procedimiento experimental, los resultados obtenidos y las conclusiones del primer ensayo.

En segundo lugar, se describirá la configuración de las pruebas del segundo ensayo, los resultados experimentales obtenidos en el mismo y por último, se detallan las conclusiones que se extraen.

En el anexo B queda recogida información más detallada de estos estudios experimentales.

4.2. Materiales utilizados.

Para realizar estos ensayos se establecieron dos tipologías principales de materiales: soluciones y suelos a estabilizar. Por su parte, cada una de estas divisiones posee otras dos subdivisiones:

Se prepararon dos tipos de soluciones:

- Nutrientes para las bacterias *Sporosarcina pasteurii*.
- Suspensión de *Sporosarcina pasteurii*.

La caracterización de los suelos a estabilizar se basó en la distribución granulométrica conforme la norma UNE 103-101-1995. En el Anexo B: B1.2.1. (Suelos a estabilizar) se pueden observar las distribuciones de suelo. En estos ensayos se utilizaron dos tipos de suelo:

- Suelos granulares finos:

Capítulo 4. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión uniaxial

- Suelos de arena fina.
- Suelos de arena gruesa.
- Suelos arcillosos:
 - Suelo arenoso con arcilla (M1; 65 % de arena fina, 25 % de arena gruesa, y 10 % de arcilla + limo).
 - Suelo arcilloso con arena (M2; 45 % de arena fina, 15 % de arena gruesa, y 40 % de arcilla + limo).

4.3. MICP en probetas cilíndricas de suelo sin compactación.

4.3.1. Procedimiento experimental.

En primer lugar se prepararon las probetas de suelo en recipientes cilíndricos los cuales poseían unas dimensiones: $\varnothing_{\text{ext}} = 50\text{mm}$, $\varnothing_{\text{int}} = 45\text{mm}$ y 150mm de altura. Las probetas se rellenaron con el tipo de suelo correspondiente hasta 100 mm. El propósito de estas dimensiones era establecer una relación entre el diámetro y la altura conforme la norma UNE-EN-12504-1. Las probetas rellenas se ataban a un perfil de aluminio cuadrado mediante bridas, lo que permitía el correcto flujo de los líquidos excedentes durante el tratamiento.

En segundo lugar se preparó la solución de cloruro cálcico, urea y medio Bang de 3,675 g/L, 20 g/L y 1g, respectivamente. La solución fue diluida en agua destilada dentro de un matraz aforado de 1 L.

En tercer lugar la suspensión de *Sporosarcina pasteurii* fue preparada por la Universidad Autónoma de Barcelona y fue entregada en dos envases de 480 mL y un tercer envase con 40 mL de medio Bang.

Posteriormente, se procedió a determinar empíricamente la cantidad de agua que se podía aportar a cada tipo de suelo sin que llegase a fluir. Se realizaron probetas cilíndricas con cada tipo de suelo y a partir de la masa, se calculó la cantidad de agua que se podía añadir. Conocer este volumen fue importante debido a que, si se añadía más fluido del necesario, éste saldría por el fondo de la probeta y se desperdiciaría llegando incluso a arrastrar las bacterias fuera de la probeta.

Una vez conocida la cantidad de agua que requería cada tipo de suelo, se calculó el volumen correspondiente de líquido a utilizar para el tratamiento.

En cuarto lugar, para cada tipo de suelo se realizaron 13 pruebas con el objetivo de determinar la influencia de los riegos enriquecidos. En el siguiente punto (4.2.3. Configuración de los ensayos) se presenta más información sobre las pruebas realizadas. Dos días después de finalizar los riegos enriquecidos se desmoldaron las probetas. Posteriormente, se dejaban secar en una base durante 2 semanas para garantizar su completo secado.

Por último, cuando las probetas estaban completamente secas, se procedía a realizar los ensayos de compresión uniaxial.

4.3.2. Configuración de los ensayos.

Mediante la realización de los siguientes 13 ensayos, se pretendía optimizar la efectividad de la componente bacteriana en el proceso de bioestabilización de suelos:

1. La primera prueba se realizó sólo con agua destilada.

2. La segunda prueba se realizó sin concentración bacteriana, con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang de 20 g/L y 3,675 g/L, respectivamente y período entre tratamientos de 2 h.
3. La tercera prueba se realizó con **bajas concentraciones de bacterias: $1.10E6$ cfu/ml y $1.10E7$ cfu/ml**, sin urea ni cloruro cálcico diluidos en medio Bang.
4. La cuarta prueba también se realizó con baja concentración de bacterias pero con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang de 20 g/L y 3,675 g/L, respectivamente en un único tratamiento.
5. La quinta prueba se realizó con baja concentración de bacterias, con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang de 20 g/L y 3,675 g/L, respectivamente y período entre tratamientos de 2 h con un total de 5 tratamientos (8 horas).
6. La sexta prueba se realizó con **altas concentraciones de bacterias: $1.10E8$ cfu/ml y $1.10E9$ cfu/ml**, sin urea ni cloruro cálcico diluidos en medio Bang.
7. La séptima prueba se realizó con alta concentración de bacterias, con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang de 20 g/L y 3,675 g/L, respectivamente y sin período entre tratamientos.
8. La octava prueba se realizó con alta concentración de bacterias, con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang de 20 g/L y 3,675 g/L, respectivamente y período entre tratamientos de 2 h con un total de 5 tratamientos (8 horas).
9. La novena prueba se realizó con alta concentración de bacterias, con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang de 20 g/L y 3,675 g/L, respectivamente y período entre tratamientos de 4 h con un total de tres tratamientos (8 horas).
10. La décima prueba se realizó con alta concentración de bacterias, con segunda inoculación de bacterias en 24 h, con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang de 20 g/L y 3,675 g/L, respectivamente y período entre tratamientos de 2 h con un total de 5 tratamientos (8 horas).
11. La undécima prueba se realizó con el ciclo hielo/deshielo. La prueba consistió en añadir solo agua destilada.
12. La duodécima prueba se realizó con el ciclo hielo/deshielo. La prueba consistió en añadir baja concentración de bacterias, con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang de 20 g/L y 3,675 g/L, respectivamente y período entre tratamientos de 2 h con un total de 5 tratamientos (8 horas).
13. La decimotercera prueba se realizó con el ciclo hielo/deshielo. La prueba consistió en añadir alta concentración de bacterias, con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang de 20 g/L y 367,5 g/L, respectivamente y período entre tratamientos de 2 h con un total de 5 tratamientos (8 horas).

Para comparar numéricamente las pruebas, cada probeta fue sometida a un ensayo de compresión uniaxial no confinada, obteniendo como resultado la compresión (kPa) que pudieron resistir cada una de ellas. Estos resultados se contrastaron para determinar la influencia de los siguientes 7 factores:

1. La influencia de la presencia de bacterias en los diferentes tipos de suelo se analizó comparando los resultados de los ensayos 1 y 2 respecto al resto.
2. Los ensayos 3 y 6 permitieron estudiar la influencia de la concentración bacteriana sin tratamiento posterior.
3. Comparar los ensayos 8 y 10 permitió establecer la influencia de una segunda inoculación de bacterias.

Capítulo 4. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión uniaxial

4. En los ensayos 8 y 9 se contrastó la influencia del período entre tratamientos para una misma concentración bacteriana.
5. Los resultados de los ensayos 5 y 8 permitieron estudiar la influencia de la concentración bacteriana con el mismo procedimiento de curado.
6. Mediante contrastar los resultados del ensayo 8 con los ensayos 12 y 13 se aprecia la influencia de la concentración de calcio.
7. Finalmente, comparar los resultados de los ensayos 11, 12 y 13 muestra la influencia de los ciclos hielo/deshielo.

4.3.3. Resultados obtenidos de los ensayos.

En la Figura 4. 1, Figura 4. 2, Figura 4. 3 y Figura 4. 4 se observa de forma resumida la influencia del proceso de curado para cada tipo de suelo. En las 4 figuras, los números simbolizan los ensayos realizados y cada cuadrado muestra el promedio de los resultados obtenidos de resistencia a compresión uniaxial para cada dos probetas. Las flechas simbolizan el valor más alto y más bajo de las mismas.

Arena fina:

En la Figura 4. 1 se observa de forma resumida la influencia de los diferentes tratamientos en la arena fina (SS). En la figura se puede apreciar que el mejor tratamiento para la arena fina es el aplicado en el test número 10. Éste tratamiento consistió en realizar un tratamiento inicial con alta concentración de bacterias, baja concentración de calcio, un periodo de tiempo entre riegos de 2h y con una segunda adición de bacterias 24h después de la primera y antes de iniciar los riegos de tratamiento.

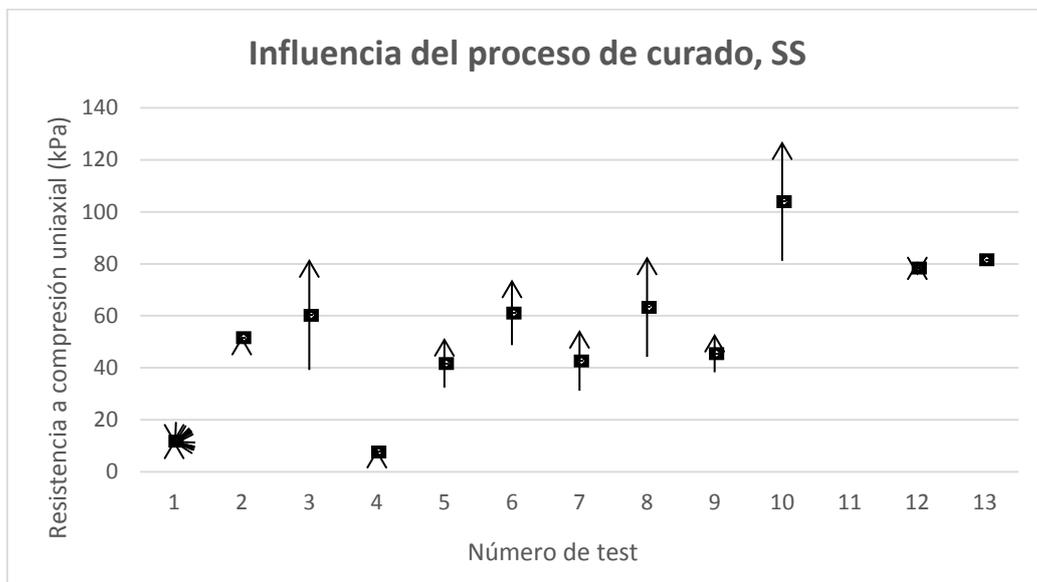


Figura 4. 1: Influencia del proceso de curado en la arena fina.

1. Influencia de la presencia de bacterias en SS.

Comparando los resultados obtenidos de las probetas realizadas con tratamiento y la prueba de control (test 1) se aprecia que la presencia de bacterias aumenta la resistencia del suelo. Incluso el simple hecho de introducir el tratamiento con riego enriquecido, aún sin bacterias (en test 2), mejora substancialmente la resistencia mecánica de la arena fina. Sin embargo, en las pruebas 4 y 5 se observa que añadir una baja concentración de bacterias antes de los riegos enriquecidos no parece tener un efecto destacable e incluso es menos favorable que la realización del tratamiento directamente sin bacterias. Este hecho puede ser debido a la falta de homogeneidad de la distribución de bacterias.

2. *Influencia de la concentración bacteriana sin tratamiento posterior.*

Los resultados obtenidos de las pruebas 3 (baja concentración de bacterias) y 6 (alta concentración de bacterias) muestran que la diferente concentración de bacterias sin un tratamiento posterior no influye a la resistencia mecánica del SS, ya que los resultados obtenidos de las dos pruebas de compresión son semejantes.

3. *Influencia de una segunda inoculación de bacterias.*

Comparando los resultados obtenidos en las pruebas 8 y 10, una segunda inoculación de bacterias es favorable para la resistencia mecánica de la arena fina. Conforme los resultados obtenidos anteriormente en el capítulo 3, la presencia de una alta concentración de bacterias consume mayor cantidad de urea y es capaz de producir mayor cantidad de carbonato cálcico. Los resultados obtenidos de las pruebas 8 y 10 lo confirman.

4. *Influencia del período entre tratamientos para una misma concentración bacteriana.*

Los resultados obtenidos de las pruebas 8 y 9 muestran que resulta más favorable aportar nutrientes, urea y calcio cada 2h y 5 veces al día durante 5 días que hacerlo cada 4h 3 veces al día durante el mismo número de días.

5. *Influencia de la concentración bacteriana con el mismo procedimiento de curado.*

En las pruebas 5 y 8 se realizó el mismo tratamiento pero con diferentes concentraciones de bacterias. La resistencia mecánica en la prueba 8, en la que se añadió una alta concentración de bacterias es mayor, lo que indica que la concentración de bacterias en la arena fina juega un papel muy importante. Del mismo modo, comparando los resultados obtenidos en las pruebas 8 y 10 se aprecia un aumento significativo en la resistencia mecánica, lo que confirma este resultado.

6. *Influencia de la concentración de calcio.*

La influencia de la concentración de calcio se estudió mediante las pruebas 8, 12 y 13. Comparando los resultados obtenidos, se deduce que aumentar la concentración de calcio no es favorable para la bioestabilización de la arena fina. Esto puede ser debido a la formación de cristales mayores que generen menor conectividad entre las partículas de arena.

7. *Influencia de los ciclos hielo/deshielo.*

Los ciclos hielo/deshielo se realizaron en las pruebas 11, 12 y 13. Debido a la rotura durante la realización del ciclo hielo/deshielo de todas las probetas del test 11 y una del test 13 no se pudo obtener información completa. A partir de

Capítulo 4. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión uniaxial

este hecho, se llega a la conclusión que hasta que no exista una mínima concentración de bacterias en la probeta, esta se rompe con facilidad durante el ciclo hielo/deshielo.

Arena gruesa:

La Figura 4. 2 muestra de forma resumida la influencia del proceso de curado en la arena gruesa (CS). Se puede apreciar que el mejor tratamiento para la arena gruesa es el aplicado en el test número 13. Este tratamiento aportaba una elevada concentración de calcio en los riegos enriquecidos aplicados cada 2h sobre muestras con una alta concentración de bacterias.

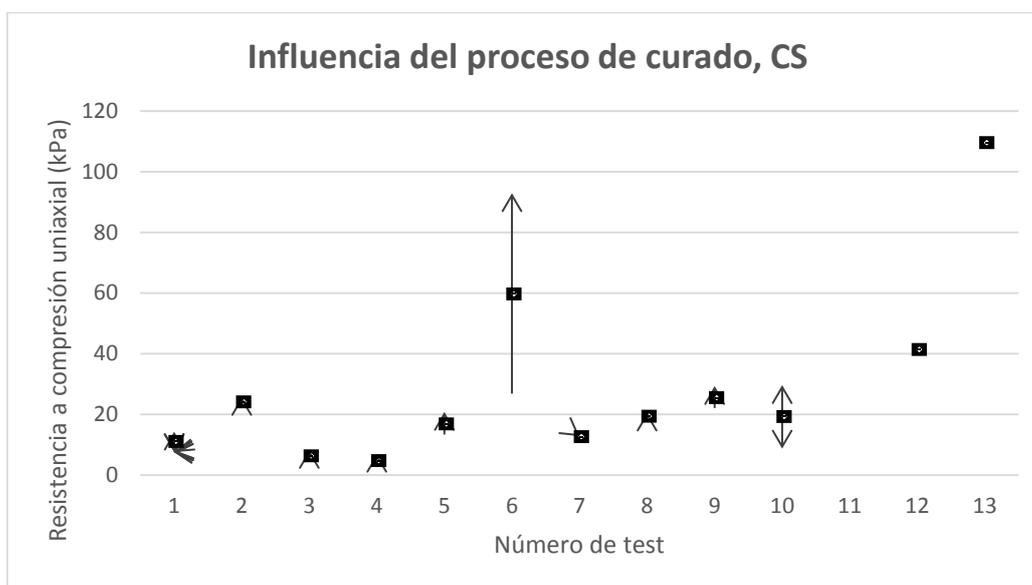


Figura 4. 2: Influencia del proceso de curado en la arena gruesa.

- 1. Influencia de la presencia de bacterias en CS.**
Comparando los resultados obtenidos a partir las probetas realizadas con tratamiento y la prueba de control (test 1) se ve que la resistencia mecánica de CS únicamente aumenta si la concentración de bacterias es alta. Al igual que en los resultados obtenidos para la arena fina, introducir el tratamiento con riego enriquecido sin bacterias (test 2) mejora la resistencia de la arena gruesa.
- 2. Influencia de la concentración bacteriana sin tratamiento posterior.**
Según los resultados obtenidos en las pruebas 3 y 6, la concentración de bacterias influye en la resistencia de compresión uniaxial de CS; en el test 6, donde la concentración de bacterias era alta, se aprecia un aumento significativo en la resistencia mecánica de la arena gruesa.
- 3. Influencia de una segunda inoculación de bacterias.**
El objetivo de las pruebas 8 y 10 era estudiar la influencia de una segunda inoculación de bacterias. Los resultados muestran que una segunda inoculación de bacterias no afecta de ningún modo las propiedades de CS.

Este resultado puede deberse a que el tamaño de los cristales obtenidos es insuficiente para unir las partículas de arena.

4. *Influencia del período entre tratamientos para una misma concentración bacteriana.*

La influencia del período entre tratamientos para una misma concentración de bacterias se estudió mediante las pruebas 8 y 9. Comparando los resultados obtenidos se puede apreciar que un período entre tratamientos mayor (4 horas respecto a 2) aumenta la resistencia mecánica de CS.

5. *Influencia de la concentración bacteriana con el mismo procedimiento de curado.*

El test 8 con una alta concentración de bacterias muestra mayor resistencia a compresión uniaxial que el test 5, con una concentración menor, aunque la diferencia no es significativa.

6. *Influencia de la concentración de calcio.*

Los resultados de las pruebas 8, 12 y 13 muestran que la alta concentración de calcio es beneficiosa para la arena gruesa. En el test 13 la resistencia a compresión uniaxial aumenta hasta 7 veces respecto al test de control.

7. *Influencia de los ciclos hielo/deshielo.*

Al igual que en el resultado obtenido para arena fina, al realizar el ciclo hielo/deshielo varias probetas (el test 11 completo, una del test 12 y una del test 13) se rompieron y no se pudo obtener información completa.

Mezcla 1:

En la Figura 4. 3 se observa de forma resumida la influencia de los diferentes tratamientos en la mezcla 1 (M1). La figura muestra que al igual que en el caso de la arena fina, el mejor tratamiento para la M1 es el aplicado en el test número 10.

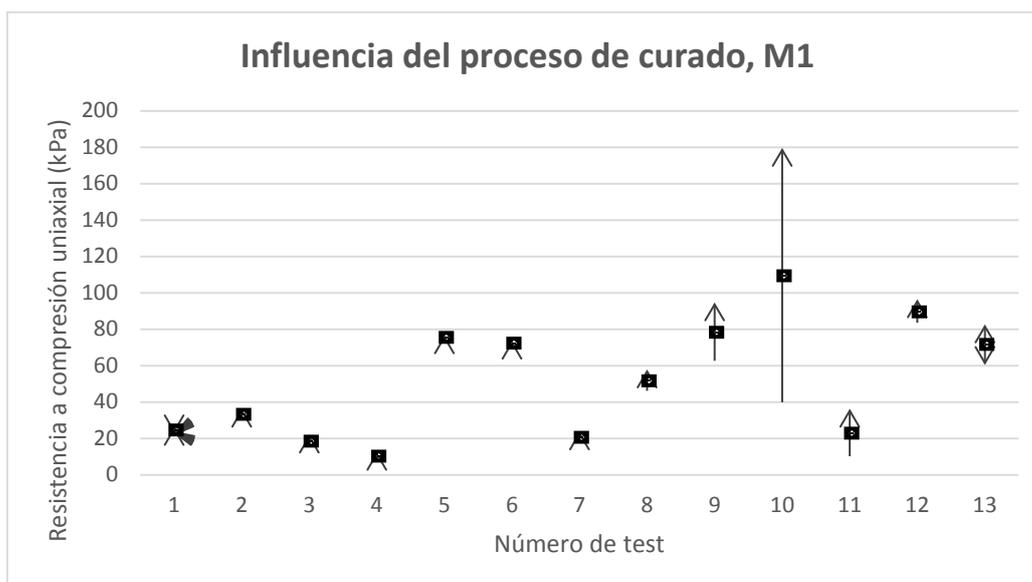


Figura 4. 3: Influencia del proceso de curado en la mezcla 1.

Capítulo 4. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión uniaxial

1. *Influencia de la presencia de bacterias en M1.*

La influencia de la presencia de bacterias en la mezcla 1 se estudió comparando los resultados obtenidos a partir las pruebas 1 (control) y 2 (realizada con riegos enriquecidos sin añadir concentración bacteriana) con el resto. Los resultados obtenidos muestran que para el test 10 (alta concentración de bacterias con una segunda inoculación) se obtiene la mayor resistencia a compresión uniaxial. Sin embargo, cabe destacar que los resultados para este tratamiento presentan una significativa dispersión. Introducir un tratamiento sin bacterias (test 2) no muestra un incremento significativo para la M1.
2. *Influencia de la concentración bacteriana sin tratamiento posterior.*

La influencia de la concentración bacteriana se estudió mediante la comparación de las pruebas 3 y 6. Según los resultados obtenidos, una concentración alta de bacterias aumenta la resistencia mecánica de M1 significativamente.
3. *Influencia de una segunda inoculación de bacterias.*

La influencia de una segunda inoculación de bacterias se estudió comparando las pruebas 8 y 10. La segunda inoculación de bacterias presenta resultados contradictorios (aunque en promedio aumenta la resistencia a compresión uniaxial), seguramente debidos al hecho de que la segunda adición puede contribuir a añadir agentes biológicos o bien a arrastrar el carbonato de calcio generado hasta el momento si se supera el volumen máximo (el tratamiento comienza a perderse por la parte inferior). En este sentido, parece ser que la segunda inoculación de bacterias tiene un riesgo manifiesto sobre la mejora de las propiedades resistentes de la mezcla 1 (M1).
4. *Influencia del período entre tratamientos para una misma concentración bacteriana.*

Los resultados de las pruebas 8 y 9 muestran que un período entre tratamientos más lento es más favorable que un período más rápido.
5. *Influencia de la concentración bacteriana con el mismo procedimiento de curado.*

En las pruebas 5 y 8 se realizó el mismo tratamiento pero con diferentes concentraciones de bacterias. Los resultados del test 5 (se realizó con baja concentración de bacterias) muestran mayor resistencia a compresión que los del test 8. La razón podría ser el efecto de compactación debido a la buena distribución de las partículas del suelo y la solución.
6. *Influencia de la concentración de calcio.*

Según los resultados obtenidos en las pruebas 8, 12 y 13 la alta concentración de calcio muestra un aumento en la resistencia a compresión uniaxial, aunque el aumento no sea significativo.
7. *Influencia del ciclo hielo/deshielo.*

La influencia del ciclo hielo/deshielo se estudió mediante las pruebas 11, 12 y 13. Los resultados obtenidos de las pruebas 12 y 13 muestran mayor resistencia a compresión uniaxial que en el caso de los suelos arenosos. A diferencia de los resultados obtenidos en SS y CS, la resistencia a compresión uniaxial del test 11 es similar a la del test 1.

Mezcla 2:

La Figura 4. 4 muestra de forma resumida la influencia del proceso de curado en la mezcla 2 (M2). En la figura se aprecia que el mejor tratamiento para M2 es el test número 12. Este tratamiento consistía en añadir baja concentración de bacterias, baja concentración de calcio y un periodo entre tratamientos entre riegos de 2h.

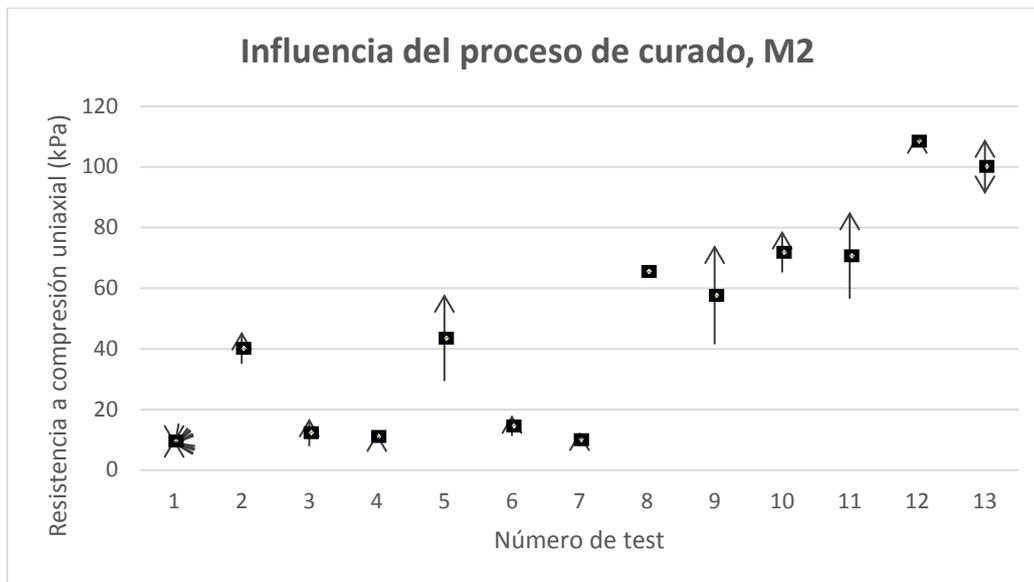


Figura 4. 4: Influencia del proceso de curado en la mezcla 2.

- 1. Influencia de la presencia de bacterias en M2.**

La influencia de la presencia de bacterias en M2 se estudió mediante la comparación de los resultados obtenidos a partir de las pruebas 1 y 2 con el resto. En los resultados obtenidos se aprecia que añadir bacterias aumenta la resistencia mecánica del suelo en todas las pruebas. Los resultados de la prueba 2, donde se incorporó tratamiento sin la adición de bacterias, también muestran un aumento significativo en la resistencia.
- 2. Influencia de la concentración bacteriana sin tratamiento posterior.**

Los resultados obtenidos de las pruebas 3 y 6 muestran que aplicar únicamente la adición de bacterias no tiene un efecto significativo para la resistencia a compresión uniaxial de la M2. Entre la baja concentración de bacterias del test 3 y la alta del test 6, ambos casos sin tratamiento, se observan resultados similares.
- 3. Influencia de una segunda inoculación de bacterias.**

Comparando las pruebas 8 y 10 se observa que la segunda inoculación de bacterias es beneficiosa pero no supone un cambio muy significativo ($\approx 10\%$) en la resistencia a compresión final.
- 4. Influencia del período entre tratamientos para una misma concentración bacteriana.**

Capítulo 4. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión uniaxial

Conforme los resultados obtenidos en las pruebas 8 y 9, un período entre tratamientos menor (2 horas respecto a 4) tiene mayor influencia sobre la resistencia mecánica de la mezcla 2.

5. *Influencia de la concentración bacteriana con el mismo procedimiento de curado.*

La influencia de la concentración bacteriana fue estudiada mediante las pruebas 5 y 8. Comparando los resultados, se aprecia que una alta concentración de bacterias con un procedimiento de curado posterior aumenta notablemente la resistencia del suelo.

6. *Influencia de la concentración de calcio.*

Comparando las pruebas 8, 12 y 13 se aprecia que la concentración de calcio en los riegos enriquecidos aumenta la resistencia a compresión uniaxial, aunque este aumento no parece significativo.

7. *Influencia de los ciclos hielo/deshielo.*

Los resultados obtenidos para M2 son similares a los de M1. Los resultados de las pruebas 12 y 13 muestran mayor resistencia a compresión uniaxial en comparación con las otras 11 pruebas. Este resultado puede deberse al efecto del ciclo hielo/deshielo. Cuando la muestra se deja dentro del congelador, la solución dentro de las muestras se congela. Tras 24 horas, las muestras se vuelven a someter a condiciones ambientales; esto provoca que la solución al descongelarse se filtre mejor y penetre más profundamente en el suelo. Debido a esto, la distribución de la solución en el suelo mejora, aumentando su cohesión y por lo tanto resultando en la mencionada mejora a compresión uniaxial.

4.3.4. Análisis de los resultados obtenidos.

En primer lugar, los resultados obtenidos muestran que la adición únicamente de bacterias en alta concentración aumenta la resistencia a compresión uniaxial en todos los suelos. En la arena fina (SS) y la mezcla 2 (M2) aportar menores cantidades de bacterias también supone una mejora de las propiedades del suelo. Por el contrario, en la arena gruesa (CS) y en la mezcla 1 (M1), la adición de bacterias en baja concentración puede llegar a disminuir la resistencia de las probetas respecto a las regadas únicamente con agua de abasto. La razón puede ser debida a la mejor homogeneidad de la distribución de las bacterias con alta concentración. Otra razón también puede ser el tamaño de las partículas de los suelos. Un menor tamaño de las partículas del suelo aumenta su cohesión y por lo tanto aumenta su resistencia a compresión.

En segundo lugar, añadir una segunda inoculación de bacterias en 24h es beneficioso para la arena fina y la M2; la resistencia a compresión de las muestras de arena fina aumenta hasta 9 veces y la de M2 hasta 8. Los resultados para la arena gruesa no muestran un aumento tan acusado en la resistencia, tan solo 1,3 veces más que las probetas de control. En el caso de M1, la segunda inoculación de bacterias presenta resultados contradictorios (aunque en promedio aumenta la resistencia a compresión), seguramente debido al hecho de que la segunda adición puede contribuir a añadir agentes biológicos o bien a arrastrar el carbonato de calcio generado hasta el momento si el volumen excede el máximo. En este sentido, parece ser que la segunda inoculación de bacterias tiene un riesgo manifiesto sobre la mejora de las propiedades resistentes de M1.

En el caso de realizar un tratamiento posterior, también se aprecia que una mayor concentración de bacterias implica una mayor resistencia a compresión uniaxial. Al igual que en el resultado obtenido para una segunda inoculación de bacterias, la mayor influencia del tratamiento se observa en el suelo arcilloso con arena (M2) y en la arena fina (en ambos suelos la resistencia a compresión aumenta 7 veces más que la de las probetas de control). En la arena gruesa (CS) también se aprecia un aumento en la resistencia (multiplicando por 1,75 la inicial), aunque éste aumento no sea tan significativo. Sin embargo, los resultados del suelo M1 muestran que la alta concentración de bacterias influye negativamente sobre la resistencia a compresión uniaxial (la resistencia a compresión de las probetas realizadas con baja concentración de bacterias es 10% mayor que la obtenida con una elevada concentración). Como se describió anteriormente, no hay diferencia entre tratar la arena fina y la mezcla 2 con una concentración de bacterias alta o baja. Sin embargo, un aumento en la resistencia de compresión se observa en realizar una segunda inoculación. Esto indica que al aportar más bacterias se puede hidrolizar mayor cantidad de urea y precipitar más carbonato de calcio, creando más cantidad de cristales que unan las partículas del suelo. En la arena gruesa no se observa un aumento tan significativo en la resistencia, probablemente debido al tamaño demasiado pequeño de los cristales para unir las partículas o permanecer dentro del suelo.

En tercer lugar, la alta concentración de calcio muestra mayor beneficio en el CS, llegando a multiplicar por 7 su resistencia inicial. En M1 también se aprecia un aumento en la resistencia (hasta 3 veces), no obstante éste aumento no es tan elevado. Por otra parte, se observa que para los suelos M2 y SS la alta concentración de calcio en los riegos enriquecidos no tiene influencia sobre las propiedades resistentes. Este resultado se puede deber a los cristales conglomerados, que se unen para formar uno de mayor tamaño, lo que permitiría cubrir los grandes espacios disponibles. Se observa que los suelos con poros de mayor tamaño (CS y M1) necesitan mayor aportación de calcio, mientras que para los suelos con poros menores, como la arena fina y M2, la aportación de calcio no es tan sustancial.

En cuarto lugar, el período entre tratamientos de 2h es más favorable para SS y M2. El disminuyo en el período entre tratamientos permite que las bacterias crezcan, aumenta la aportación de urea y se precipita mayor cantidad de CaCO_3 . Este resultado sigue el obtenido en el capítulo 3, donde el gráfico de formación de carbonato cálcico mostró un aumento en la producción a partir de 3 horas. El período entre tratamientos de 4h es más favorable para CS y M1. Un aumento en el período entre tratamientos evitaría el exceso de líquidos en los suelos y el arrastre del carbonato de calcio generado, debido al tamaño grande de sus poros.

Por último, la influencia de las adiciones de bacterias y calcio sobre la durabilidad frente a ciclos de hielo/deshielo no se puede analizar cualitativamente para los dos tipos de suelos de arena debido a que no existen datos para los ensayos de control, cuyas probetas se desmoronaron después del ciclo. Por lo tanto, el resultado de la primera comparativa es que ninguna probeta de arena sin bacterias y calcio resistió el ciclo hielo/deshielo mientras que el 100% de las probetas de SS y el 50% de CS lo consiguieron en el caso de la baja concentración de bacterias/calcio y con alta concentración, el 50% de las probetas de ambos tipos de arena resistió. Por esta razón, añadir bacterias y calcio en suelos de tipo arena mejora su resistencia a los ciclos de hielo/deshielo. Aunque las comparaciones cuantitativas de los ensayos de las probetas de arena sometidas a hielo/deshielo no cuentan con una base estadística sólida, se observa la tendencia a que unas concentraciones más elevadas de bacterias y calcio resultan en mayor resistencia.

Capítulo 4. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión uniaxial

Se observa que para los suelos M1 y M2 el aumento de la resistencia resulta ser mayor cuando la adición es de menores concentraciones de bacterias y calcio. Éste resultado muestra una vez más que a los suelos con menor porosidad se debe añadir menor concentración de calcio, ya que los cristales se formarán con mayor separación entre ellos. También, en el suelo M1, el contenido de arcilla ayuda que la solución al descongelarse, se filtre mejor y aumente su cohesión. En el Anexo B: B1.4.1. (Comparativa y tabla resumen; tabla B1 13) se puede observar la tabla comparativa de la influencia de las adiciones de bacterias y calcio sobre la durabilidad frente a ciclos de hielo y deshielo en probetas de suelo tipo M1 y M2.

4.3.5. Conclusiones.

A partir del análisis de los resultados obtenidos se concluye el tratamiento óptimo para cada tipo de suelo. La tabla resumen del procedimiento de curado óptimo para cada tipo de suelo se puede observar en el Anexo B: B1.4.1. (Comparativa y tabla resumen; tabla B1 14):

- Los parámetros que muestran mayor influencia positiva en la resistencia a compresión uniaxial en la arena fina (SS) son:
 - Alta concentración de bacterias (entre 1.10E8 cfu/ml y 1.10E9 cfu/ml).
 - Período entre tratamientos de 2h.
 - Baja concentración de calcio (3,675 g/L).
 - Segunda inoculación de bacterias en 24h.
- Los parámetros que por su parte muestran una mayor influencia positiva en la arena gruesa (CS) son:
 - Alta concentración de bacterias.
 - Período entre tratamientos de 4h
 - Alta concentración de calcio (367,5 g/L).
- Los parámetros que muestran mayor influencia positiva en la mezcla 1 (M1) son:
 - Baja concentración de bacterias (entre 1.10E6 cfu/ml y 1.19E7 cfu/ml)
 - Período entre tratamientos de 4h.
 - Alta concentración de calcio.
- Los parámetros que muestran mayor positiva en la resistencia a compresión no confinada en la mezcla 2 (M2) son:
 - Alta concentración de bacterias.
 - Período entre tratamientos de 2h.
 - Segunda inoculación de bacterias en 24h.

4.4. MICP en probeta cilíndrica compactada.

4.4.1. Procedimiento experimental.

En primer lugar, se realizó un ensayo previo denominado Proctor Modificado (norma UNE 103-501-94) cuyo objetivo era determinar la humedad óptima de compactación mediante el cálculo de la densidad seca de un suelo compactado siempre con la misma energía (2,632 J/cm³) pero con diferentes grados de humedad. El procedimiento completo y los resultados obtenidos del ensayo se pueden observar en el Anexo B, apartado B2.3.1. (Ensayos previos. Determinación de la humedad óptima de compactación).

En segundo lugar, se recolectó el suelo y se guardó en condiciones de laboratorio durante una semana con el objetivo de tener el mismo grado de humedad durante los ensayos. Un día antes del inicio de los test se calculó la humedad real de cada tipo de suelo.

En tercer lugar, se calculó la correspondiente cantidad de bacterias que se debía aportar a cada tipo de suelo mediante la ecuación B2. 3 (Anexo B, apartado B2.3.3. Determinación del volumen de inoculación). El suelo se mezcló con la cantidad de bacterias anteriormente calculada y se rellenaron los cilindros. Para más información sobre las probetas y el tratamiento realizados, consultar el siguiente punto 4.4.2. (Configuración de los ensayos) del presente documento.

En cuarto lugar, se procedió a compactar las probetas conforme el método Proctor Modificado (unas antes y las otras después de realizar los riegos enriquecidos). Una vez finalizado el tratamiento y la compactación, las probetas se dejaron secar durante una semana. Transcurrida esta semana se procedió al desmoldado. Tras el desmoldado, las probetas se dejaron secar definitivamente durante 2 semanas.

Por último, cuando las probetas estaban completamente secas, se procedió a realizar los ensayos de compresión uniaxial.

4.4.2. Configuración de los ensayos.

La concentración de bacterias y el tipo del tratamiento se eligieron en base a los resultados obtenidos en el ensayo anterior. Para cada tipo de suelo se prepararon tres tipos de probetas:

- *Probetas de control compactadas:* Durante la compactación se realizó un único riego con agua destilada.
- *Probetas compactadas antes de iniciar los riegos enriquecidos:* Los riegos de estas probetas se realizaron de dos maneras: Con urea y cloruro de calcio diluidos en agua destilada y con los mismos ingredientes diluidos en medio Bang.
- *Probetas compactadas después de realizar los riegos enriquecidos:* Los riegos de las probetas compactadas después del tratamiento biológico también se realizaron con urea y cloruro de calcio diluidos en agua o en medio Bang.

En éste ensayo se estableció un único volumen de 1,4ml de disolución a añadir en las probetas de suelo. La disolución se preparó a partir de urea (20g/L) y calcio (3,675g/L o 36,75g/L) que se diluían en agua destilada o en medio Bang. Los riegos se realizaban a cada 2 o 4 horas de 10 a 18h durante 5 días.

La dilución de la urea y el calcio en agua destilada se realizó con el objetivo de ver si era posible abaratar el procedimiento de cara a una aplicación industrial.

4.4.3. Resultados obtenidos de los ensayos.

En las siguientes figuras se observa de forma resumida la influencia de la compactación antes y después de los riegos realizados con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang y/o agua destilada para cada tipo de suelo (SS, CS, M1 y M2). En las 4 figuras las barras representan el promedio de la resistencia a compresión de las probetas para cada tratamiento realizado. Para completar la información, en la parte superior de las barras se indica su coeficiente de variación.

Capítulo 4. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión uniaxial

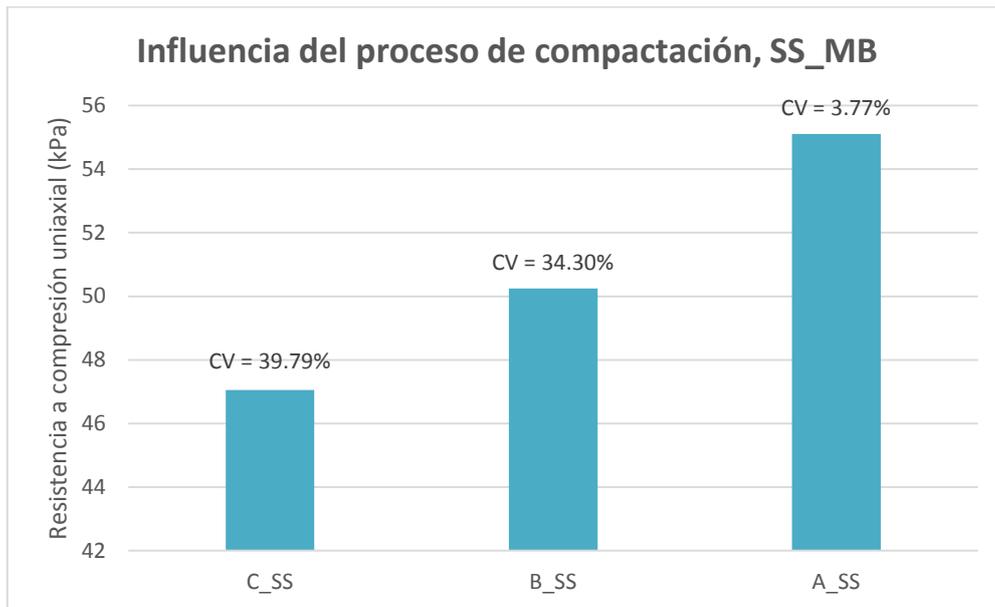


Figura 4. 5: Influencia del proceso de compactación en la arena fina (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang).

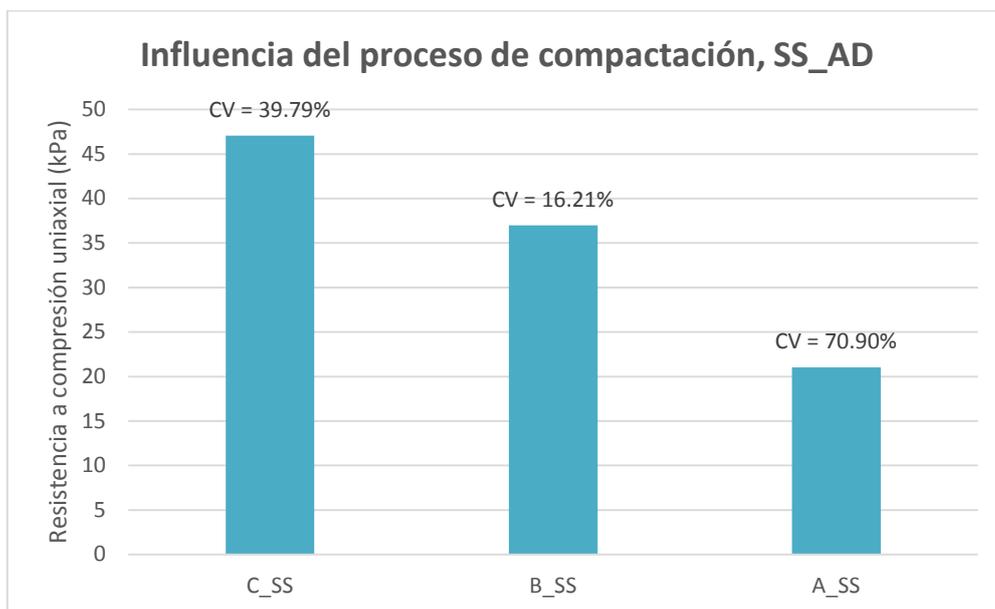


Figura 4. 6: Influencia del proceso de compactación en la arena fina (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en agua destilada).

En la Figura 4. 5 y también en la Figura 4. 6 se observa la influencia del proceso de compactación para las probetas de arena fina realizadas con urea y calcio diluidos en medio Bang y agua destilada. Comparando las dos figuras se aprecia que realizar el tratamiento con agua destilada no resulta beneficioso para la arena fina. Una posible razón para esto sería la falta de nutrientes para el crecimiento de las bacterias, ya que los resultados obtenidos del ensayo anterior muestran que una elevada aportación de bacterias se traduce en una mayor

Capítulo 4. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión uniaxial

resistencia a compresión en la arena fina. Además, compactar el suelo antes del tratamiento realizado resulta más favorable que compactarlo después en ambos casos (riegos realizados con agua destilada y medio Bang). Las partículas del SS son regulares, lo que permite que al compactar el suelo se ordenen y rellenen los grandes vacíos entre ellas. Éste hecho facilita que al realizar el tratamiento, los espacios entre las partículas se rellenen con las nanopartículas de CaCO_3 .

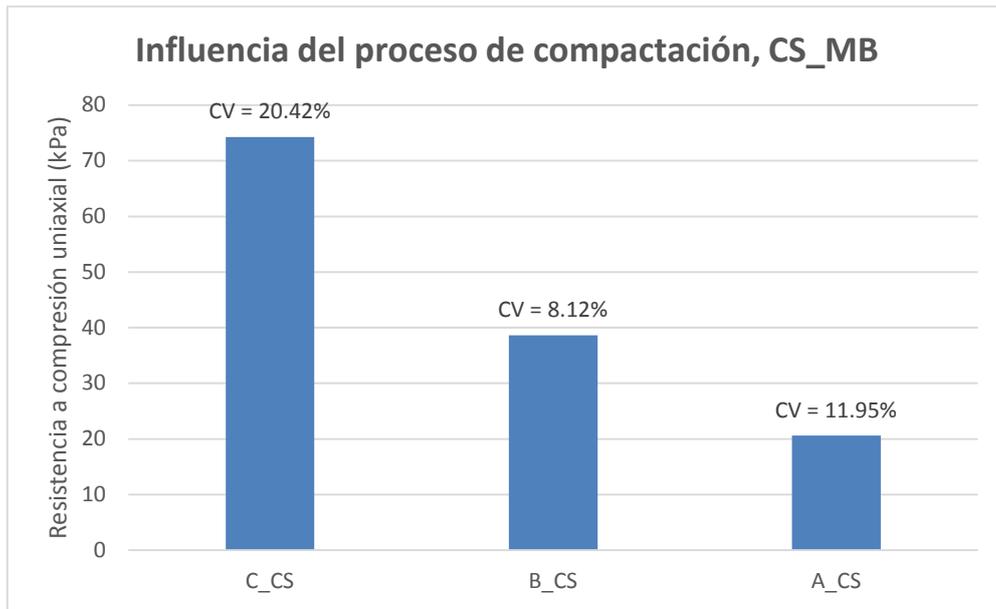


Figura 4. 7: Influencia del proceso de compactación en la arena gruesa (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang).

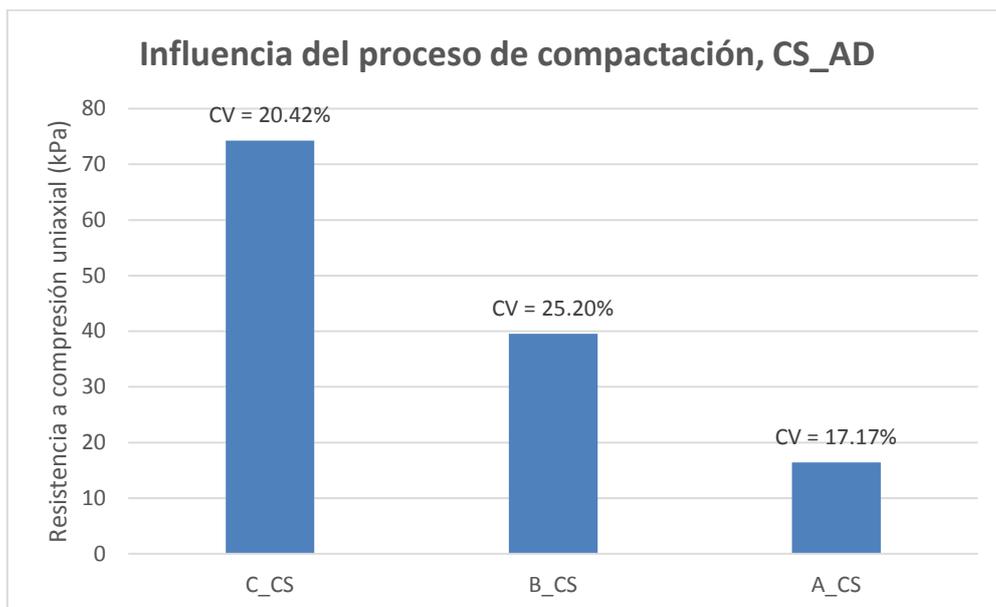


Figura 4. 8: Influencia del proceso de compactación en la arena gruesa (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en agua destilada).

Capítulo 4. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión uniaxial

Tanto en la Figura 4. 7 como en la Figura 4. 8 se observa la influencia del proceso de compactación para las probetas de arena gruesa realizadas con urea y calcio diluidos en medio Bang y agua destilada. En primer lugar, se puede observar que realizar los riegos enriquecidos con urea y calcio diluidos en medio Bang o agua destilada no muestra gran diferencia. No obstante, si se opta por compactar también después, el agua destilada arrastraría las partículas finas con mayor facilidad que el medio Bang.

En segundo lugar, se observa que en las dos figuras, las probetas de control muestran mayor resistencia a compresión. Posiblemente, éste resultado se deba al gran tamaño de los poros que favorece que los riegos arrastren las pocas partículas de menor tamaño inicialmente presentes, aumentando los vacíos finales y por lo tanto reduciendo la resistencia.

Finalmente, al igual que en el caso de la arena fina, para la arena gruesa también resulta más favorable compactar el suelo antes de los riegos enriquecidos, seguramente porque este hecho limitaría el posible arrastre de las partículas de menor tamaño debido al tratamiento.

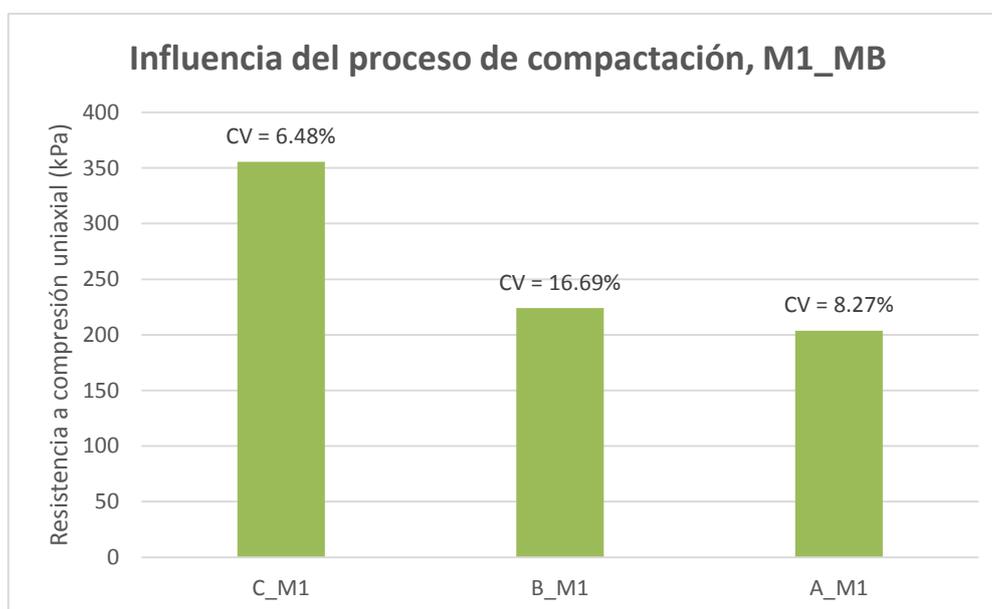


Figura 4. 9: Influencia del proceso de compactación en la mezcla 1 (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang).

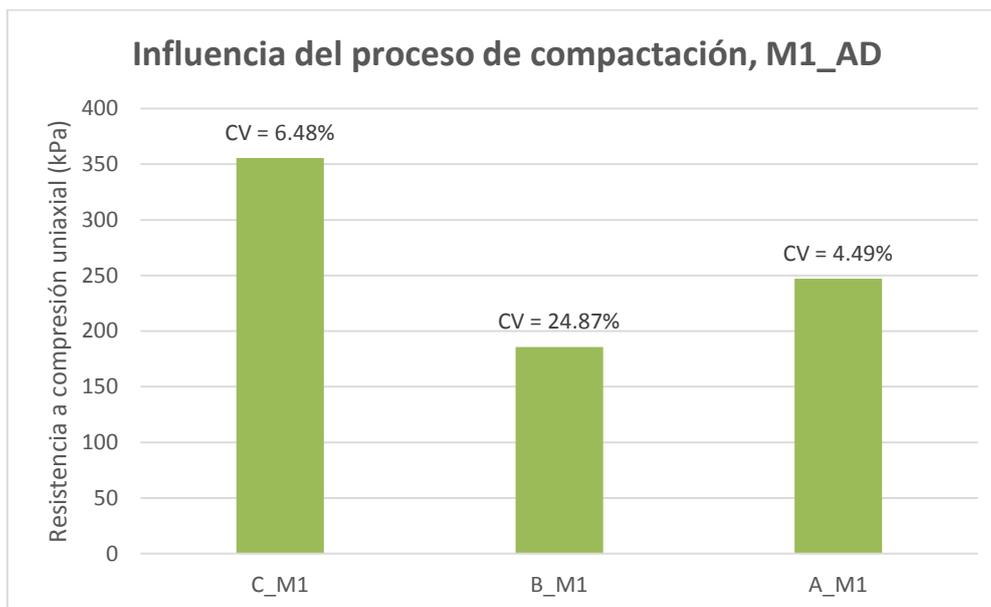


Figura 4. 10: Influencia del proceso de compactación en la mezcla 1 (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en agua destilada).

Tanto la Figura 4. 9 como la Figura 4. 10 muestran la influencia del proceso de compactación para las probetas de mezcla 1 realizadas con urea y calcio diluidos en medio Bang y agua destilada.

En primer lugar, al utilizar medio Bang para aportar urea y calcio se aprecia que las probetas compactadas antes de realizar el tratamiento muestran mayor resistencia a compresión que las de las compactadas a posteriori. La mezcla 1 está compuesta por un 65 % de arena fina, 25 % de arena gruesa, y 10 % de arcilla + limo. El material que se encuentra en mayor concentración en la M1 es la arena, lo que explicaría que se obtenga el mismo resultado que para el SS y el CS.

Sin embargo, en el caso de realizar los riegos enriquecidos con urea y calcio diluidos en agua destilada, las probetas compactadas después de realizar el tratamiento muestran mayor resistencia a compresión. Éste resultado no sería justificable a priori, ya que en el suelo no hay suficiente cantidad de arcilla para que pueda unir las partículas y que se produzca cementación. Posiblemente, la razón sea el alto grado de humedad durante la compactación comparado con la humedad óptima (mayor al 24%, frente al 3,3% de desviación promedio), teniendo en cuenta que la humedad de compactación en el resto de casos estaba siempre por debajo del 5%.

Tanto las probetas de control de M1, como las de CS muestran una mayor resistencia a compresión sin aplicar tratamiento que las mismas tratadas. Éste resultado puede deberse al mayor tamaño de los poros del suelo. Las partículas de M1, al ser de diferentes tamaños no pueden ordenarse y rellenar los grandes vacíos. Cuando la solución del tratamiento fluye en el suelo, ejerce tensión superficial hacia las partículas e intenta de ocupar su espacio, aumentando los vacíos finales y por lo tanto reduciendo la resistencia.

Capítulo 4. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión uniaxial

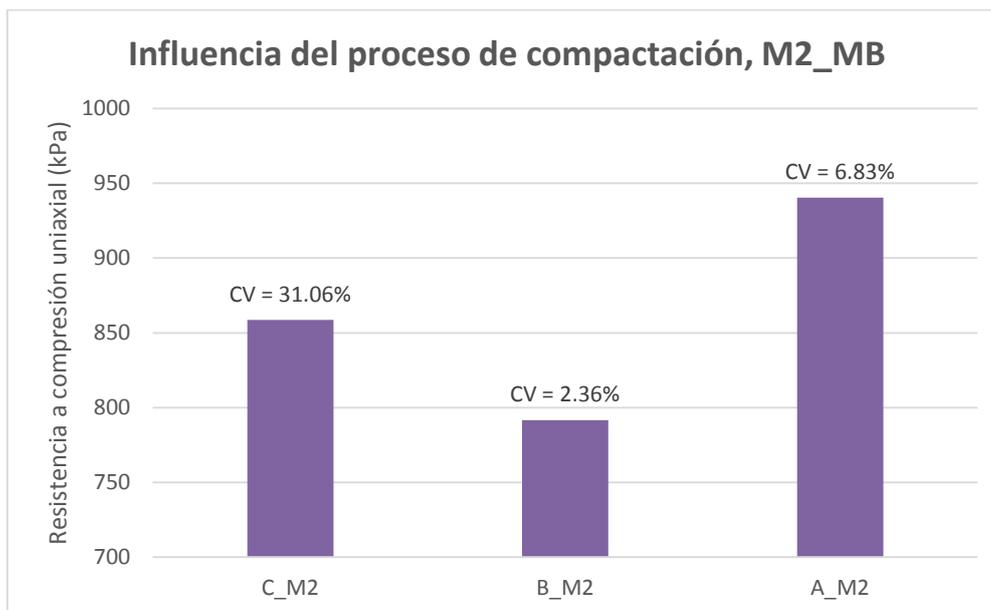


Figura 4. 11: Influencia del proceso de compactación en la mezcla 2 (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang).

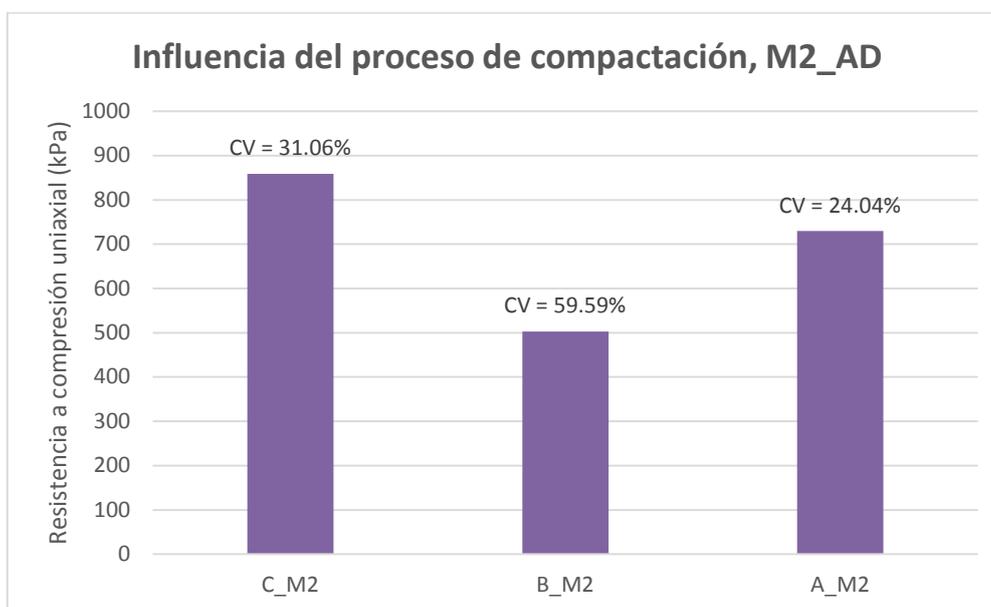


Figura 4. 12: Influencia del proceso de compactación en la mezcla 2 (con tratamiento realizado con urea y cloruro cálcico diluidos en agua destilada).

La Figura 4. 11 y también la Figura 4. 12 muestran la influencia del proceso de compactación para las probetas de mezcla 2 realizadas con urea y calcio diluidos en medio Bang en el primer caso y agua destilada en el segundo. El tratamiento realizado con urea y calcio diluidos en medio Bang (Figura 4. 11) es el que muestra mayor beneficio para la resistencia a compresión del suelo M2. Al igual que en el caso de la arena fina, para la M2 también resulta más beneficioso añadir una elevada concentración de bacterias. Sin los nutrientes que aporta el

medio Bang, las bacterias no pueden crecer y por lo tanto la producción de CaCO_3 en el suelo reduce, lo que se traduce en la diferencia de resultados respecto al agua destilada.

A diferencia de los otros tres tipos de suelo, para la M2 resulta mejor compactar después del tratamiento realizado. La mezcla 2 contiene alta concentración de arcilla, por lo que al compactar previamente al tratamiento, sus pequeñas partículas tapan los espacios vacíos del suelo y dificultan el acceso de los productos que se aportan mediante los riegos.

Finalmente, se puede observar que la M2 muestra mayor resistencia a compresión en comparación con los otros tres tipos de suelo debido a que la alta concentración de arcilla actúa como aglutinante y une las partículas.

4.4.4. Análisis de los resultados obtenidos.

En primer lugar, realizar los riegos enriquecidos utilizando medio Bang para aportar urea y calcio en lugar de agua destilada resulta más beneficioso en todos los casos. Diluir los productos que se aportan en el suelo sólo con agua destilada limita el crecimiento de las bacterias y por lo tanto la resistencia a compresión se reduce.

En segundo lugar, compactar antes de realizar los riegos enriquecidos es favorable para los suelos arenosos, debido a que el proceso de compactación reduce el tamaño de los poros en el suelo. Por el contrario, los suelos más arcillosos deben ser compactados después del tratamiento para facilitar el acceso de las bacterias y los nutrientes que se aportan.

Por último, los riegos realizados tanto antes como después de compactar afectan negativamente a los suelos con poros de mayor tamaño (CS y M1). El líquido aplicado para el tratamiento, al penetrar en el suelo, ejerce tensión superficial hacia las partículas e intenta ocupar su espacio. De esa manera abre los poros todavía más, arrastra las partículas de menor tamaño y afecta negativamente la estructura del suelo. Las nanopartículas del carbonato cálcico producido resultan incapaces de rellenar los grandes vacíos creados y la resistencia a compresión se reduce.

4.4.5. Conclusiones.

Promediando los resultados obtenidos comprobando la resistencia a compresión para cada ensayo, se concluye que el proceso de compactar muestra mayor beneficio para la arena fina y la mezcla 2. La tabla resumen de los resultados obtenidos para cada tipo de suelo se puede observar en el Anexo B, apartado B2.4. (Cálculo de los resultados obtenidos; tabla B2 15).

La arena fina muestra hasta un 32% de aumento de la resistencia a compresión no confinada. El mejor resultado se obtiene al compactar el suelo antes de realizar los riegos enriquecidos con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang.

La mezcla 2 por su parte, muestra un aumento de la resistencia hasta del 9,5%. El mejor resultado se obtiene al compactar el suelo después de realizar el tratamiento con urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang.

Capítulo 4. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión uniaxial

Capítulo 5: Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

5.1. Introducción.

En el presente capítulo se resume el estudio de la influencia de la MICP sobre los parámetros de respuesta a corte directo. Para llevar a cabo éste ensayo se prepararon probetas cúbicas de diferentes tipos de suelo con dimensiones que permitirían determinar su resistencia a corte directo. Se precisó la cantidad máxima de líquido que se podía aportar a una probeta y posteriormente, se realizaron tres pruebas con diferentes concentraciones de bacterias. Finalmente, las probetas de suelo se ensayaron a corte directo.

A continuación se describirán los materiales utilizados y el procedimiento del ensayo. Se presentarán los resultados experimentales obtenidos y por último, se detallan las conclusiones que se extraen.

En el anexo C queda recogida información más detallada de estos estudios experimentales.

5.2. Materiales utilizados.

Para realizar éste ensayo, en primer lugar se caracterizaron los tipos de suelo a estabilizar (los tipos de suelo que se utilizaron son los mismos que en el capítulo 4, punto 4.2. Materiales utilizados):

- Suelos de arena fina.
- Suelos de arena gruesa.
- Suelo arenoso con arcilla (M1; 65 % de arena fina, 25 % de arena gruesa, y 10 % de arcilla + limo).
- Suelo arcilloso con arena (M2; 45 % de arena fina, 15 % de arena gruesa, y 40 % de arcilla + limo).

Finalmente, se prepararon las soluciones para estabilizar el suelo:

- Nutrientes para las bacterias *Sporosarcina pasteurii*.
- Suspensión de *Sporosarcina pasteurii*.

5.3. Procedimiento experimental.

En primer lugar, se prepararon las probetas de suelo en moldes cúbicos de 10cm de lado. En el fondo de las probetas se colocó una rejilla metálica de ventilación y una malla de 75 µm que facilitó el desmoldado y aseguró que el tipo de suelo empleado quedaba bien sujeto durante el tratamiento bacteriano.

Capítulo 5. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

En segundo lugar se preparó la solución de cloruro cálcico, urea y medio Bang de 3,675 g/L, 20 g/L y 1g, respectivamente. La solución fue diluida en agua destilada dentro de un matraz aforado de 1 L.

De forma paralela, la suspensión de *Sporosarcina pasteurii* fue preparada por la Universidad Autónoma de Barcelona y fue entregada en dos envases de 480 mL y un tercer envase con 40 mL de medio Bang.

Posteriormente, se procedió a determinar empíricamente la cantidad de agua que se podía aportar a cada tipo de suelo sin que llegase a fluir. Se realizaron probetas cúbicas con los diferentes tipos de suelo y a partir de la masa, se calculó la cantidad de agua que se podía añadir. Conocer este volumen fue importante debido a que, si se añadía más fluido del necesario, éste saldría por el fondo de la probeta y se desperdiciaría llegando incluso a arrastrar las bacterias fuera de la probeta.

Una vez conocida la cantidad de agua que requería cada tipo de suelo, se calculó el volumen correspondiente de líquido a utilizar para el tratamiento.

A continuación, para cada tipo de suelo se realizaron 3 pruebas diferentes:

- *Probetas de control*: Se realizó un único riego con agua destilada.
- *Probetas de tratamiento realizado con baja concentración de bacterias*: La adición de las bacterias de estas probetas se realizó con una concentración baja: 1.10^7 cfu/ml.
- *Probetas de tratamiento realizado con alta concentración de bacterias*: La adición de las bacterias de estas probetas se realizó con una concentración alta: 1.10^9 cfu/ml.

Las bacterias se añadieron en la cantidad determinada a través de la aportación máxima de líquidos en una probeta. Pasadas 4 horas de la inoculación de bacterias se realizó una aportación de medio Bang de 16 ml. Tras otras 24h después de la primera inoculación se realizó una segunda aportación de 16 ml.

Los riegos enriquecidos se realizaban con urea (20 g/l) y cloruro de calcio (3,675 g/l) diluidos en medio Bang con la cantidad de fluido máximo a añadir determinado anteriormente, durante 5 días de 10 a 18h a cada 4 horas. Las cantidades de fluido máximo a añadir a las probetas cúbicas secas se pueden encontrar en el anexo C, tabla C1 2 (Tabla con las cantidades máximas de agua que se pueden añadir a la probeta cúbica seca).

Cuatro días después de realizar los riegos enriquecidos se desmoldaron las probetas cúbicas. Posteriormente, se dejaron secar en una base durante 2 semanas para garantizar su completo secado.

Por último, cuando las probetas estaban completamente secas, se procedía a realizar los ensayos de corte directo.

5.4. Resultados obtenidos de los ensayos.

En la Tabla 3. 1 se pueden observar los resultados de los ensayos a corte directo de las probetas cúbicas (0 = probeta de control; 1 = probeta de tratamiento realizado con baja

concentración de bacterias; 2 = probeta de tratamiento realizado con alta concentración de bacterias). Están marcados en rojo los valores negativos obtenidos para la cohesión c . El valor de la cohesión no puede ser negativo, por lo que se induce que las muestras SS-1, CS-0, CS-2, M1-0, M2-0 y M2-1 no muestran cohesión. Mención aparte merece el caso de M2-2, que se comenta al final de este punto.

Probetas	$\tan(\phi)$	c (kPa)	ϕ (°)	R^2
SS-0	0,6722	8,7	33,9	0,998
SS-1	0,7004	-12,3	35,0	0,999
SS-2	0,6259	38,5	32,0	0,850
CS-0	0,7828	-4,5	38,1	0,984
CS-1	0,6225	65,4	31,9	0,978
CS-2	0,6936	-12,3	34,7	0,983
M1-0	0,6446	-2,0	32,8	0,997
M1-1	0,5757	9,7	29,9	0,995
M1-2	0,5992	20,2	30,9	1,000
M2-0	0,7138	-6,7	35,5	0,991
M2-1	0,6798	-7,6	34,2	1,000
M2-2	1.4174	174,8	54,8	1

Tabla 5. 1: Resumen de resultados de los ensayos de corte directo.

- Cohesión c :

- *Arena fina*: Comparando los resultados obtenidos en las tres pruebas, se observa que la cohesión de SS aumenta hasta alcanzar 4,5 veces la inicial en la prueba con alta concentración de bacterias. En la prueba con baja concentración de bacterias, el suelo no muestra cohesión. Éste resultado puede deberse a la mayor cantidad de cristales unitarios producidos en el suelo, que ocupan los poros entre las partículas.
- *Arena gruesa*: A diferencia de la arena fina, la arena gruesa muestra un aumento en la cohesión en la prueba con baja concentración de bacterias. En las otras dos pruebas (alta concentración de bacterias y control), el CS no muestra cohesión. La baja concentración de bacterias produce cristales de CaCO_3 de tamaño inferior en comparación con las del CS, permitiendo una mayor cohesión.
- *Mezcla 1*: De los resultados de las tres pruebas de M1 se aprecia que solamente el hecho de añadir bacterias en el suelo ya aumenta su cohesión. En el caso de añadir alta concentración de bacterias, la cohesión aumenta hasta 2 veces la obtenida con baja concentración.
- *Mezcla 2*: La cohesión de M2 aumenta sólo en el caso de añadir una alta concentración de bacterias. En las otras dos pruebas (control y baja concentración de bacterias), el suelo no muestra cohesión.

Capítulo 5. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

En las dos mezclas de suelo, la alta concentración de bacterias aumenta su cohesión. Éste hecho puede deberse a que esta alta concentración produzca cementación del suelo, uniendo las partículas de diferente tamaño.

- Ángulo de fricción interna ϕ :
 - *Arena fina*: Los resultados obtenidos muestran un leve aumento en el ángulo de fricción para las probetas tratadas con baja concentración de bacterias. En las probetas tratadas con alta concentración, el ángulo de fricción incluso disminuye en comparación con el de control. Esto puede deberse a la forma de los cristales obtenidos. Una alta concentración de bacterias produce cristales de forma más ovalada en comparación con la baja, lo que puede facilitar el deslizamiento entre las partículas.
 - *Arena gruesa*: Ninguna de las pruebas realizadas con bacterias muestra un aumento del ángulo de fricción en comparación con la de control. Sin embargo, una alta concentración de bacterias muestra mejor resultado que una baja. La alta concentración produce cristales mayores de CaCO_3 que la baja. Una posible explicación de este fenómeno sería que un tamaño mayor de las partículas aumenta el ángulo de fricción.
 - *Mezcla 1*: Al igual que en los resultados obtenidos para el CS, el ángulo de fricción no aumenta al añadir bacterias en el suelo. Entre una baja y una alta concentración de bacterias, la alta muestra mejor resultado.
 - *Mezcla 2*: En las probetas tratadas con alta concentración de bacterias se aprecia un leve aumento en el ángulo de fricción respecto al de las probetas de control. En el caso de añadir una baja concentración, el ángulo incluso disminuye.

En las dos mezclas de suelo, una alta concentración de bacterias aumenta su ángulo de fricción. La razón puede deberse a que la alta concentración de bacterias reacciona con las partículas de arcilla dentro del suelo. Esto produce cristales de CaCO_3 de manera indirecta y rellena los vacíos entre las partículas.

Finalmente, Los resultados de los ensayos M2-2 (Mezcla 2 con alta concentración de bacterias) deben analizarse con especial atención puesto que solo se pudieron ensayar dos probetas, siendo el ajuste lineal directo y por lo tanto el valor de $R^2=1$, que no representa la dispersión de los ensayos. Aun así, se puede observar como la dispersión en los conjuntos de ensayos llevados a cabo es muy pequeña ($R^2>0,85$ en todos los casos y en prácticamente la totalidad se acerca a 1).

5.5. Análisis de los resultados obtenidos.

De los resultados obtenidos se aprecia que la introducción de bacterias, en cualquier concentración no parece contribuir a mejorar el ángulo de fricción interna. No obstante, para optimizar este parámetro resulta preferible utilizar la máxima concentración de bacterias en todos los suelos excepto en el caso de la arena fina (SS). En relación a la cohesión, se observa una tendencia similar: la cohesión es mucho mayor en todos los suelos con alta concentración de bacterias, excepto para la arena gruesa (CS).

5.6. Conclusiones.

A partir del análisis de los resultados obtenidos, se concluye que para las arenas arcillosas, **las arcillas arenosas y las arenas finas es preferible estabilizar el suelo con una concentración de bacterias lo mayor posible**. Por el contrario, las arenas gruesas deben estabilizarse con una concentración menor de bacterias. La tabla resumen del tipo de concentración más recomendable para cada suelo se puede observar en el anexo C, apartado C.4.1. (Tabla resumen; C1. 14).

Capítulo 5. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

Capítulo 6: Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probetas de suelo con el objetivo de determinar su capacidad portante

6.1. Introducción.

En el presente capítulo se estudió la tecnología de MICP desarrollada en un molde de mayores dimensiones que los anteriores, midiendo: 30cm x 55cm x 43cm (alto x largo x ancho). Se prepararon cuatro probetas de dos tipos de suelo distintos; se realizaron cálculos de cantidades de bacterias necesarias y riegos enriquecidos, y se definió el procedimiento de bioestabilización. Para conocer mejor sus aspectos se llevaron a cabo dos ensayos:

- Control del proceso de secado mediante ultrasonidos.
- Pruebas de placa de carga.

Finalmente, se analizaron los resultados comparativamente y se obtuvieron conclusiones.

A continuación, se describirán los materiales utilizados, el procedimiento del ensayo y su configuración. También se presentarán los resultados experimentales obtenidos mediante las dos pruebas y por último, se concluirá con las conclusiones que se extraen.

En el anexo D queda recogida información más detallada de estos estudios experimentales.

6.2. Materiales utilizados.

Para realizar éste ensayo, en primer lugar se caracterizaron los tipos de suelo a estabilizar. Éstos se eligieron en base a los resultados obtenidos en el capítulo 4 para las probetas cilíndricas compactadas. Los seleccionados fueron aquellos que mostraron los mejores resultados en el ensayo de compresión (anexo B2, tabla B2 15):

- Suelos de arena fina (SS).
- Suelo arcilloso con arena (M2; 45 % de arena fina, 15 % de arena gruesa y 40 % de arcilla + limo).

En el siguiente paso, se prepararon las soluciones para estabilizar el suelo:

- Nutrientes para las bacterias *Sporosarcina pasteurii* (solución de medio Bang, urea y cloruro cálcico).
- Suspensión de *Sporosarcina pasteurii*.

6.3. Procedimiento experimental.

Las probetas se prepararon en moldes de 30cm x 55cm x 43cm (alto x largo x ancho) y se llenaron hasta 25 cm de profundidad (más información sobre las probetas y el tratamiento realizado se puede encontrar en el siguiente punto 5.3.1. Configuración de los ensayos, del

presente documento). Estas dimensiones permitirían realizar un ensayo asimilable al de placa de carga aplicando presión sobre el terreno mediante una placa metálica de 20cm de lado. El suelo se recolectó una semana antes con el objetivo de tener el mismo grado de humedad durante los ensayos. Un día antes del inicio de los test se calculó la humedad real de los dos tipos de suelo.

En segundo lugar, la concentración bacteriana se definió a partir de la limitación de suministro de 1L de suspensión de *Sporosarcina Pasteurii*. Éste litro se diluyó en medio Bang hasta alcanzar la humedad óptima de compactación. Los suelos se mezclaron con la cantidad de bacterias y nutrientes preparada y posteriormente, se compactaron (unos antes y otros después) conforme el método Proctor Modificado. En 24 horas se realizó una segunda aportación de bacterias de 1L.

En tercer lugar, el tratamiento de las probetas se realizó durante 5 días de 10h a 18h a cada 4 horas. Una vez finalizado el tratamiento, se dejaron secar los suelos pesándolos diariamente para controlar la evolución de su masa hasta alcanzar la humedad óptima de compactación para aquellos que no habían sido compactados inicialmente. Cuando la humedad que contenían las probetas alcanzaba la humedad óptima, se procedió a compactarlas.

Finalmente, se dejó secar las muestras realizando mediciones de velocidad de transmisión con ultrasonidos para determinar cuándo se alcanzaba el equilibrio higrométrico, lo que supondría el final del proceso de bioestabilización. Más información sobre el control de la evolución de la humedad mediante ultrasonidos se puede encontrar en el anexo D, apartado D.3.5. (Control de la evolución de la humedad mediante ultrasonidos).

6.3.1. Configuración de los ensayos.

Dos tipos de probetas se prepararon para cada tipo de suelo:

- Arena fina:
 - *Probeta de control compactada:* Durante la compactación se realizó un único riego con agua destilada.
 - *Probeta compactada antes de iniciar los riegos enriquecidos:* los riegos de ésta probeta se realizaron con un volumen de 473 ml de urea (20 g/L) y cloruro de calcio (3,675 g/L) diluidos en medio Bang durante 5 días de 10 a 18h en intervalos de 2 horas.
- Mezcla 2:
 - *Probeta de control compactada:* Durante la compactación se realizó un único riego con agua destilada.
 - *Probeta compactada después de realizar los riegos enriquecidos:* los riegos de ésta probeta se realizaron con un volumen de 473 ml de urea (20 g/L) y cloruro de calcio (3,675 g/L) diluidos en medio Bang durante 5 días de 10 a 18h en intervalos de 2 horas.

6.4. Resultados obtenidos de los ensayos.

A continuación se presentan los resultados obtenidos mediante las pruebas realizadas. Los resultados se dividen en tres apartados diferenciados:

- Pruebas de placa de carga.
- Humedad del suelo en el momento del ensayo.
- Control de la evolución de la humedad mediante ultrasonidos.

6.4.1. Pruebas de placa de carga.

En la Figura 6. 1 y Figura 6. 2 están representadas gráficamente las comparativas de los resultados del ensayo de placa de carga de los dos tipos de suelo (los gráficos tensión-desplazamiento de cada probeta se pueden encontrar en el anexo D, apartado D.4. Resultados obtenidos). Se puede observar como los suelos bioestabilizados presentan un mayor coeficiente de balasto (rigidez) inicial. Tomando como referencia una deflexión de 5mm, el coeficiente de balasto del suelo M2 asciende un 40% (de 99,5kPa/mm del caso M2 control pasa a 138,9kPa/mm del caso M2 bioestabilizado) y el del suelo SS asciende un 52% (de 73,1kPa/mm del caso SS control pasa a 110,8kPa/mm del caso SS bioestabilizado).

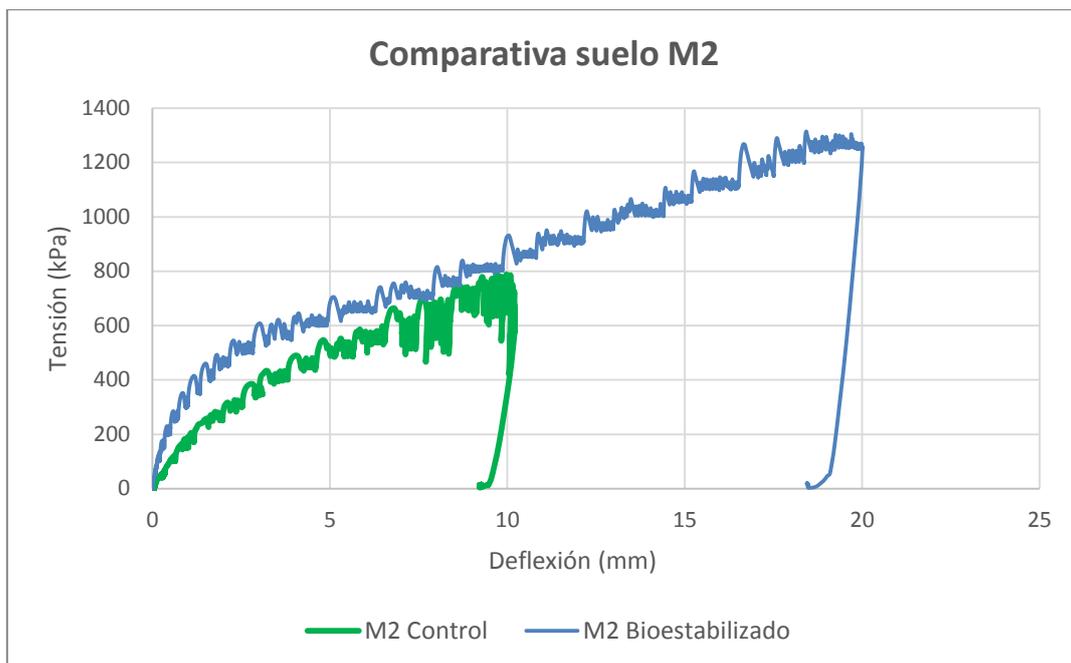


Figura 6. 1: Comparativa de los resultados del ensayo de placa de carga de los suelos tipo M2.

En el gráfico de la comparativa del suelo M2 (Figura 6. 1) se observa que la carga se puede mantener para una deflexión estable hasta alcanzar la capacidad del gato hidráulico para el suelo M2 bioestabilizado, lo que corresponde a una capacidad portante de más de 1,25MPa, mientras que el caso de control únicamente permite estabilizar el desplazamiento para una carga de 0,6MPa después de haber alcanzado una carga de 0,7MPa para la cual no se logró

cumplir la estabilización de la deflexión. Finalmente, ambas curvas muestran una tendencia similar en cuanto a la evolución de la rigidez del suelo alcanzando valores finales muy parecidos.

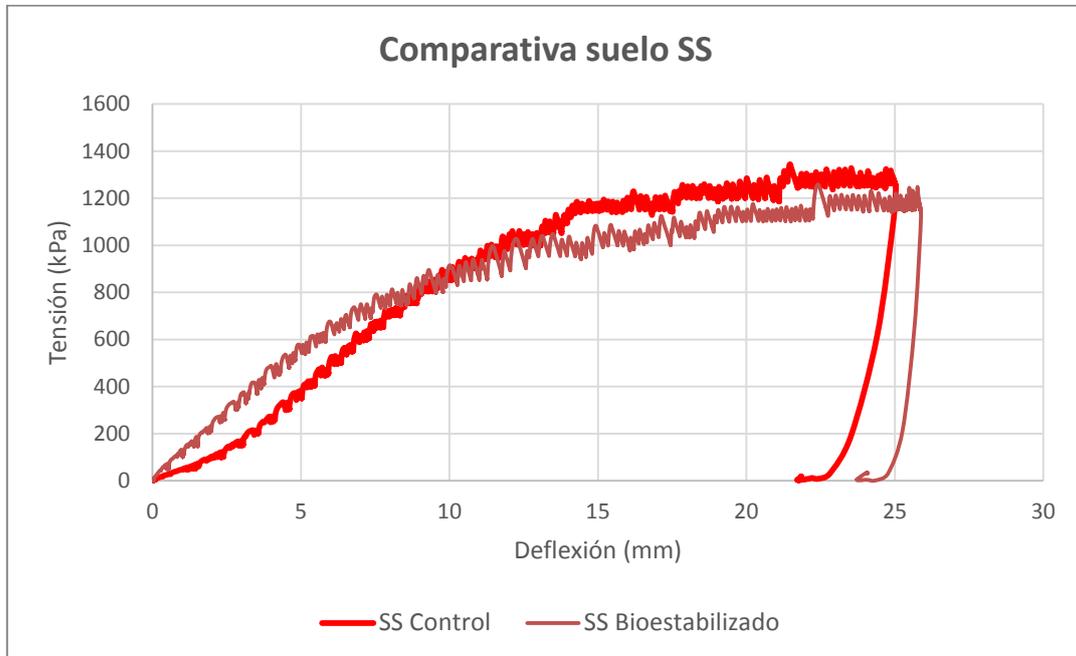


Figura 6. 2: Comparativa de los resultados del ensayo de palca de carga de los suelos tipo SS.

En el gráfico de la comparativa del suelo SS (Figura 6. 2) se observa que la carga se puede mantener para una deflexión estable hasta alcanzar la capacidad del gato hidráulico para el suelo SS de control, lo que corresponde a una capacidad portante de más de 1,25MPa, mientras que el caso bioestabilizado únicamente permite estabilizar el desplazamiento para una carga de 1,15MPa, lo que supone un descenso de la capacidad portante del 8%. Observando las curvas con mayor detalle puede verse que la pendiente final es prácticamente la misma, mostrando un coeficiente de balasto similar en esta última fase. Por su parte, la rigidez del suelo SS bioestabilizado va disminuyendo progresivamente hasta una deflexión de 10mm, mientras que la rigidez del suelo SS de control aumenta significativamente en el primer tramo (hasta una deflexión de 5mm).

La tabla del coeficiente de balasto de cada uno de los casos para los diferentes rangos de deflexión se puede observar en el anexo D, apartado D.4. (Resultados obtenidos), tabla D1 4.

6.4.2. Humedad del suelo en el momento del ensayo.

La Tabla 6. 1 muestra la humedad del suelo en las 4 probetas bajo la placa de carga en el momento del ensayo.

Suelo	Humedad (%)
<i>M2-control</i>	6,67
<i>M2 bioestabilizado</i>	0,87
<i>SS-control</i>	3,80
<i>SS bioestabilizado</i>	4,28

Tabla 6. 1: Humedad relativa de los suelos en el momento de ensayo.

Comparando las humedades puede apreciarse que las probetas con menor humedad en el momento del ensayo mostraron mejores prestaciones que las probetas comparables.

En particular, la mayor humedad de la probeta M2 de control en comparación con la M2 bioestabilizada podría justificar la imposibilidad de llegar a la carga máxima del gato hidráulico para el caso M2-control.

6.4.3. Control de la evolución de la humedad mediante ultrasonidos.

El control de evolución de la humedad se realizó a través de ultrasonidos mientras se aceleraba el proceso de secado mediante un foco halógeno de 500W durante dos períodos de 24h separados dos días entre ellos. Los ciclos de secado se detenían cuando el tiempo de transmisión demostraba que el suelo se encontraba en una humedad cercana o igual a la de equilibrio higrométrico con el entorno.

El incremento del tiempo de transmisión de la probeta M2 bioestabilizada después del secado demostraba que el suelo se encontraba ya con un nivel de humedad igual o inferior al del equilibrio higrométrico (contrastado con el valor de la humedad controlado sobre la probeta ensayada), por lo que se procedió a detener los ciclos de secado mediante foco dando el demostrador como listo para ensayo.

En el caso de la M2 de control el proceso de equilibrio higrométrico se dio por finalizado con variaciones inferiores al 1%.

En el caso de las probetas de arena fina, el tiempo de transmisión varía durante el proceso de secado. Tras un episodio de lluvia, el tiempo de transmisión aumentaba (incluso después de secar por segunda vez la probeta de SS bioestabilizada). Éste hecho mostraba que el proceso de secado se había finalizado, ya que las variaciones dependían más de la climatología que del proceso de secado. La igualdad de humedades post ensayo de carga entre ambas probetas de arena fina demuestran dicho equilibrio.

6.5. Conclusiones.

En este apartado se detallan las conclusiones de las pruebas de placa de carga y del control de la evolución de la humedad mediante ultrasonidos. Así mismo también se analiza el procedimiento de ejecución del ensayo.

6.5.1. Pruebas de placa de carga.

La bioestabilización de suelos arcillosos permite aumentar su rigidez inicial (40% para el caso estudiado), mantener el coeficiente de balasto en régimen lineal y aumentar la capacidad de carga (x2 para el caso estudiado).

La bioestabilización de suelos arenosos permite aumentar su rigidez inicial (52% para el caso estudiado), disminuye el coeficiente de balasto en régimen lineal y disminuye ligeramente la capacidad de carga (8% para el caso estudiado). Este comportamiento puede ser debido a haber efectuado el proceso de compactación antes del tratamiento bacteriano, lo que podría haber limitado de forma considerable el efecto del tratamiento a la capa superficial, dando lugar a mejores prestaciones únicamente en el tramo inicial del ensayo de placa de carga.

La bioestabilización no parece tener una influencia significativa sobre el coeficiente de balasto de los suelos a partir de una deflexión de 5mm para suelos arcillosos y 10mm para suelos arenosos. No obstante, antes de estas deflexiones límite, la bioestabilización aumenta de forma significativa el coeficiente de balasto. Este hecho puede estar relacionado con la mayor precipitación de calcita en la capa superficial del suelo tratado puesto que las bacterias tienen mayor aportación de nutrientes, calcio y oxígeno en esta zona.

6.5.2. Control de la evolución de la humedad mediante ultrasonidos.

El método de determinación de la humedad mediante ultrasonidos se mostró especialmente útil y permitió distinguir el momento en el que todas las probetas alcanzaban el equilibrio higrométrico de la superficie. A partir de ese instante las lecturas de tiempo se estabilizan o incluso aumentan indicando que el demostrador había comenzado a absorber humedad ambiental.

El hecho de tener que colocar los sensores sobre la misma superficie de la probeta (cara superior, a 10cm de distancia entre ellos, ya que el resto de superficies quedan tapadas por el molde) hizo que las lecturas al utilizar el sistema de medición de ultrasonidos presentasen mayor variabilidad que en el caso de las probetas cúbicas, en el que se podían colocar los sensores cara a cara, a ambos lados de la probeta de forma paralela. Esto es debido a las pequeñas diferencias que puedan existir en la distancia entre sensores y a la mayor variabilidad ambiental.

El método de estimación de humedad mediante ultrasonidos ha probado ser una técnica fiable en la configuración de disponer los sensores en orientación horizontal uno al lado del otro (10cm).

6.5.3. Procedimiento de ejecución del ensayo.

En primer lugar, la compactación de los suelos arcillosos resulta complicada de realizar mediante el impacto de pesos debido a la gran plasticidad de este tipo de terreno.

En segundo lugar, el aporte de riegos enriquecidos debería limitarse en el caso de suelos arcillosos, aumentando la concentración de las disoluciones debido a la aparente impermeabilidad que tienen este tipo de suelos. De no haberse reducido la cantidad de líquido

Capítulo 6. MICP en probetas de suelo con el objetivo de determinar su capacidad portante

aportado durante los riegos enriquecidos de la probeta M2 Bioestabilizada, el suelo hubiera alcanzado su saturación.

Por último, el procedimiento propuesto para los suelos arenosos no presentó ninguna complicación, dándose por completamente validado.

Capítulo 7: Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP)

7.1. Introducción.

En el presente capítulo se estudia la influencia del proceso de compactación sobre la permeabilidad de dos tipos de probetas de suelo, tratadas con MICP. Las primeras se realizaron en moldes cilíndricos de tamaño reducido, con 4 tipos de suelo y se compactaron de dos maneras: antes y después de realizar el tratamiento biológico. Las segundas se produjeron de arena fina y arcilla con arena, en moldes de mayores dimensiones que los anteriores, midiendo: 30cm x 55cm x 43cm (alto x largo x ancho) y también se compactaron de las dos maneras, en función del tipo de suelo.

A continuación se describirán los materiales utilizados y el procedimiento del ensayo para cada tipo de probeta. Posteriormente, se presentarán los resultados experimentales obtenidos y por último, se detallan las conclusiones que se extraen.

En el anexo E queda recogida información más detallada de estos estudios experimentales.

7.2. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas cilíndricas compactadas y tratadas con MICP.

7.2.1. Materiales utilizados.

Para realizar este ensayo, se utilizaron los materiales ya descritos en el capítulo 4, apartado 4.2. (Materiales utilizados):

- Suelos a estabilizar:
 - Suelos de arena fina.
 - Suelos de arena gruesa.
 - Suelo arenoso con arcilla (M1; 65 % de arena fina, 25 % de arena gruesa, y 10 % de arcilla + limo).
 - Suelo arcilloso con arena (M2; 45 % de arena fina, 15 % de arena gruesa, y 40 % de arcilla + limo).
- Soluciones para estabilizar e suelo:
 - Nutrientes para las bacterias *Sporosarcina pasteurii* (solución de medio Bang, urea y cloruro cálcico).
 - Suspensión de *Sporosarcina pasteurii*.

7.2.2. Procedimiento experimental.

Las probetas cilíndricas se crearon utilizando el mismo procedimiento que en el capítulo 4, apartado 4.4.1. (MICP en probeta cilíndrica compactada/Procedimiento experimental), que de forma resumida consistía en:

En primer lugar, la humedad óptima de compactación se obtuvo para cada tipo de suelo siguiendo las normas del ensayo Proctor Modificado (UNE 103-501-94).

En segundo lugar, la humedad real del suelo se calculó un día antes del inicio de los ensayos. A continuación se calculó la cantidad de bacterias que se debía aportar para cada tipo de suelo y posteriormente, se añadió con la concentración correspondiente. El suelo se mezcló con la cantidad de bacterias anteriormente calculada y se rellenaron los cilindros. Al igual que en el ensayo realizado en el capítulo 4, apartado 4.4. (MICP en probeta cilíndrica compactada), en éste también se fabricaron tres tipos de probetas para cada tipo de suelo (SS, CS, M1 y M2):

- Probetas de control compactadas.
- Probetas compactadas antes de iniciar los riegos enriquecidos.
- Probetas compactadas después de realizar los riegos enriquecidos.

Los riegos enriquecidos se realizaron con un único volumen de 1,4ml de urea (20 g/L) y cloruro de calcio (3,675g/L o 36,75g/L en función del tipo de suelo) diluidos en medio Bang. El tratamiento duró 5 días de 10 a 18h con periodos entre tratamientos de 2 o 4 horas.

En tercer lugar, se procedió a compactar las probetas conforme el método Proctor Modificado (unas antes y las otras después de realizar los riegos enriquecidos). Una vez finalizado el tratamiento y la compactación, las probetas se dejaron secar durante una semana.

Por último, cuando las probetas estaban completamente secas, se procedió a realizar los ensayos de porosidad y permeabilidad. La porosidad y la permeabilidad de las probetas cilíndricas de suelo se midieron mediante un permeámetro de carga constante modificado. El permeámetro se elaboró mediante un cilindro vacío que se unió en el extremo superior de la probeta de suelo. El cilindro vacío (el cilindro superior) se rellenó con 100ml de mezcla de agua y tinte azul y se dejó circular a lo largo del suelo. La evolución de la penetración del líquido aplicado (agua con tinte azul) y el tiempo recorrido se registraron mediante fotos y videos. El ensayo se daba por terminado cuando el agua empezaba a salir por la parte inferior del cilindro.

Estos ensayos siguen la ley de Darcy, que describe el flujo de fluidos en estado estacionario y en medios porosos. Más información sobre los ensayos de porosidad y permeabilidad se puede encontrar en el anexo E1: E1.3.1. (Determinación de la porosidad y la permeabilidad de las probetas cilíndricas).

7.2.3. Resultados obtenidos de los ensayos.

A continuación se presentan de forma gráfica los resultados obtenidos para la porosidad y la permeabilidad de los cuatro tipos de suelo. La permeabilidad del SS y el CS se representa en los gráficos de la trayectoria del fluido. Debido a que la trayectoria del fluido de la M1 y M2 no era visible, la permeabilidad se representó a través del decrecimiento del nivel del agua en el cilindro superior. Las tablas de los resultados obtenidos se pueden encontrar en el anexo E1,

apartado E1.4.1. (Permeabilidad de los 4 tipos de suelo) y E1.4.2. (Porosidad de los 4 tipos de suelo).

- Conceptos que se utilizan a lo largo de éste capítulo:
 - Altura crítica: La altura crítica muestra cambios en la velocidad y/o dirección del fluido durante su penetración en el suelo. Se podría definir como una alteración en la pendiente de la trayectoria, siendo muy acusada inicialmente y suavizándose posteriormente (Figura 7. 1).

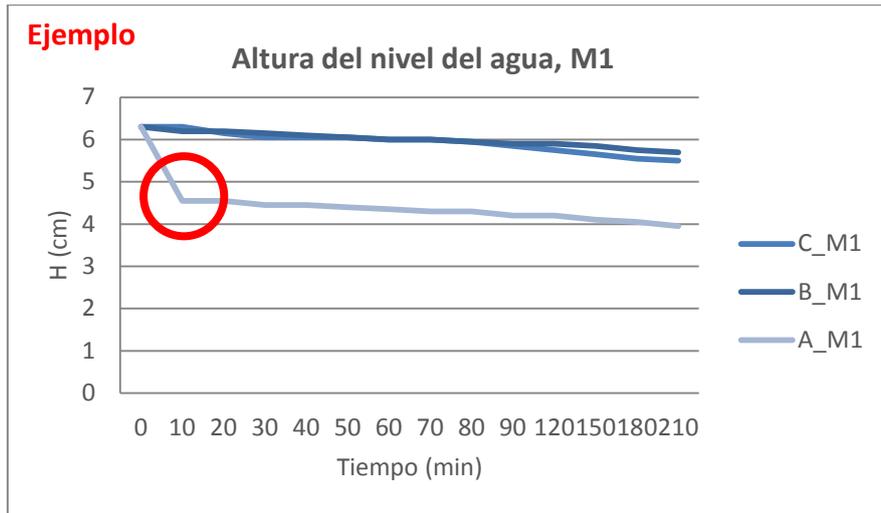


Figura 7. 1: Altura crítica: ejemplo.

7.2.3.1. Porosidad de los cuatro tipos de suelo.

Arena fina:

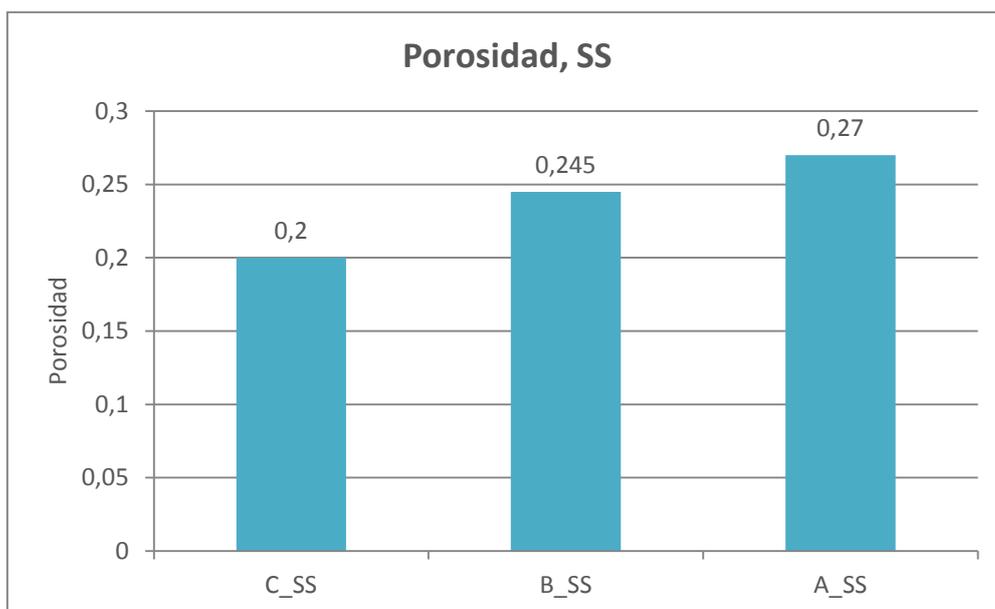


Figura 7. 2: Porosidad de la arena fina.

En la Figura 7. 2 se observa que las probetas realizadas con tratamiento tienen mayor porosidad que las de control. La razón podría ser el hecho de tratar el suelo con la solución. El tratamiento que fluye entre las partículas ejerce tensión hacia ellas, intentado ocupar su espacio. Las nanopartículas de carbonato de calcio creadas son demasiado pequeñas para sobrepasar el efecto del tratamiento. Al añadir agua, los espacios vacíos, creados por la solución aumentan todavía más y por lo tanto la porosidad también aumenta.

Las probetas compactadas después del tratamiento muestran mayor porosidad que las probetas compactadas antes. Éste resultado está relacionado con el método de compactación y el tamaño de las partículas del SS. Compactar el suelo en 3 capas, antes de realizar los riegos enriquecidos, reduce en mayor medida los espacios vacíos entre las partículas que hacerlo después, compactando sólo la parte inferior de la probeta. Por otra parte, el diámetro relativamente pequeño de las partículas ayuda a que el suelo alcance un grado alto de compactación y reduzca los espacios vacíos. Debido a esto, el flujo y el contenido de agua para ocupar el vacío disminuyen, y por lo tanto la permeabilidad también.

Arena gruesa:

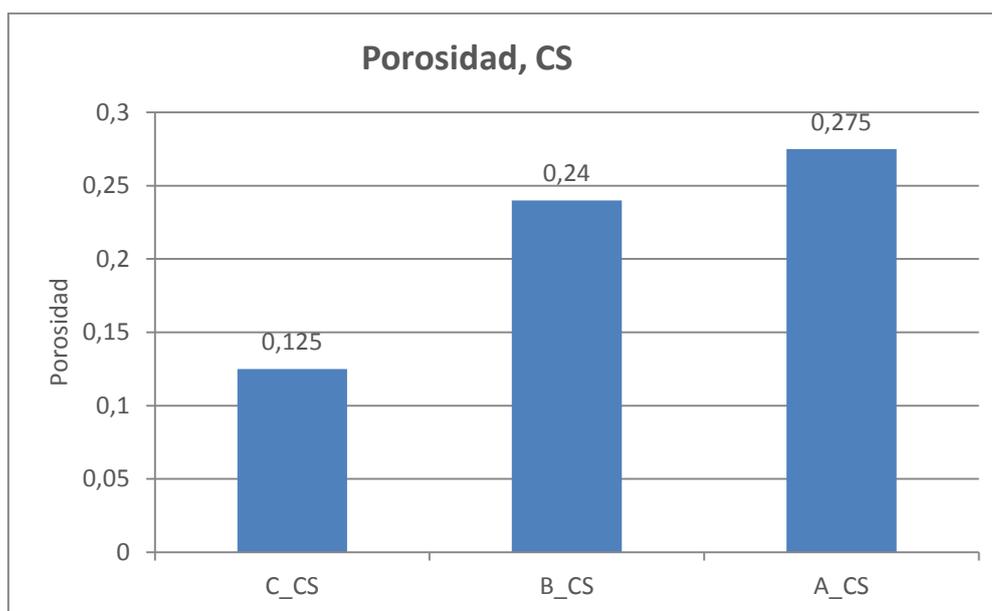


Figura 7. 3: Porosidad de la arena gruesa.

La Figura 7. 3 muestra la porosidad de la arena gruesa en función de los diferentes métodos de compactación. Al igual que en los resultados obtenidos en la arena fina, las probetas realizadas con tratamiento muestran mayor porosidad que las de control. La razón sería la misma que para el SS: el simple hecho de realizar un tratamiento aumenta la porosidad del suelo.

Las probetas compactadas antes del tratamiento realizado tienen menor porosidad que las compactadas después. Debido a la compactación antes del tratamiento, las partículas se ordenan lo más cerca posible unas de otras. Los espacios vacíos en dirección radial (perpendicular a la fuerza de compresión) disminuyen. Sin embargo, los en dirección axial (en

paralelo a la fuerza de compresión) están menos afectados y por lo tanto el agua fluye hacia abajo en el suelo sin inundar la probeta.

Mezcla 1:

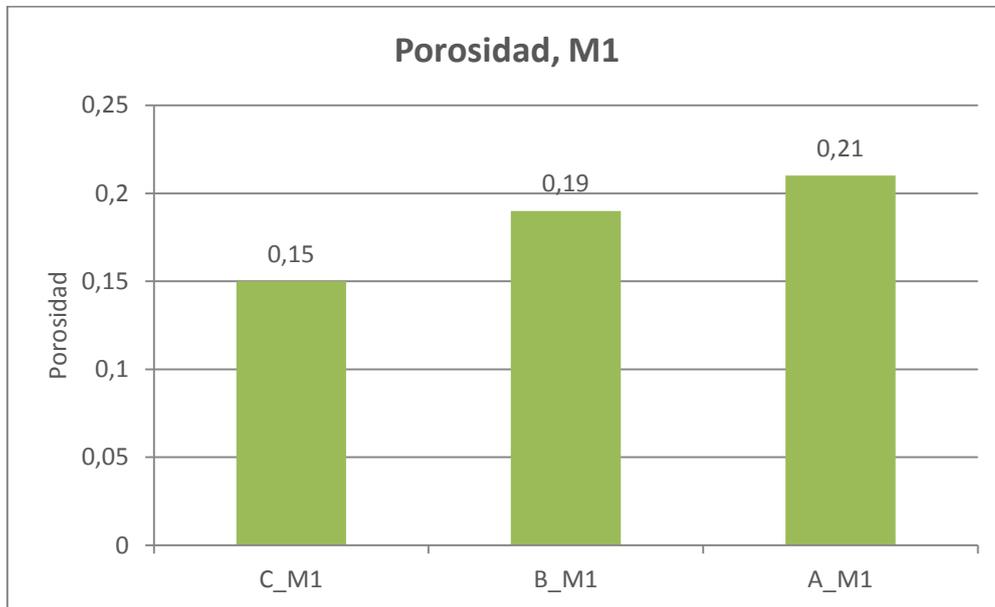


Figura 7. 4: Porosidad de la mezcla 1.

En la Figura 7. 4 se observa la porosidad de la mezcla 1 en los diferentes métodos de compactado. Las probetas realizadas con tratamiento tienen mayor porosidad que las de control. El mismo resultado se ha observado para el SS y el CS.

Por otra parte, las probetas compactadas antes del tratamiento realizado tienen menor porosidad que las compactadas después. En general las mezclas de suelo que contienen arcilla tienen muy poca permeabilidad y porosidad. No obstante, la mayor parte del compuesto M1 está formado por arena fina (65%) y arena gruesa (25%), lo que evita la plasticidad de la arcilla, causa irregularidad en el tamaño de las partículas y genera más espacios vacíos.

Las probetas compactadas después del tratamiento realizado tienen mayor porosidad que las compactadas antes. Éste incremento se debe al proceso de compactación. Al compactar la probeta, se rompen partes de la cementación causada por la arcilla y se crean más espacios vacíos. De esta manera, el agua puede penetrar mejor en la probeta. Además, los riegos enriquecidos pueden pasar más fácil en la M1 no compactada, creando una mejor distribución del carbonato cálcico en el suelo.

Mezcla 2:

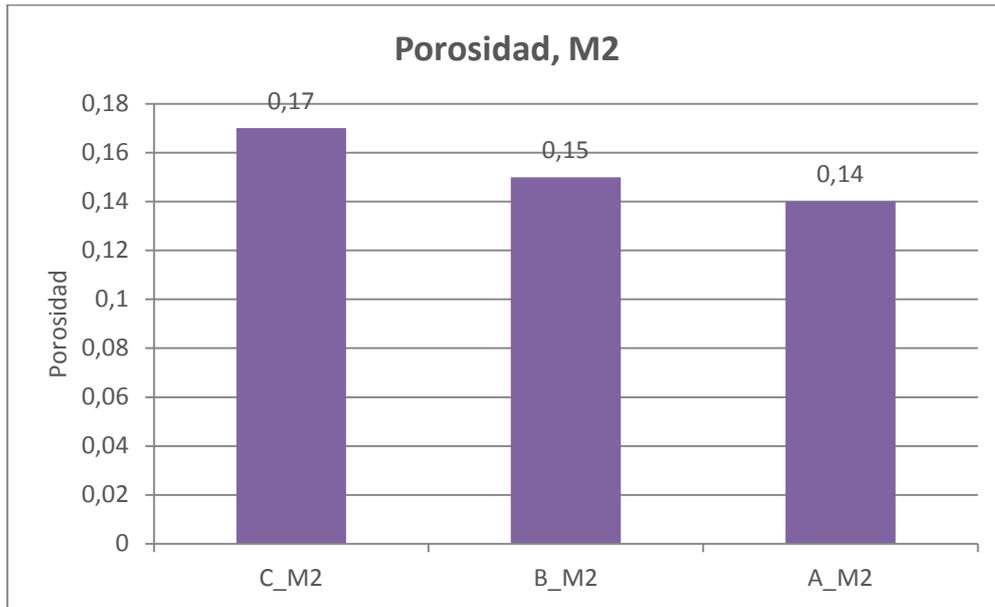


Figura 7. 5: Porosidad de la mezcla 2.

En la Figura 7. 5 se observa la porosidad de la mezcla 2 en función de los diferentes métodos de compactado. A diferencia de los otros tres tipos de suelo, las probetas de control tienen mayor porosidad que las realizadas con tratamiento. Una posible razón sería el hecho de no añadir riegos enriquecidos que formen partículas de carbonato cálcico en el suelo. El carbonato de calcio precipitado en los poros actúa como distribuidor alrededor de las partículas y aumenta la cantidad del líquido que circula en el suelo. Sin partículas de CaCO_3 en el suelo, el líquido se retiene por el alto contenido de arcilla en la mezcla. La cantidad del líquido retenido aumenta la porosidad calculada de la M2.

En la figura se aprecia que a diferencia de los otros tres tipos de suelo, las probetas compactadas antes del tratamiento realizado tienen mayor porosidad que las compactadas después. Esto es debido a la compactación aplicada antes de los riegos enriquecidos; la cementación causada por la arcilla en dirección axial se rompe, creando espacios vacíos. Posteriormente, el tratamiento fluye entre ellos y aumenta la porosidad del suelo.

7.2.3.2. Permeabilidad de los cuatro tipos de suelo.

Arena fina:

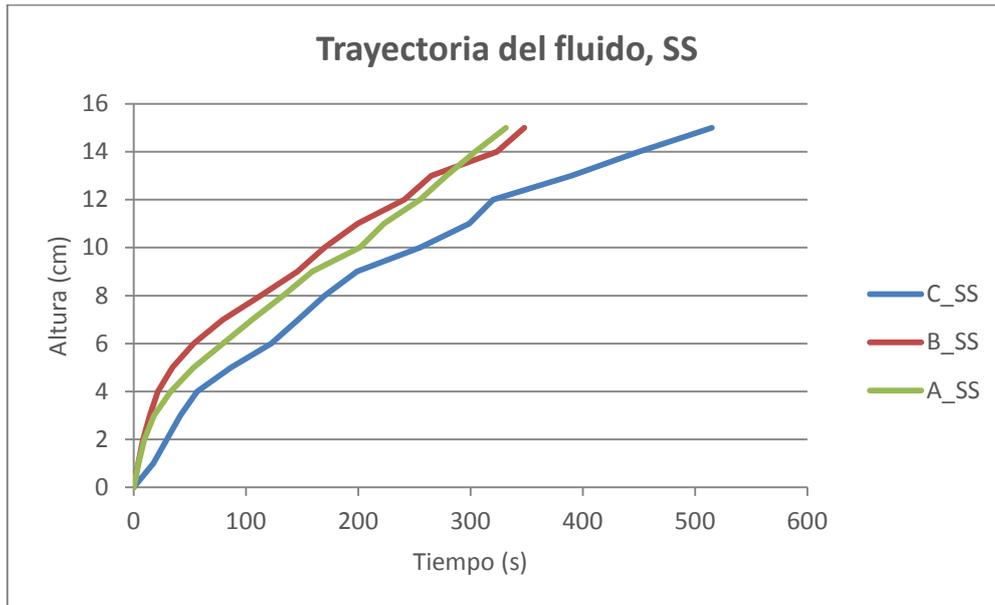


Figura 7. 6: Trayectoria del fluido en la arena fina.

La Figura 7. 6 muestra el promedio de las trayectorias del fluido para los tres tipos de probetas. Comparando las trayectorias de las probetas a las que se les ha aplicado tratamiento (tanto antes como después de compactar) con las de control se aprecia que las primeras tienen una trayectoria más corta (tardan menos tiempo en llegar al fondo de la probeta). El hecho de añadir un tratamiento aumenta el flujo de líquidos en el suelo y el agua necesita menos tiempo para llegar al fondo de la probeta.

También se aprecia que la pendiente de la trayectoria de las probetas realizadas con tratamiento, es inicialmente muy acusada, descendiendo rápidamente los tres primeros centímetros (altura crítica). Después de ésta cota, las pendientes se suavizan. Estas alteraciones en la trayectoria del fluido muestran cambios en la permeabilidad y la distribución del carbonato de calcio precipitado entre las partículas.

Las probetas compactadas después del tratamiento realizado muestran una disminución en la pendiente más pronunciada que las compactadas antes. La razón puede ser el método de compactación. Debido a que las probetas compactadas después del tratamiento se compactan solo en la parte superior, la superficie de la probeta (hasta la altura $H=3\text{cm}$) queda mejor compactada en comparación con la parte inferior.

La velocidad del fluido en las probetas compactadas antes del tratamiento es mayor que en las compactadas después. Debido al método de compactación de las probetas compactadas antes, la permeabilidad disminuye e impide a la óptima distribución del carbonato cálcico a lo largo de la probeta. Como se ha mencionado anteriormente, el carbonato de calcio precipitado en los poros actúa distribuyendo el fluido y aumentando la cantidad de líquido que circula en dirección radial. Por tanto, dado que la cantidad del CaCO_3 precipitado en el suelo es poca, el líquido que circule en dirección axial aumentará. Debido a esto, el fluido llega con mayor velocidad al fondo de la probeta.

Capítulo 7. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

Las probetas compactadas después del tratamiento tienen mayor permeabilidad y la solución penetra con mayor facilidad en el suelo. Esto, aumenta la distribución del fluido y la cantidad de CaCO_3 precipitado en el suelo. La mayor cantidad de partículas de carbonato cálcico aumenta el flujo de líquidos en dirección radial. Por lo tanto, el fluido requiere más tiempo para que ocupe todos los espacios vacíos en el suelo antes de que pueda fluir hacia el fondo.

Arena gruesa:

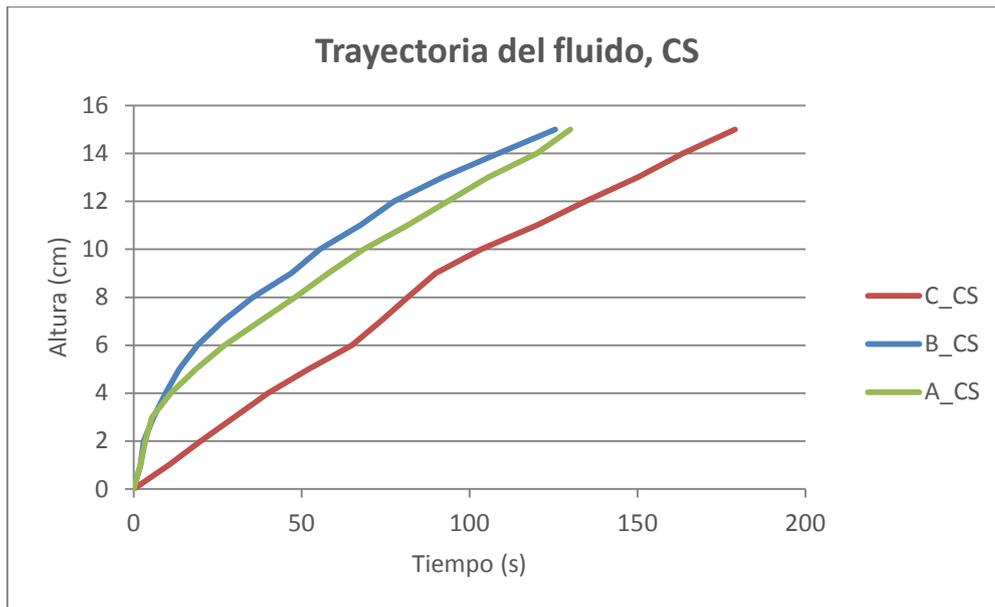


Figura 7. 7: Trayectoria del fluido en la arena gruesa.

En la Figura 7. 7 se aprecia el promedio de la trayectoria del fluido para los tres tipos de probetas. Al igual que en los resultados obtenidos para la arena fina, las trayectorias de las probetas a las que se les ha aplicado tratamiento (tanto antes como después compactar) son más cortas (tardan menos tiempo en llegar al fondo de la probeta) que las de control. Al igual que en los resultados de la arena fina, la pendiente inicial de la trayectoria se muestra muy pronunciada hasta la altura $h=4\text{cm}$ y posteriormente, las pendientes se suavizan. El motivo sería el mismo que en el caso de la arena fina.

Comparando las trayectorias del fluido de las probetas compactadas antes con las compactadas después del tratamiento realizado, se aprecia que ambas son similares, sin embargo las probetas compactadas después muestran una disminución en la pendiente de la trayectoria más drástica que las compactadas antes. Al igual que la arena fina, éste resultado puede deberse al método de compactación que es más efectivo en la parte superior de la probeta.

La velocidad del fluido en las probetas compactadas antes del tratamiento es mayor que en las compactadas después. Éste resultado también se observa en la arena fina; el carbonato de calcio precipitado en los poros actúa como distribuidor de fluidos y aumenta la cantidad del

líquido que circula en el suelo. La poca cantidad de cristales de CaCO_3 disminuye el tiempo necesario para la circulación del fluido y por lo tanto su velocidad aumenta.

La pendiente de la trayectoria del fluido de las probetas de control es prácticamente constante. Sin embargo, ésta pendiente debería ser parecida a las realizadas con tratamiento. Debido a la compactación del suelo, inicialmente debería ser más pronunciada y proseguir con una pendiente más suave. Cabe la duda de que la compactación de estas probetas no se haya realizado correctamente.

Mezcla 1:

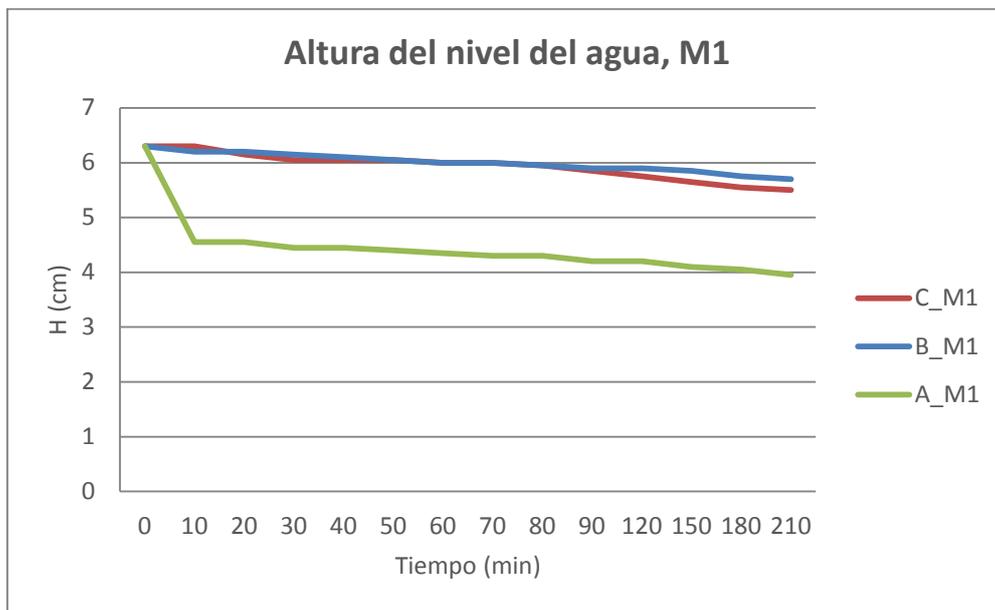


Figura 7. 8: Altura del nivel del agua en el cilindro superior de la mezcla 1.

La Figura 7. 8 representa el promedio de la altura del nivel del agua en el cilindro superior. La trayectoria del fluido en el la mezcla 1 no era visible en el cilindro inferior y como alternativa, los cambios en la permeabilidad del suelo se representaron a través de la altura del líquido en función del tiempo en el cilindro superior.

Se observa que las probetas compactadas después del tratamiento (A_M1) muestran una altura crítica mucho más pronunciada en comparación con las de control y las compactadas antes. La razón está explicada anteriormente en el apartado de la porosidad de la mezcla 1 (Apartado 7.2.4.1. Porosidad de los cuatro tipos de suelo; mezcla 1).

Las probetas compactadas antes y después del tratamiento realizado muestran una altura crítica, al igual que los dos tipos de arena. Sin embargo, la altura crítica de las probetas compactadas antes del tratamiento es notablemente menor. Éste resultado puede ser debido al contenido de arcilla en la mezcla. La arcilla une las partículas y produce cementación. Al compactar el suelo antes del tratamiento realizado, la unión entre las partículas aumenta y la permeabilidad disminuye.

Mezcla 2:

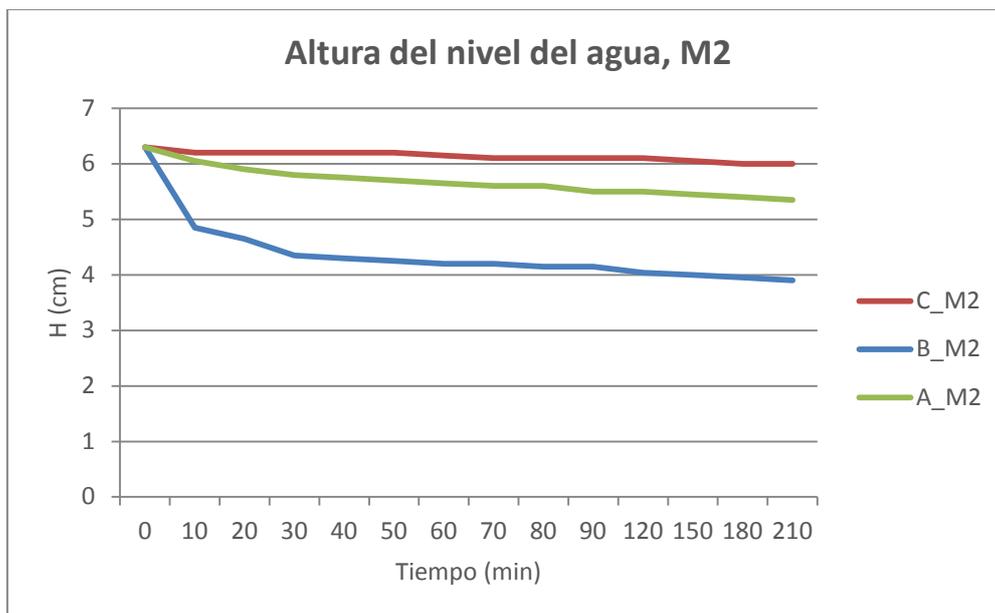


Figura 7. 9: Altura del nivel del agua en el cilindro superior de la mezcla 2.

La Figura 7. 9 representa el promedio de la altura del nivel del agua en el cilindro superior. De forma análoga a M1 y por los mismos motivos, los cambios en la permeabilidad de la mezcla 2 también se representaron a través de la altura del líquido en función del tiempo.

En la figura se aprecia que las probetas compactadas antes del tratamiento muestran una altura crítica más pronunciada en comparación con las de control y las compactadas después. Éste resultado justifica lo obtenido en el apartado de porosidad (Apartado 7.2.4.1. Porosidad de los cuatro tipos de suelo; mezcla 2).

Se aprecia que la pendiente de las probetas de control es prácticamente constante. Esto demuestra lo comentado anteriormente: la mezcla 2 es prácticamente impermeable sin la necesidad de ningún tratamiento realizado que produzca partículas de CaCO_3 . El alto contenido de arcilla une las partículas y elimina los espacios vacíos. La disminución mínima de la pendiente se debe únicamente a la cantidad de agua absorbida por la arcilla.

7.2.4. Análisis de los resultados obtenidos.

En primer lugar, la porosidad de los suelos del SS, CS y M1 aumenta al añadir un tratamiento, debido a la tensión que el ejerce. No obstante, la porosidad de la M2 con arena disminuye, debido a la saturación del suelo por la arcilla.

En segundo lugar, la porosidad de los suelos SS, CS y M1 compactados antes del tratamiento realizado es menor que los compactados después. Por el contrario, la porosidad del suelo M2 compactado antes es mayor. Compactar antes de realizar el tratamiento disminuye los espacios vacíos en suelos con mayor tamaño de las partículas. No obstante, al compactar antes los suelos con mayor concentración de arcilla, se rompe la cementación causada por la misma y aumentan los espacios vacíos.

En tercer lugar, la permeabilidad de las probetas realizadas con tratamiento de los cuatro tipos de suelo aumenta en comparación con las de control. El hecho de añadir un tratamiento aumenta el flujo de líquidos en el suelo y el agua necesita menos tiempo en llegar al fondo de la probeta.

En cuarto lugar, en el caso del SS, CS y M1, las probetas compactadas antes del tratamiento realizado muestran menor permeabilidad hasta la altura crítica en comparación con las de después. Al compactar el suelo antes de realizar un tratamiento, los espacios entre las partículas en dirección radial se cierran. Éste hecho facilita que al realizar el tratamiento, los espacios entre las partículas se rellenen con las nanopartículas de CaCO_3 . Posteriormente, al añadir agua, el líquido fluye en dirección axial (vertical) y aumenta la permeabilidad. En el caso de la M2, las probetas compactadas antes del tratamiento realizado muestran mayor permeabilidad que las de después. Al compactar el suelo antes, la cementación producida por la arcilla se rompe y crea espacios vacíos. Posteriormente, al añadir el tratamiento los poros se abren todavía más y aumentan la permeabilidad.

Por último, la permeabilidad del suelo disminuye después de la altura crítica. En el caso del SS, CS y M1, las probetas compactadas después de los riegos enriquecidos muestran menor permeabilidad en comparación con las de antes. Debido al método de compactación después del tratamiento, la cantidad de los poros en suelo es mayor en comparación con el de antes. Esto permite que se precipite mayor cantidad de carbonato cálcico y provoca el flujo del agua en dirección radial. De esta manera la permeabilidad del suelo disminuye después de la altura crítica. En el caso de la M2, las probetas que muestran menor permeabilidad son las compactadas antes del tratamiento realizado. El alto contenido de arcilla evita el flujo de líquidos en suelo sin ninguna fuerza aplicada anteriormente.

7.2.5. Conclusiones.

La porosidad está estrechamente relacionada con la permeabilidad. Un aumento en la porosidad provoca un aumento en la permeabilidad también. La permeabilidad depende de varios factores: el tamaño y la distribución de las partículas, los poros del suelo y el contenido de arcilla.

Los suelos arenosos y los suelos arenosos con arcilla tienen un tamaño mayor de los poros en comparación con los suelos arcillosos. Si éste tamaño disminuye, los cristales de CaCO_3 podrán crecer mejor y la permeabilidad y la porosidad disminuirán. Con el objetivo de cerrar los poros, es mejor compactar los suelos arenosos y los suelos arenosos con arcilla antes de realizar un tratamiento.

Los suelos arcillosos con arena contienen alta concentración de arcilla que produce cementación y causa la saturación del suelo. Al compactar el suelo antes de añadir un tratamiento, la cementación se rompe. El hecho permite la penetración de la solución y evita la saturación causada por la arcilla.

7.3. Determinación de la permeabilidad de las probetas de suelo compactadas y tratadas con MICP.

7.3.1. Materiales utilizados.

Para realizar este ensayo, se utilizaron los materiales ya descritos en capítulo 6, apartado 5.2. (Materiales utilizados):

Capítulo 7. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

- Suelos a estabilizar:
 - Suelos de arena fina (SS).
 - Suelo arcilloso con arena (M2; 45 % de arena fina, 15 % de arena gruesa y 40 % de arcilla + limo).
- Soluciones para estabilizar el suelo:
 - Nutrientes para las bacterias *Sporosarcina pasteurii* (solución de medio Bang, urea y cloruro cálcico).
 - Suspensión de *Sporosarcina pasteurii*.

7.3.2. Procedimiento experimental.

En este ensayo se utilizaron las mismas 4 probetas que en el capítulo 6. Estas probetas se produjeron en moldes con mayores dimensiones de 30cm x 55cm x 43cm (alto x largo x ancho) y se llenaron hasta 25 cm. Su proceso de producción, en forma resumida consistía en:

En primer lugar, se prepararon 2 probetas de cada tipo de suelo (M2 y SS): las primeras se elaboraron con tratamiento realizado y compactadas y las segundas probetas de control simplemente compactadas para poder comparar.

En segundo lugar, la humedad real del suelo se calculó un día antes del inicio de los ensayos. A continuación se calculó la cantidad de bacterias que se debía aportar para cada tipo de suelo y posteriormente, se definió la concentración bacteriana a emplear. La concentración de bacterias calculada se añadió a las probetas a estabilizar y finalmente, se compactaron las probetas de control y la probeta de SS bioestabilizada. Para más información sobre las probetas y el tratamiento realizados, consultar el punto 5.3.1. (Configuración de los ensayos) del capítulo 6.

En tercer lugar, el control de evolución de la humedad se realizó mediante ultrasonidos mientras se aceleraba el proceso de secado instalando un foco halógeno de 500W durante dos períodos de 24h separados dos días entre ellos. El proceso completo del control de la evolución de la humedad mediante ultrasonidos está descrito en el Anexo D, apartado D.3.5.

En cuarto lugar, se realizó el ensayo de placa de carga con el objetivo de determinar la capacidad resistente de las diferentes probetas de forma comparativa. El procedimiento completo de la realización del ensayo placa de carga está descrito en el Anexo D, apartado D.3.6. Los resultados obtenidos del ensayo están mostrados en el capítulo 6, apartado 5.4. (Resultados obtenidos de los ensayos).

Por último, los ensayos de permeabilidad en corte transversal se realizaron 4 meses tras las pruebas de placa de carga. En éstos se utilizaron las caras laterales de las probetas, sin tener en cuenta las caras superior e inferior. Las probetas se desmoldaron y a la superficie se situaron 10 puntos a distancia de 10 cm a partir de las esquinas. En las caras de mayor superficie, también se colocaron puntos en el medio. Posteriormente, en los puntos seleccionados se situaron goteros y se dejó gotear agua en el suelo. La evolución de la penetración del líquido aplicado (agua con tinte azul) se registró mediante fotos y videos.

7.3.3. Resultados obtenidos.

A continuación se presentan de forma gráfica los resultados obtenidos mediante las pruebas y las mediciones realizadas. Los resultados se dividen en tres apartados diferenciados:

- Trayectoria del fluido en direcciones axial y radial.
 - Avance del fluido.
 - Intensidad del avance del fluido.
- Conceptos que se utilizan a lo largo de éste capítulo:
- Zona del tratamiento: Se podría definir como el espacio tridimensional superior de las probetas bioestabilizadas, es decir la superficie externa de la cara superior y la profundidad hasta la que ha penetrado el tratamiento. En ésta zona hay mayor cantidad de CaCO_3 precipitado, debido a lo cual, el fluido ocupa primero los espacios vacíos en la dirección radial (la componente radial de la velocidad es mayor que la axial), antes de que pueda fluir libremente hacia el fondo.
 - Límite del tratamiento: El fin de la zona del tratamiento. Después de traspasar la zona de tratamiento, el fluido cambia su velocidad en las dos direcciones, comenzando a fluir mayoritariamente en dirección axial.

7.3.3.1. Trayectoria del fluido en direcciones axial y radial.

En las siguientes figuras se observa de forma resumida la trayectoria promediada (promedio de 10 puntos representativos del límite de la superficie) del fluido en direcciones axial y radial para las cuatro probetas (M2 bioestabilizada, M2 de control, SS bioestabilizada y SS de control). En las 4 figuras, las dos trayectorias representan las alturas del agua en dirección radial y axial a lo largo de 105 minutos. La probeta de M2 bioestabilizada necesitó más tiempo para llegar a la misma altura que las otras tres probetas y por ésta razón el tiempo está representado hasta 210 minutos (Figura 7. 9).

M2 bioestabilizada:

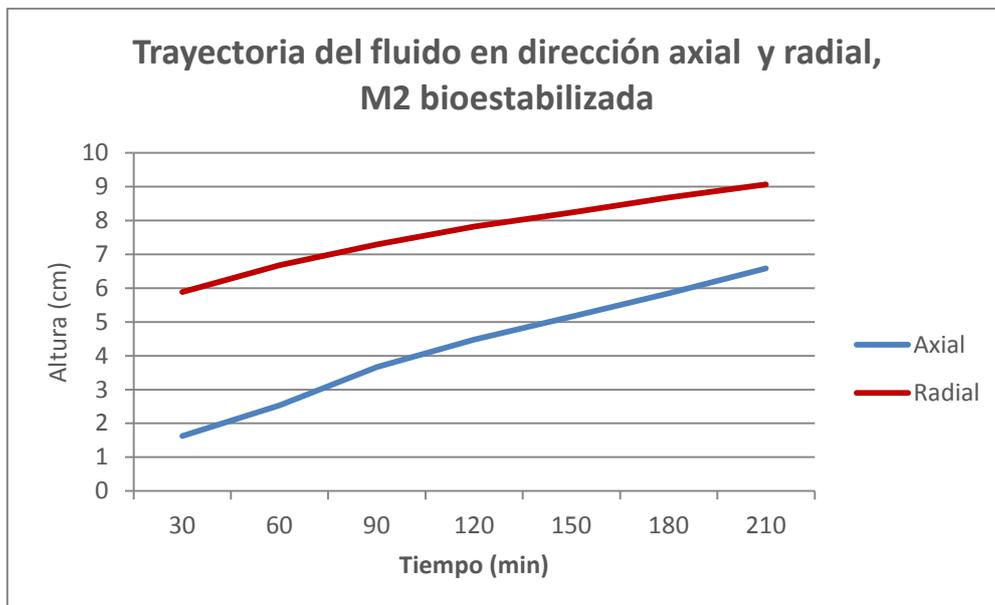


Figura 7. 10: Trayectoria del fluido en las direcciones axial y radial, M2 bioestabilizada.

Capítulo 7. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

Comparando las pendientes de las trayectorias en las dos direcciones se aprecia que la pendiente de la dirección radial es mayor que la de la dirección axial durante todo el ensayo. Tras los primeros 30 minutos, el agua en la dirección radial llega a 5,8 cm de altura, mientras que en la dirección axial, tan sólo a 1,6 cm. Éste resultado se debe a dos razones: En primer lugar, la mayor parte de la calcita se precipitó en la capa superficial del suelo, debido a que la segunda aportación de bacterias y los riegos enriquecidos se realizaron por encima de la probeta, donde las bacterias tienen mayor aportación de nutrientes, calcio y oxígeno (zona del tratamiento). En segundo lugar, el alto contenido de arcilla disminuye el tamaño de los poros y reduce el flujo de líquidos en suelo.

Se observa diferencia en las velocidades de penetración del fluido en los diez puntos. Por ejemplo, el fluido en 30 min en el punto C2 llega a 2 cm en dirección axial y 6 cm en dirección radial mientras que en el punto D1 llega a 0,5 cm en dirección axial y 9 cm en dirección radial. Pasados 210 minutos, en el punto C2, el fluido llega a 8 cm en dirección axial y 8 cm en dirección radial mientras que en el punto D1 llega a 3,5 en dirección axial y 15,7 en dirección radial. La diferencia en las velocidades también puede ser causada por el modo en el que se aportaron las bacterias y se realizaron los riegos enriquecidos. Realizar la aportación de las bacterias y los nutrientes por encima de la probeta causa una distribución irregular del carbonato cálcico producido en el suelo. Debido a que el carbonato cálcico aumenta el flujo de líquidos, el fluido requiere más tiempo para ocupar los espacios vacíos en el suelo antes de que pueda fluir hacia el fondo. En las zonas con menor cantidad de CaCO_3 precipitado, el líquido tarda menos tiempo en llegar al fondo.

M2 control:

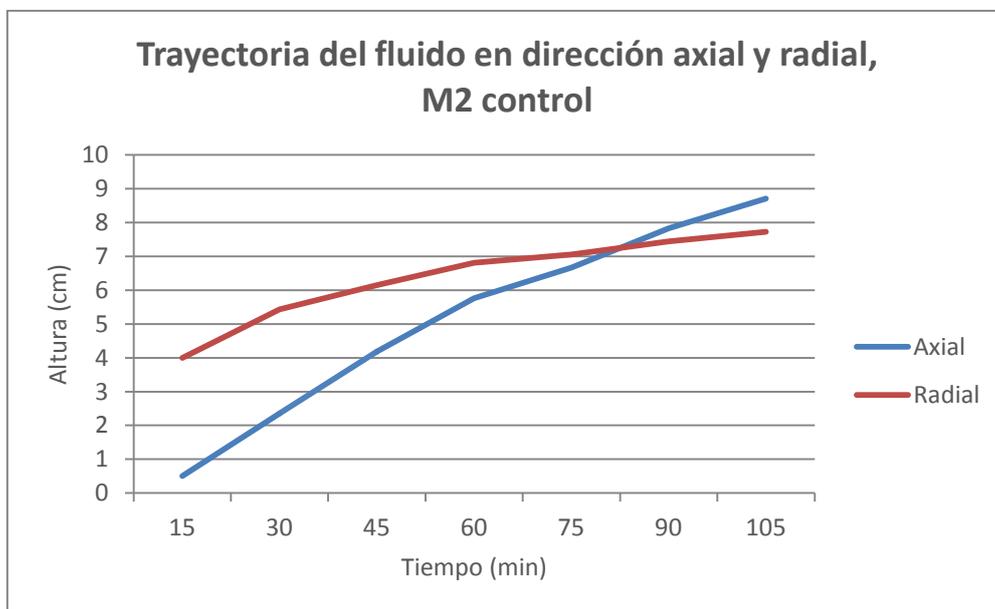


Figura 7. 11: Trayectoria del fluido en las direcciones axial y radial, M2 control.

En la Figura 7. 11 se observa la trayectoria del fluido en las direcciones axial y radial durante 105 min. El flujo en la probeta M2 de control penetró a mayor velocidad que en la M2

bioestabilizada y por ésta razón las mediciones se realizaban cada 15 minutos (en lugar de cada 30 minutos como la probeta anterior). El aumento de la velocidad del flujo, se debe a que no se ha realizado ningún tipo de tratamiento. Como se ha mencionado anteriormente (7.2.4.2. Permeabilidad de los cuatro tipos de suelo), el CaCO_3 precipitado en los poros actúa como distribuidor de fluidos y aumenta la cantidad de líquido que circula en dirección radial. Por lo tanto, ya que no hay CaCO_3 precipitado en el suelo, el tiempo que tarda el líquido en llegar al fondo de la probeta disminuye.

Se aprecia que, inicialmente, la velocidad del flujo en dirección radial es mayor que en dirección axial. Posteriormente, a partir de los primeros 30 min, la velocidad en dirección radial empieza a disminuir hasta que a los 90 min ya es menor que en la dirección axial. Ésta disminución de la velocidad del fluido en dirección radial podría deberse al método de compactación. Dado que la probeta se compactó solo en la parte superior, la superficie de la probeta quedó mejor compactada (se cerraron más espacios vacíos en la parte superior) en comparación con la parte inferior. Este hecho, crea una altura crítica a los 60 min, a partir de la cual, comienza a circular en dirección axial mayor cantidad de líquido.

SS bioestabilizada:

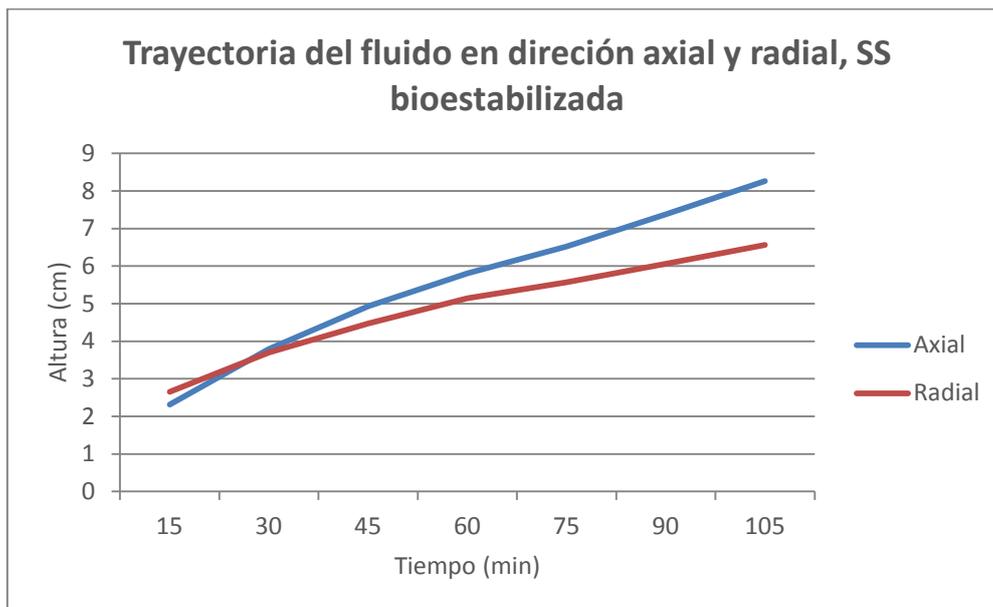


Figura 7. 12: Trayectoria del fluido en las direcciones axial y radial, SS bioestabilizada.

En la Figura 7. 12 se aprecian las trayectorias del fluido en direcciones axial y radial en el suelo SS bioestabilizado, durante 105 minutos. Inicialmente, la pendiente de la trayectoria en dirección radial es mayor que en dirección axial. Posteriormente, la pendiente en dirección radial empieza a suavizarse (altura crítica) y a partir de 4,9 cm la pendiente en dirección axial ya es más acusada. Al igual que en la M2 bioestabilizada, la mayor cantidad de CaCO_3 se precipitó en la capa superficial del suelo y la velocidad del flujo en dirección radial fue mayor inicialmente. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente (el punto 7.2.3.1. Porosidad de los cuatro tipos de suelo), el hecho de tratar el suelo con la solución, incrementa

el tamaño de los poros del suelo ejerciendo tensión hacia ellos intentando ocupar su espacio. Al añadir agua, los espacios vacíos creados por la solución aumentan de tamaño todavía más y por lo tanto la permeabilidad también aumenta. Por ésta razón, después de atravesar la capa superficial causada por el tratamiento y el método de compactación, el líquido empieza a fluir con mayor facilidad hacia el fondo de la probeta.

Al igual que en la probeta M2 bioestabilizada, en ésta también se observa diferencia en las velocidades del fluido de los diez puntos (Anexo E2, tablas E2 22 – E2 31). El motivo sería el mismo que en el caso de la probeta M2 bioestabilizada.

SS control:

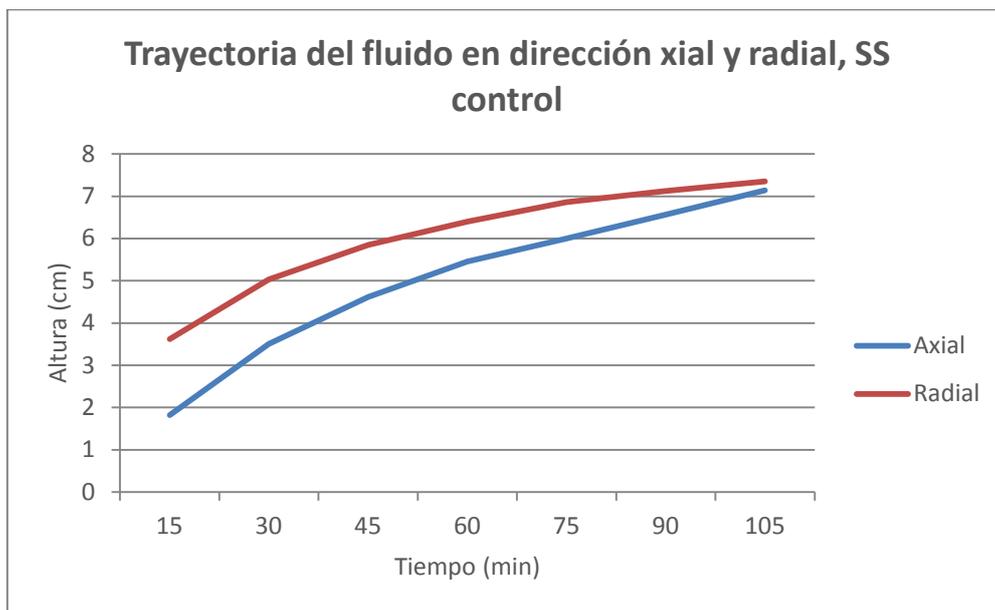


Figura 7. 13: Trayectoria del fluido en las direcciones axial y radial, SS control.

La Figura 7. 13 muestra la trayectoria del fluido en dirección axial y radial, en el suelo SS control, a lo largo de un periodo de 105 minutos. En la figura se aprecia que, inicialmente, las pendientes se dirigen paralelamente durante los 30 primeros minutos (altura crítica). Después de traspasar la altura crítica, la pendiente de la dirección radial comenzó a disminuir lentamente, mientras que la de dirección axial disminuía menos. Más allá de la barrera de los 105 minutos, seguramente la pendiente de la dirección axial continuaría estable y la de la dirección radial disminuyendo. Éste resultado pudo haberse debido a la falta de tratamiento en el suelo que aumentase su permeabilidad.

7.3.3.2. Avance del fluido.

Las siguientes figuras muestran el avance del fluido en los puntos A3 de la probeta M2 bioestabilizada, punto A1 de M2 control, A3 de SS bioestabilizada y A2 de SS control. El avance del fluido en las probetas M2 está representado en dos instantes concretos de tiempo: los minutos 15 y 105 de las tablas E2 2 – E2 41. En las probetas SS, el avance está representado en los minutos 20 y 105.

Mezcla 2:

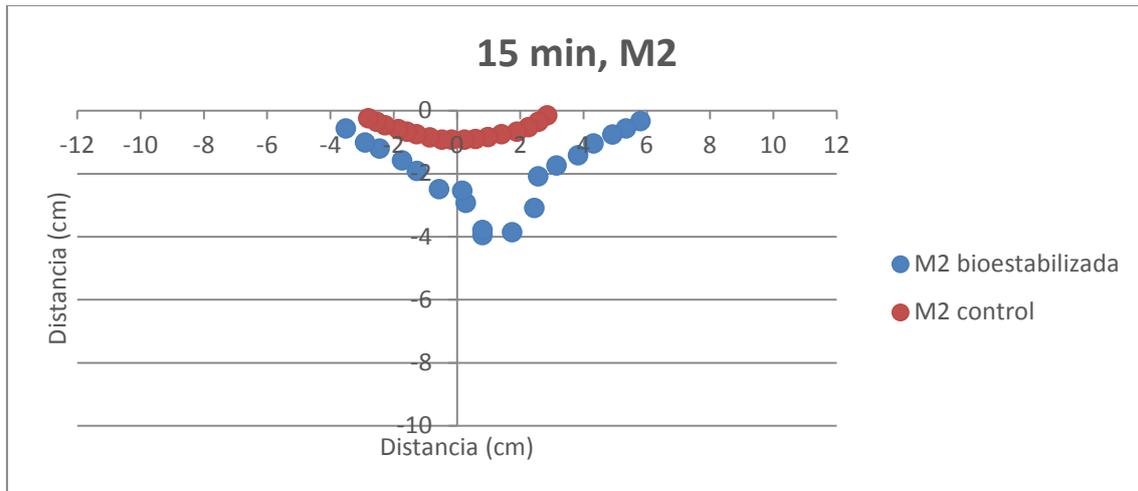


Figura 7. 14: Avance de fluido en el minutos 15 en las probetas M2 bioestabilizada y M2 control.

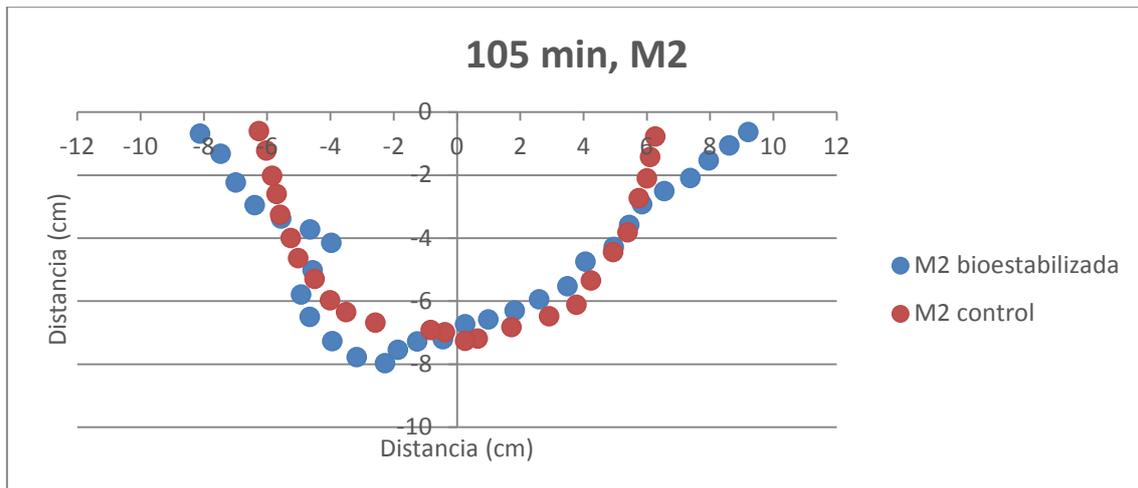


Figura 7. 15: Avance de fluido en el minuto 105 en las probetas M2 bioestabilizada y M2 control.

En ambas figuras se pueden observar las diferencias que existen entre las probetas. En primer lugar, se pueden apreciar las diferencias en las velocidades:

La velocidad del fluido en las dos direcciones de la probeta M2 bioestabilizada es inicialmente superior que la de la probeta M2 control (Figura 7. 14). A lo largo del ensayo, la velocidad de ésta última va aumentando y la mayor parte del líquido fluye en dirección radial. En el momento en el que el líquido alcanza la altura crítica, la velocidad del fluido cambia: en dirección axial empieza a aumentar mientras que en dirección radial se mantiene constante. Como se ha mencionado anteriormente en el punto 7.3.3.1. (Trayectoria del fluido en dirección axial y radial; M2 bioestabilizada), esto se debe a dos razones: el hecho de aportar bacterias y riegos enriquecidos y a realizar la compactación del suelo.

En contraposición al ejemplo anterior, la velocidad del fluido en las ambas direcciones de la probeta M2 control es mayor y más constante que la de la probeta M2 bioestabilizada. La razón está explicada anteriormente, en el punto 7.3.3.1 (Trayectoria del fluido en dirección

Capítulo 7. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

axial y radial; M2 control): Debido a la compactación, la mayor parte del líquido fluye inicialmente en dirección radial. Sin embargo, la falta de partículas de carbonato cálcico hace que la velocidad del fluido en dirección axial aumente cada vez más y en el momento en que alcanza la altura crítica, la diferencia entre las velocidades radial y axial es mínima. Posteriormente, después de la altura crítica causada por la compactación del suelo, la velocidad en la dirección axial sigue aumentando rápidamente. A los 105 minutos ya es igual o mayor que en dirección radial. Comparando el avance del fluido con el de la probeta M2 bioestabilizada el minuto 105, se aprecia que en dirección axial son casi iguales. Sin embargo, el avance del fluido en dirección axial de la M2 control, después de los 105 minutos, seguirá aumentando con mayor velocidad que el de la M2 bioestabilizada.

El hecho de añadir un tratamiento también se aprecia en la forma diferente que crea el fluido en ambas probetas (en corte transversal) a lo largo del tiempo. La forma de la probeta realizada con tratamiento es más irregular que la de control. Como se ha mencionado anteriormente, en el punto 7.3.3.1. (Trayectoria del fluido en dirección axial y radial; M2 bioestabilizada), la mayor cantidad de cristales de CaCO_3 se ha precipitado en la zona del tratamiento. En el momento en que el líquido traspasa esta zona (límite del tratamiento), comienza a fluir a mayor velocidad en dirección axial (la componente axial de la velocidad es mayor que la radial). Este hecho produce las irregularidades en la forma que dibuja el fluido en el suelo (en corte transversal). En la Figura 7. 15, esto se puede observar a partir de una profundidad de 4,7 cm en dirección axial de la probeta M2 bioestabilizada (Anexo E2, tablas E2 42 – E2 45; figuras E2 11 – E2 14).

Por otra parte, en la probeta sin tratamiento la falta de partículas de carbonato cálcico aumenta la velocidad del fluido en dirección axial y la hace más constante. Esto hace que la forma crezca proporcionalmente, a lo largo del tiempo (Anexo E2, tablas E2 46 – E2 49; figuras E2 15 – E2 18).

Arena fina:

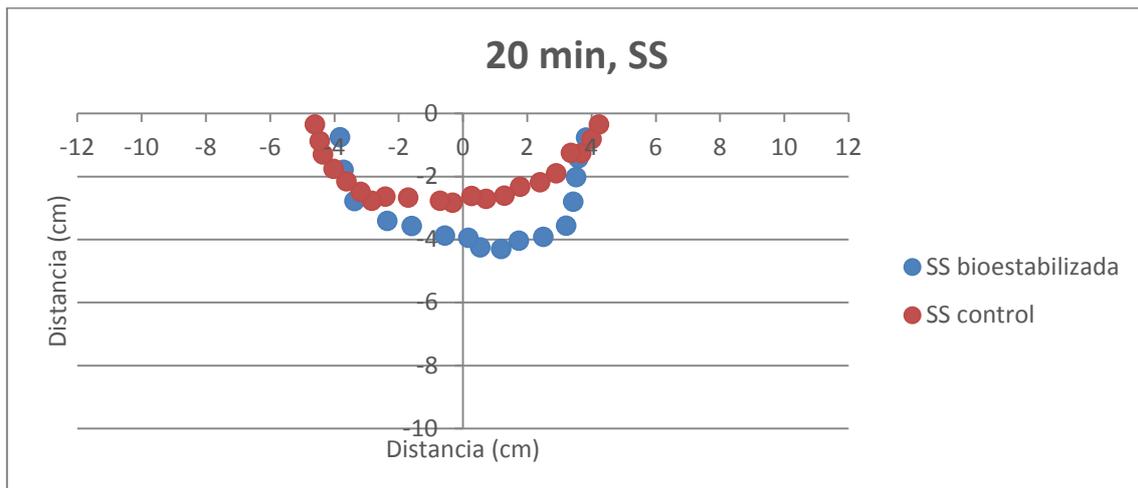


Figura 7. 16: Avance de fluido en 20 min en las probetas SS bioestabilizada y SS control.

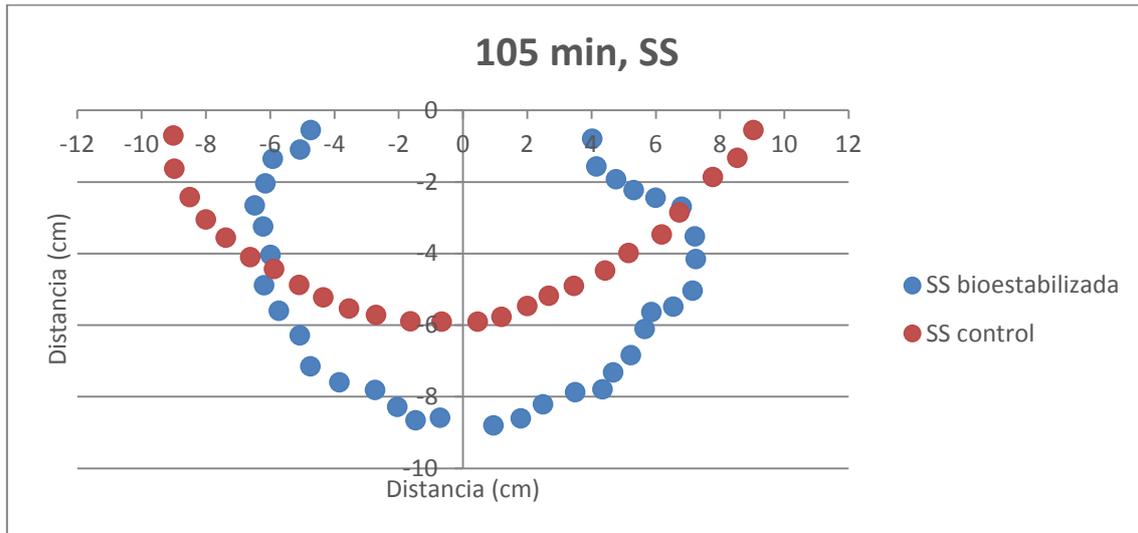


Figura 7. 17: Avance de fluido en 105 min en las probetas SS bioestabilizada y SS control.

En la Figura 7. 16 y en la Figura 7. 17 se puede apreciar el avance del fluido en los instantes de tiempo correspondientes a los minutos 20 y 105 en las probetas SS realizadas con tratamiento y de control. Al igual que en las probetas de M2, estas probetas se aprecian las diferencias en las velocidades y las formas.

La velocidad del fluido de la probeta SS bioestabilizada es mayor que la de la SS control a lo largo de los primeros 20 minutos. En la Figura 7. 16 se puede observar que la distancia a la que llega el fluido en la SS bioestabilizada es igual en ambas direcciones (4 cm). Posteriormente, durante el intervalo comprendido entre los 30 y 45 minutos (entre 5 y 6,7 cm en dirección axial y 4,4 y 5 cm en dirección radial) la velocidad en dirección axial empieza a aumentar mientras que en dirección radial se mantiene constante, al igual que en la probeta M2 bioestabilizada. Sin embargo, el flujo en dirección axial a partir de los 45 minutos es mayor que en dirección radial. Como se ha mencionado antes en el punto 7.3.3.1. (Trayectoria del fluido en dirección axial y radial; SS bioestabilizada), la razón podría ser el hecho de que añadir solución en el suelo aumenta su permeabilidad.

A diferencia de la probeta SS bioestabilizada, en la probeta SS de control, la velocidad del fluido en ambas direcciones es más constante. Inicialmente, la velocidad aumenta hasta la altura crítica y posteriormente comienza a disminuir, proporcionalmente. Debido al método de compactación y a la falta de añadir una solución, la velocidad del fluido en la dirección radial es mayor que en la dirección axial durante el ensayo. A partir de los 90 minutos, las velocidades cambian: la pendiente de la velocidad axial aumenta, mientras que la de la velocidad radial disminuye. En la Figura 7. 16 se puede observar que el flujo en dirección radial es mayor que en dirección axial, el motivo se explica en el punto 7.3.3.1. (Trayectoria del fluido en dirección axial y radial; SS control).

La forma que crea el fluido (en corte transversal) en la probeta SS bioestabilizada (al igual que en el caso anterior, M2 bioestabilizada) tiene mayor irregularidad que la de control. Las irregularidades se crean cuando el fluido atraviesa el límite del tratamiento. En la Figura 7. 17, esto se puede observar en -6,1 cm en dirección axial (Anexo E2, tablas E2 50 – E2 53; figuras E2 19 – E2 22).

Por otra parte, la forma que crea el fluido de la probeta realizada sin tratamiento tiene mayor regularidad que la bioestabilizada. La buena compactación del suelo hace que el perímetro crezca más hacia los lados (dirección radial). Sin embargo, la velocidad del fluido es más constante, lo que hace que la superficie crezca proporcionalmente a lo largo del tiempo, al igual que en la probeta M2 control (Anexo E2, tablas E2 54 – 57; figura E2 23 – E2 26).

7.3.3.3. Intensidad del avance del fluido.

En las siguientes figuras se puede apreciar la velocidad de penetración del fluido, representado a través de los vectores 1, 3 y 5 en corte transversal de las 4 probetas (M2 bioestabilizada, M2 control, SS bioestabilizada y SS control). La magnitud del vector 1 es mayormente radial, la del vector 3 está equilibrada en ambas direcciones y el vector 5 es mayoritariamente axial. La posición de los vectores y los gráficos completos en las direcciones axial y radial se pueden observar en el anexo E2, figuras E2 10 y E2 27 - E2 46.

Mezcla 2:

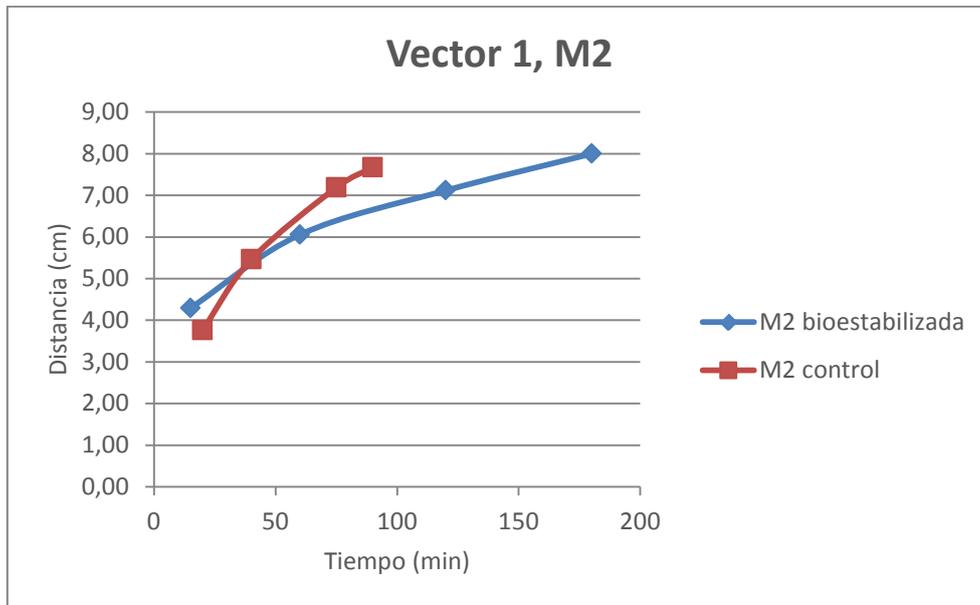


Figura 7. 18: Intensidad del avance de fluido en el vector 1, en las probetas M2 bioestabilizada y M2 control.

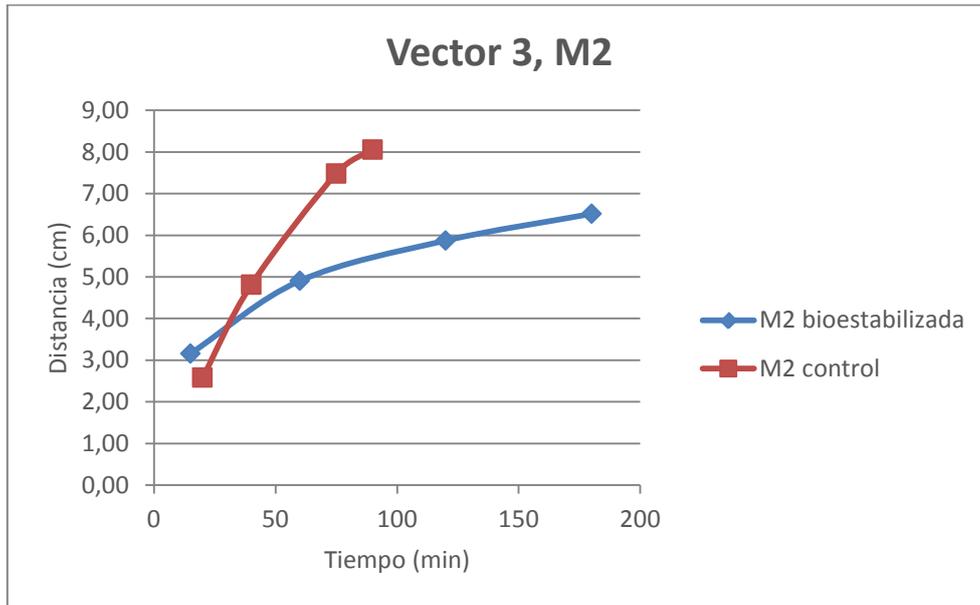


Figura 7. 19: Intensidad del avance de fluido en el vector 3, en las probetas M2 bioestabilizada y M2 control.

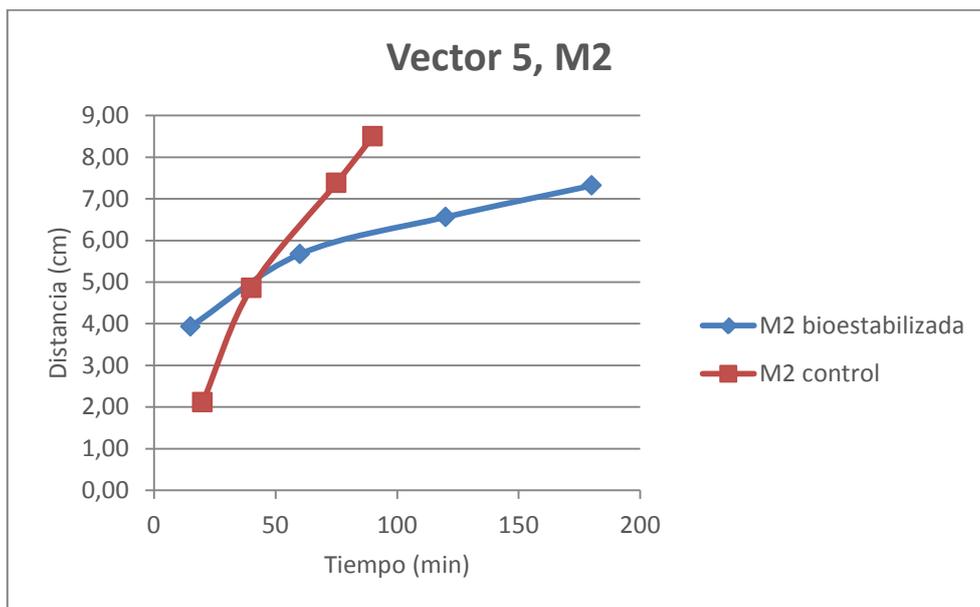


Figura 7. 20: Intensidad del avance de fluido en el vector 5, en las probetas M2 bioestabilizada y M2 control.

Al igual que en las figuras anteriores, en éstas también se observa que la velocidad del avance del fluido en la probeta M2 de control es mayor que en la bioestabilizada. Comparando las pendientes en las tres figuras, se observa que la distancia y (por tanto, la velocidad) aumentan cuando la componente axial del vector es mayoritaria. En contraposición al caso anterior, la distancia y la velocidad de las pendientes disminuye en la probeta M2

bioestabilizada cuando la componente radial se minimiza. Éste resultado muestra que la permeabilidad de la probeta M2 bioestabilizada es menor que la de M2 control.

La pendiente de la probeta M2 bioestabilizada también muestra la distribución del carbonato cálcico en el suelo. La intensidad del avance del fluido depende de la cantidad del CaCO_3 precipitado. La mayor parte se encuentra localizada en la zona del tratamiento y se aprecia en el primer tramo de la pendiente de la M2 bioestabilizada. En éste tramo se observa el cambio de la velocidad más acusado, debido a que el líquido traspasa el límite del tratamiento y cambia la dirección de penetración, pasando de ser mayoritariamente radial a axial. Una vez el fluido atraviesa la zona del tratamiento, también se observa que la permeabilidad del suelo disminuye, por lo que el tiempo que tarda el fluido en llegar al fondo de la probeta es mayor que el de M2 control.

Arena fina:

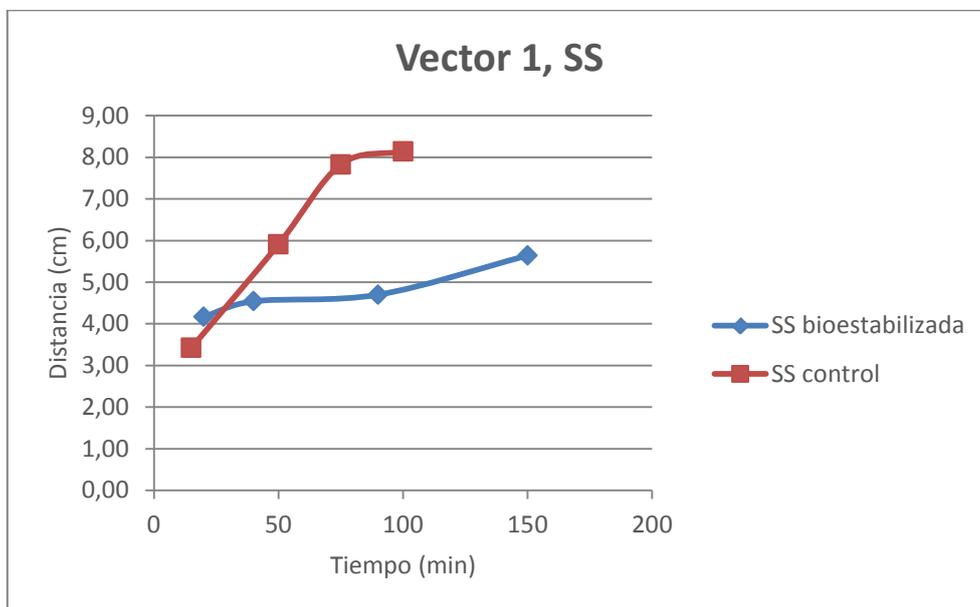


Figura 7. 21: Intensidad del avance de fluido en el vector 1, en las probetas SS bioestabilizada y SS control.

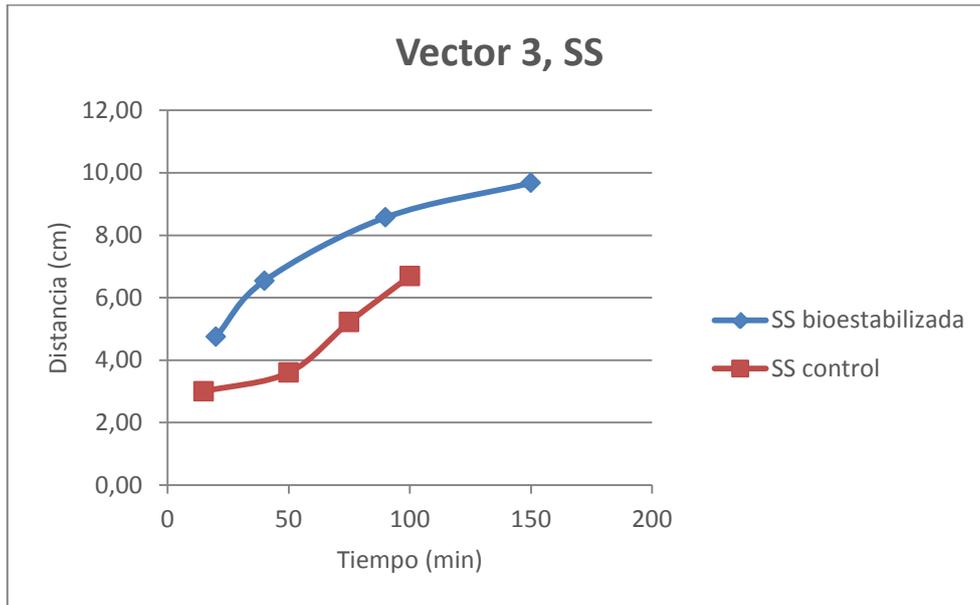


Figura 7. 22: Intensidad del avance de fluido en el vector 3, en las probetas SS bioestabilizada y SS control.

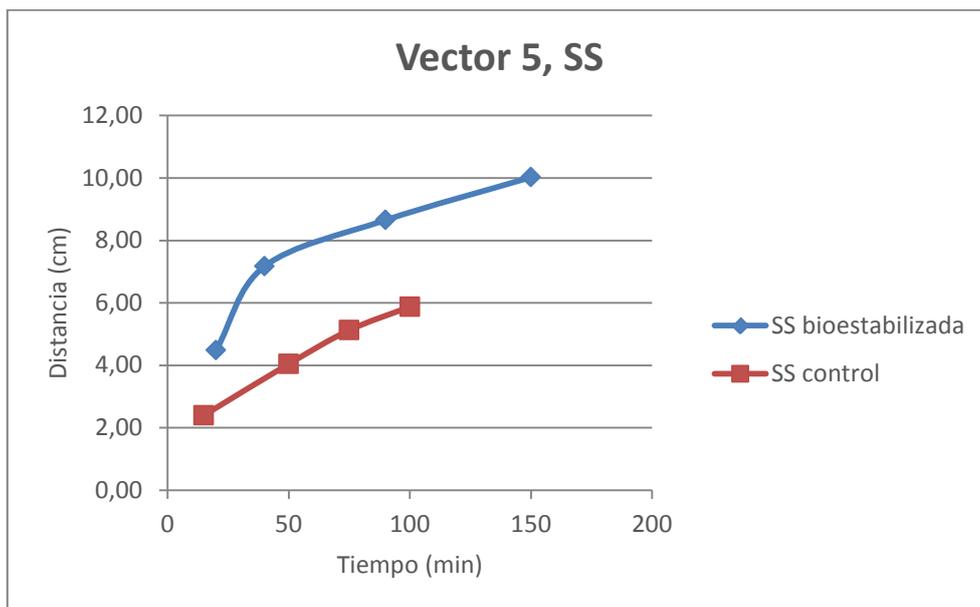


Figura 7. 23: Intensidad del avance de fluido en el vector 5, en las probetas SS bioestabilizada y SS control.

En la Figura 7. 21 se observa que la velocidad de avance y la distancia recorrida por el fluido en la probeta SS de control son mayores que en el caso de la bioestabilizada. Posteriormente, en la Figura 7. 22 y en la Figura 7. 23, se aprecia que su velocidad y distancia disminuyen conforme los vectores comprenden una mayor componente axial. Como se ha mencionado anteriormente, el cambio en la velocidad se debe a no haber añadido solución.

Capítulo 7. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

La intensidad del tratamiento realizado se puede observar en la trayectoria de la SS bioestabilizada. A diferencia de la probeta SS control, la velocidad en el primer tramo es mayor y posteriormente disminuye. Debido a la zona del tratamiento, el flujo de líquidos aumenta en el primer tramo y cuando el límite es traspasado, comienza a disminuir. Tras el primer tramo, el tiempo que tarda el líquido en llegar al fondo de la probeta aumenta en comparación con la SS control. Este hecho, muestra que la permeabilidad de SS bioestabilizada disminuye en comparación con la de SS control.

7.3.4. Análisis de los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos en éste ensayo son análogos a los obtenidos en el ensayo anterior (7.2. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas cilíndricas compactadas y tratadas con MICP). En primer lugar, la permeabilidad de la probeta SS bioestabilizada aumenta en comparación con la SS control. Sin embargo, al traspasar el límite del tratamiento, la permeabilidad de SS bioestabilizada disminuye en mayor grado. En contrapartida, la permeabilidad de la probeta M2 bioestabilizada disminuye en comparación con la de M2 control. Durante el ensayo, la velocidad en dirección radial es igual o mayor que en dirección axial. Sin embargo, la velocidad en dirección radial de la M2 control disminuye después de que el fluido supere la altura crítica.

En segundo lugar, en ambas probetas de control existe una altura crítica, a partir de cual la velocidad del fluido empieza a aumentar. Al igual que en las probetas cilíndricas, el método de compactación cierra una mayor cantidad de espacios vacíos en la parte superior de la probeta. De ésta manera, la permeabilidad disminuye solamente en ésta zona, después de cual, la velocidad del fluido aumenta.

Por el contrario, en ambas probetas realizadas con tratamiento, existe una zona del tratamiento, a partir de la cual, la velocidad del fluido empieza a disminuir. La intensidad del tratamiento en la parte superior de las probetas es mayor que en la parte inferior, debido a que las bacterias tienen mayor aportación de nutrientes en ésta zona. Los cristales de CaCO_3 precipitados en el suelo actúan como distribuidores del fluido y aumentan su velocidad de penetración. Por lo tanto, la velocidad aumenta en la zona del tratamiento y más allá del límite comienza a disminuir. Debido a esto, la permeabilidad del suelo también disminuye.

Por último, en ambas probetas bioestabilizadas la componente axial de la zona de influencia del tratamiento creada por las bacterias es mayor que la altura crítica producida por el método de compactación. En el caso de la arena fina, esta diferencia es del 52,5 % y en la mezcla 2 del 46,8%.

7.3.5. Conclusiones.

Estabilizar ambos tipos de suelo con bacterias disminuye su permeabilidad. La presencia de cristales de CaCO_3 aumenta el flujo de líquidos en dirección radial en la zona del tratamiento y también el tiempo que el fluido necesita para llegar al fondo de la probeta después de atravesar ésta zona.

Los suelos arcillosos con arena muestran mayor disminución en la permeabilidad que los suelos arenosos. El menor tamaño de las partículas de arcilla, en comparación con las de la arena fina, aumenta el flujo de líquidos en dirección radial a lo largo del suelo.

Los suelos arenosos finos muestran mayor permeabilidad en la zona del tratamiento, en comparación con los suelos arcillosos con arena. Debido al mayor tamaño de las partículas y a la solución que ejerce tensión hacia ellas al añadirla, los poros del suelo se abren y el flujo en dirección axial aumenta.

Capítulo 7. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

Capítulo 8: Conclusiones y futuras investigaciones

8.1. Conclusiones.

En la presente tesis doctoral se han realizado diversos estudios para optimizar la capacidad resistente y reducir la permeabilidad de suelos granulares finos y arcillosos mediante la MICP (precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias). Los resultados de los ensayos que se han analizado han permitido tabular las condiciones óptimas para cada tipo de suelo. A continuación se presenta un resumen de las conclusiones más relevantes alcanzadas.

La conclusión general de la tesis es que tras los diversos ensayos realizados para optimizar y verificar su rendimiento, el método de estabilización con bacterias (MICP) ha verificado ser un método viable para optimizar la capacidad resistente y modificar la permeabilidad de los suelos granulares finos (arenosos) y los suelos arcillosos. Ha demostrado que en diferentes tipos de suelo, ajustando los parámetros estudiados, se pueden mejorar notablemente sus propiedades con respecto a suelos que no han recibido tratamiento alguno. Además el MICP se realiza mediante un sistema biológico, sostenible y respetuoso con el medio ambiente.

Las conclusiones técnicas específicas se presentan a continuación:

- En una sociedad en la que las construcciones de tierra están volviendo a cobrar protagonismo (sobre todo en países en vías de desarrollo) respecto a materiales más modernos, se ha iniciado una vía de investigación para conseguir estabilizar los suelos de forma natural, sostenible, viable económicamente y respetuosa con el medio ambiente basado en la utilización de bacterias.
- Se ha comprobado experimentalmente que se puede influir en la morfología final de los cristales de carbonato de calcio obtenidos, controlando la cantidad de cristales unitarios, el tamaño del cristal y la formación de conglomerados. Para controlar la cantidad de los cristales unitarios se debe controlar la concentración bacteriana. La manipulación del tamaño del cristal, se realiza controlando la velocidad a la que se forma. Por último, para poder influir en la formación de conglomerados se debe controlar la concentración de calcio.
- Se ha verificado que diluir los productos que se aportan en el suelo con agua destilada limita el crecimiento de las bacterias. Éste hecho reduce la resistencia a compresión uniaxial del suelo, por lo cual resulta más beneficioso aportar urea y calcio utilizando medio Bang durante todo el proceso de crecimiento bacterial.
- A partir de los resultados de las investigaciones llevadas a cabo se han elegido los parámetros que muestran mayor influencia para cada tipo de suelo. Los parámetros que se concluye que son más influyentes son:
 1. *Adición de bacterias*: se ha demostrado que la adición tan sólo de bacterias en alta concentración aumenta la resistencia a compresión uniaxial en todos los suelos.

2. *Condiciones óptimas*: se han modelado las condiciones óptimas de concentración de bacterias, de concentración de calcio y de ritmo de aportación y tipo de nutrientes para cada tipo de suelo.
3. *Momento óptimo para compactar (obtenido de forma experimental)*: Antes o después de los riegos enriquecidos que difieren según el tratamiento biológico.
4. *Permeabilidad*: se ha estudiado y ensayado la influencia del momento de compactación sobre la permeabilidad, con el objetivo de minimizarla:
 - Se define una *altura crítica* entre la superficie externa sobre la que se realiza la compactación y la profundidad hasta la que los poros del suelo reducen su tamaño. La altura crítica muestra cambios en la velocidad y/o dirección del fluido durante su penetración en el suelo.
 - Se define una *zona tratada* entre la superficie externa sobre la que se aplica el tratamiento y la profundidad hasta la que dicho tratamiento penetra. En ésta zona hay mayor cantidad de CaCO_3 precipitado.
5. *Porosidad*: se ha estudiado y ensayado la influencia del proceso de compactación sobre la porosidad, con el objetivo de minimizarla para diferentes tipos de suelo.

Arena fina:

1. La resistencia a compresión uniaxial aumenta hasta un 423% con la adición tan sólo de bacterias en alta concentración. Al añadir una segunda inoculación de bacterias la resistencia aumenta hasta un 791%.
2. Es preferible estabilizar la arena fina con una concentración de bacterias lo mayor posible, añadiendo una segunda inoculación, baja concentración de calcio y período entre tratamientos de 2h.
3. Es recomendable compactar la arena fina antes de realizar los riegos enriquecidos, debido a que la compactación previa reduce el tamaño de los poros en el suelo en mayor grado que si se compacta después.
4. La permeabilidad de la arena fina se ha estudiado y ensayado en dos tipos de probetas:
 - Probetas cilíndricas de tamaño reducido: hasta alcanzar la altura crítica, los suelos de arena fina compactados antes del tratamiento realizado muestran menor permeabilidad en comparación con los compactados posteriormente. Al compactar antes de realizar un tratamiento, los espacios entre las partículas se cierran, por lo que los cristales de CaCO_3 crecen mejor y provocan que la permeabilidad disminuya. Por el contrario, una vez superada la profundidad marcada por la altura crítica, los suelos de arena fina compactados después del tratamiento muestran menor permeabilidad en comparación con los compactados antes del tratamiento. Los suelos de arena fina compactados después del tratamiento tienen mayor tamaño de los poros, por lo que se precipita mayor cantidad de CaCO_3 . Este hecho disminuye la permeabilidad.
 - Probetas de mayor tamaño: Los suelos de arena fina, realizados con tratamiento, muestran menor permeabilidad en comparación con los de control. El carbonato de calcio precipitado en los poros actúa distribuyendo el fluido y aumentando la cantidad de líquido que circula en dirección radial. Por

lo tanto, el tiempo que tarda el líquido en llegar al fondo de la probeta aumenta en comparación con la de control.

5. La porosidad de los suelos de arena fina (ensayado y calculado para probetas cilíndricas de tamaño reducido) compactados antes del tratamiento es menor que los compactados después. Compactar antes de realizar el tratamiento disminuye los espacios vacíos en los suelos arenosos.

Arena gruesa:

1. La resistencia a compresión uniaxial aumenta hasta un 444% con una única adición exclusivamente de bacterias en alta concentración. Sin embargo, al probar a realizar una segunda inoculación de bacterias la resistencia de la arena gruesa aumenta hasta tan sólo el 74,42% respecto a las muestras de control.
2. Las condiciones óptimas para la arena gruesa se modifican conforme el ensayo que se realiza:
 - Los parámetros que muestran mayor influencia positiva en la resistencia a compresión uniaxial en la arena gruesa son: alta concentración de bacterias, alta concentración de calcio y período entre tratamientos de 4h.
 - Sin embargo, para aumentar la resistencia a corte directo es necesario optimizar el ángulo de fricción interna y la cohesión. Con el objetivo de mejorar éstos parámetros, es beneficioso estabilizar la arena gruesa con una baja concentración de bacterias.
3. Es recomendable compactar los suelos de arena gruesa antes de realizar los riegos enriquecidos, debido a que el proceso de compactación reduce los espacios vacíos en mayor grado que si la compactación es posterior.
4. Hasta la altura crítica, los suelos de arena gruesa compactados antes del tratamiento realizado muestran menor permeabilidad en comparación con los compactados después. Al compactar antes de realizar el tratamiento, los poros se cierran en mayor grado, por lo que los cristales de CaCO_3 crecen mejor, no se escapan tan fácilmente entre la porosidad y provocan que la permeabilidad disminuya. Por el contrario, una vez superada la profundidad marcada por la altura crítica, los suelos de arena gruesa compactados después del tratamiento muestran menor permeabilidad en comparación con los compactados antes del tratamiento. Los suelos de arena gruesa compactados después del tratamiento tienen mayor tamaño de los poros, por lo que se precipita mayor cantidad de CaCO_3 . Este hecho disminuye la permeabilidad.
5. La porosidad de los suelos de arena gruesa compactados antes del tratamiento es menor que los compactados después porque compactar antes de realizar el tratamiento disminuye los espacios vacíos en suelos con mayor tamaño de poros.

Mezcla 1 (arena arcillosa):

1. La resistencia a compresión uniaxial aumenta hasta un 194,89% con la adición tan sólo de bacterias en alta concentración. Al añadir una segunda inoculación de bacterias la resistencia aumenta de nuevo hasta un 345,91%.

2. Las condiciones óptimas para la arena arcillosa se modifican conforme el ensayo que se realiza:
 - Los parámetros que muestran mayor influencia positiva en la resistencia a compresión uniaxial en la arena arcillosa son: baja concentración de bacterias, alta concentración de calcio y período entre tratamientos de 4h.
 - Sin embargo, para aumentar la resistencia a corte directo es necesario optimizar el ángulo de fricción interna y la cohesión. Con el objetivo de mejorar estos parámetros, es beneficioso estabilizar la arena arcillosa con alta concentración de bacterias.
3. Es recomendable compactar la arena arcillosa antes de realizar los riegos enriquecidos, dado que compactar antes reduce el tamaño de los poros en mayor grado que compactar después del tratamiento.
4. Las arenas arcillosas compactadas antes del tratamiento muestran menor permeabilidad en comparación con las compactadas después en la zona anterior antes de alcanzar la altura crítica. Por el contrario, una vez superada la profundidad marcada por la altura crítica, las arenas arcillosas compactadas después del tratamiento muestran menor permeabilidad en comparación con las compactadas antes del tratamiento. La razón también sería la misma que en los suelos de arena fina y arena gruesa.
5. La porosidad de los suelos de arena arcillosa compactados antes del tratamiento es menor que la de los compactados después. La razón sería la misma: compactar antes de realizar el tratamiento disminuye los espacios vacíos en suelos con mayor tamaño de poros.

Mezcla 2 (arcilla arenosa):

1. La resistencia a compresión uniaxial de la arcilla arenosa aumenta hasta un 52,38% con la adición tan sólo de bacterias en alta concentración. Al añadir una segunda inoculación de bacterias la resistencia aumenta hasta un 658,73%.
2. Es preferible estabilizar la arcilla arenosa con una concentración de bacterias lo mayor posible, con una segunda inoculación, baja concentración de calcio y período entre tratamientos de 2h.
3. Es recomendable compactar los suelos arcillosos después del tratamiento realizado para facilitar el acceso de las bacterias y los nutrientes que se aportan.
4. La permeabilidad de la arcilla arenosa se ha estudiado y ensayado en dos tipos de probetas:
 - Probetas cilíndricas de tamaño reducido: hasta alcanzar la altura crítica, los suelos arcillosos compactados después del tratamiento realizado muestran menor permeabilidad que los compactados antes, debido a la saturación del suelo por la arcilla. Por el contrario, una vez superada la profundidad marcada por la altura crítica, los suelos arcillosos compactados antes muestran menor permeabilidad. El alto contenido de arcilla evita que el suelo absorba el flujo de líquidos.
 - Probetas de mayor tamaño: Los suelos arcillosos a los que se les ha aplicado el tratamiento, muestran menor permeabilidad en comparación con los de

control. La influencia del tratamiento reduciendo la permeabilidad es mucho mayor comparativamente en los suelos arcillosos que en los arenosos.

5. La porosidad de la arcilla arenosa se ha ensayado y calculado para probetas cilíndricas de tamaño reducido. La porosidad de los suelos arcillosos compactados antes del tratamiento es mayor que la de los compactados después. Al compactar antes, en los suelos con mayor concentración de arcilla se rompe la cementación causada por la misma (la arcilla) y aumentan los espacios vacíos, aumentando negativamente (para los intereses del estudio) la porosidad.
- Se ha demostrado la viabilidad del método de determinación de la humedad mediante ultrasonidos. Éste método permite distinguir el momento en el que todas las probetas alcanzan el equilibrio higrométrico de la superficie, incluso en la configuración de disponer los sensores sobre la superficie uno al lado del otro.

8.2. Futuras investigaciones.

Algunos aspectos en los que la investigación se podría ampliar en el futuro, se muestran a continuación:

- La metodología de compactación de los diferentes tipos de suelos debe ser estudiada y optimizada:
 - En los moldes cilíndricos, debido a que durante la compactación se causaron desperfectos al suelo en el punto del impacto.
 - En las probetas de grandes dimensiones, debido a la dificultad de compactación de suelos arcillosos.
- La metodología de aportación de bacterias y nutrientes en el suelo debe ser estudiada con el objetivo de uniformizar la distribución en el suelo. Dado que los riegos enriquecidos se aportaron únicamente en la parte superior de las probetas, la mayor cantidad de la calcita se precipitó en la superficie. Sin embargo, esta zona está compartida con la ocupada por la altura crítica (es la más afectada del método de compactación en los dos tipos de moldes: cilíndricas y de mayores dimensiones). Esto se traduce en que en las zonas inferiores de las probetas no se producen las mejoras en la misma magnitud.
- Profundizar en los ensayos a corte directo con el objetivo de entender cómo mejorar el ángulo de fricción interna, debido a que la introducción de bacterias (en cualquier concentración) no parece contribuir a mejorar este parámetro.
- Continuar la investigación en la línea del avance del fluido en corte transversal, realizando un estudio estadístico acerca de la distribución de los microorganismos, aplicando la metodología de superficie de respuesta.

Referencias bibliográficas

- [1] G. Minke, "Manual de construcción en tierra", Eco Habitar, 2005.
- [2] MOPU Dirección general de carreteras, "Terraplenes y pedraplenes", 1981.
- [3] J. E. Aubert and M. Gasc-barbier, "Applied Clay Science Hardening of clayey soil blocks during freezing and thawing cycles," Appl. Clay Sci., vol. 65–66, pp. 1–5, 2012.
- [4] C. M. Stivenson, "Sistemas de construcción y de estimación", LinkedIn, 2014 (Consulta: 26.10.2017). Disponible en: <<https://es.slideshare.net/sistemasdeconstruccion/9-petrees>>.
- [5] Z. González, "Construir con tierra (1): las ventajas", Low-tech magazine, 2011 (Consulta: 26.10.2017). Disponible en: <<http://www.es.lowtechmagazine.com/2011/05/construir-con-tierra-las-ventajas.html>>.
- [6] K. B. Ren and D. A. Kagi, "Upgrading the Durability of Mud Bricks by Impregnation", Building and Environment, Vol 30, No. 3, pp. 433440, 1995.
- [7] M. Blondet and others, "Construcciones de Adobe Resistentes a los Terremotos", 2003.
- [8] Greenbau, "Rammed Earth Wall", Green homes for us, 2010 (Consulta: 26.10.2017). Disponible en: <<https://greenbau.wordpress.com/2010/11/02/rammed-earth-wall/>>.
- [9] A. McDonald, "Rammed earth Receives a New Groundswell Support", Sourceable, 2016 (Consulta: 26.10.2017). Disponible en: <<https://sourceable.net/rammed-earth-receives-a-new-groundswell-of-support/>>.
- [10] M. Buck, "Una casa de campo de cob en Deddington, Inglaterra", Natural Homers, 2012 (Consulta: 26.10.2017). Disponible en: <<http://naturalhomes.org/es/homes/michaelbuck2.htm>>.
- [11] I. García, "Instrucciones para elaborar adobes y repellos", Habitat y desarrollo, 2012 (Consulta: 27.10.2017). Disponible en: <<https://habitatydesarrollo.wordpress.com/2012/02/23/instrucciones-para-elaborar-adobes-y-repellos/>>.
- [12] A. Cladera and others, "El adobe en la construcción para el desarrollo", Construmática (Consulta: 27.10.2017). Disponible en: <https://www.construmatica.com/construpedia/El_Adobe_en_la_Construcci%C3%B3n_para_el_Desarrollo>.
- [13] Johnny Salazar, "Manual de Construcción Natural Construyendo con COB", 2005.

Referencias bibliográficas

- [14] Ciudad Universitaria Virtual de San Isidoro, "Mecánica de suelos", 2014 (Consulta: 31.10.2017). Disponible en: <<https://www.cuvsu.com/2015/03/mecanica-de-suelos.html>>.
- [15] M. Solís and others, "Análisis del comportamiento a flexión de muros de adobe reforzados con geomallas", Informes de la Construcción Vol. 67, 539, e092, 2015.
- [16] M. C. Jiménez and others, "Earth Building in Spain", Construction and Building Materials, 2006.
- [17] M. F. Attom, "The effect of compactive energy level on some soil properties", Applied Clay Science, 1997.
- [18] B. Taylor and others, "Compressive Strength Testing of Earthen Plasters for Straw Bale Wall Application", Advances in Engineering Structures, Mechanics & Construction, 2006.
- [19] M. Hall and others, "Analysis of Hygrothermal functional properties of stabilised rammed earth materials", Building and Environment, 2009.
- [20] Y. Liang and others, "Influence of Water Content on Mechanical Properties of Improved Clayey Soil Using Steel Slag", Springer Science, 2013.
- [21] M. Emiroglu and others, "Performance of ready-mixed clay plasters produced with clay/sand ratios", Applied Clay Science, 2015.
- [22] M. Blondet and others, "Construcción sismorresistente en tierra: la gran experiencia contemporánea de la Universidad Católica del Perú", Informes de la Construcción Vol. 63, 523, 41-50, 2011.
- [23] Ministerio de Fomento, "Pliego de Prescripciones Técnicas Generales para Obras de Carreteras y Puentes", 2015.
- [24] Ministerio de Fomento, "Orden FOM/1631/2015, de 14 de julio, por la que se aprueba la Instrucción para el proyecto y construcción de obras ferroviarias IF-3. Vía sobre balasto. Cálculo de espesores de capas de la sección transversal. ", Boletín Oficial del Estado, 2015.
- [25] P. Arrua and others, "Estabilización de suelos loessicos mediante la incorporación de un aglomerante mineral", Geotechnical Conference Pan-Am CGS, 2011.
- [26] M. Achenza and others, "On Earth Stabilization with Natural Polymers for Earth Masonry Construction", Materials and Structures, 2006.
- [27] S. Gilazghi and others, "Stabilizing sulfate-rich high plasticity clay with moisture activated polymerization", Engineering Geology, 2016.
- [28] S. Rezaeimalek and others, "Comparison of Short-term and Long-term Performances for Polymer-Stabilized Sand and Clay", Science Direct, 2017.

- [29] J. M. Manso and others, "The Use of Ladle Furnance Slag in Soil Stabilization", Construction and Building Materials, 2012.
- [30] V. Ortega-López and others, "The long-term Accelerated Expansion of Various Ladle-furnace Basic Slags and their Soil-stabilization applications", Construction and Building Materials, 2014.
- [31] A. Goodarzi and others, "Stabilization Treatment of a Dispersive Clayly Soil using Granulated Blast Furnace Slag and Basic Oxygen Furnace Slag", Applied Clay Science, 2015.
- [32] N. Consoli and others, "Parameters Controlling Stiffness and Strength of the Artificially Cemented Soils", Géotechnique, 2012.
- [33] M. Esmaeili and others, "Evaluation of Deep Soil Mixing Effiviency in Stabilizing Loose Sandly Soils usin Laboratory Tests", 2014.
- [34] L. Chu and others, "Evaluation of surface infiltration performance of permeable pavements", Journal of Environmental Management, 2019.
- [35] A. G. Correia and others, "Advanced Tools and Techniques to add Value to Soil Stabilization Practice", Springer International Publishing, 2017.
- [36] I. Chang and others, "Application of Microbial Biopolymers as an Alternative Construction Binder for Earth Buildings in Underdeveloped Countries", International Journal of Polymer Science, 2015.
- [37] V. Ivanov and others, "Basic of Construction Microbial Biotechnology", Biotechnologies and Biomimetics for Civil Engineering, 2015.
- [38] L. van Paseen and others, "Scale up of BioGrout: a Biological ground reinforcement method", Proceedings of the 17th International Conference on Soil Mechanics and Geotechnical Engineering, 2009.
- [39] W. Muynck and others, "Bacterial Carbonate Orecipitation Improves the Durability of Sementitious Materials", Cement and Concrete Research, 2008.
- [40] L. Morales and others, "Feasibility of a Soft Biological Improvement of Natural Soils Used in Compacted Linear Earth Construction", Springer, 2015.
- [41] M. Máté and others, "Problems Involving Application of BiogROUT Technology", 2nd International Conference for PhD students in Civil Engineering and Architecture, 2014.
- [42] G. Vecchia and others, "Modelling Criteria for a Microbiologically Stabilized Compacted Soil in the Framework of Elastoplasticity", ResearchGate, 2015.
- [43] Arya C F^a and others, "Microbial Geotechnology: Evaluation of Strength and Structural Properties of Microbial Stabilized Mud Block", International Journal of Scientific & Engineering Research, 2016.

Referencias bibliográficas

- [44] H. Jonkers and others, "Applicaton of Bacteria as Self-healing Agent for the Development of Sustainable concrete", Ecological Engineering, 2008.
- [45] K. Tittelboom and others, "Use of Bacteria to Repair Cracks in Concrete", Cement and Concrete Research, 2009.
- [46] S. Bang and others, "Microbial Calcite, a Bio-based Smart Nanomaterial in Concrete Remediation", Smart and Nano Materials, 2010.
- [47] H. Jonkers, "Bacteria-based Self-Healing Concrete", Heron Vol. 56, 2011.
- [48] J. Wang and others, "Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores", Cement and Concrete Research, 2013.
- [49] M. Sierra-Beltran and others, "Characterization of Sustainable Bio-based Mortar for Concrete Repair", 2014.
- [50] N. Dhami and others, "Biomineralization of Calcium Carbonate and their Engineered applications", Frontiers in Microbiology, 2013.
- [51] T. With and others, "A Simple Spectrophotometric Method for the Determnation of Urea in Blood and Urine", Central Laboratory, Svend-borg, County Hospital, Denmark, 1960.
- [52] L. de Faria and others, "Determination of Urea in Serum by Using Naturally Immobilized Urease in a Flow Injection Conductimetric System", Analyst, 1991.
- [53] A. Taylor and others, "Analytical Reviews in Clinical Biochemistry: The Estimation of Urea", Ann Clin Biochem, 1992.
- [54] "Determinación Cuantitativa de Urea en Suero", Practica 3 (Consulta: 11.12.2017). Disponible en: <<https://es.scribd.com/doc/22632638/3-Determinacion-Cuantitativa-de-Urea-en-Suero>>.
- [55] F. Vaid and others, "O-Pthalaldehyde Based Spectrophotometric Determination of Sulfonamides", Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004.
- [56] B. Maliha and others, "Mechanistic Studies on the Reaction of o-Phtalaldehyde (OPTA) with Urea and its N-alkyl/aryl Derivatives", J.Chem.Soc.Pak. Vol. 31, No. 5, 2009.
- [57] J. Bojic and others, "Spectrophotometric Determination of Urea in Dermatologic Formulations and Cosmetics", Analytical Science, 2008.
- [58] V. Sharma and others, "Spectrophotometric Determination of Urea in Urine by Using Bispyrazolone Method", Proc. Indian natn. Sci. Acad., 2013.
- [59] D. Gat. and others, "Accelerated Microbial-induced CaCO₃ Precipitation in a defined Coculture of Ureolytic and non-ureolytic bacteria", Biogeosciences, 2014.

- [60] Y. Curmaç and others, "The Impact of Toxicity of Metals on the Activity of Ureolytic Mixed Culture During the Precipitation of Calcium", *Journal of Hazardous Materials*, 2009.
- [61] S. Benini and others, "Bacillus pasteurii urease: A Heteropolymeric Enzyme with a Binuclear Nickel Active Site", *Soil Biol. Biochem.* Vol. 28, No 6, 1996.
- [62] K. Bachmeier and others, "Urease Activity in Microbiologically-induced calcite precipitation", *Journal of Biotechnology*, 2002.
- [63] L. Morales and others, "Crecimiento de Cristales de CaCO_3 , como Resultado de la Actividad Microbiológica en Suelos", *Revista de la sociedad española de mineralogía*, 2011.
- [64] D. Kaur and others, "Biomineralization of Calcium Carbonate Polymorphs by the Bacterial strain Isolated from Calcareous Sites", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012.
- [65] T. Thriveni and others, "Synthesis of Nano Precipitated Calcium Carbonate by Using a Carbonation Process Through a Closed loop Reactor", *Korean Physical Society*, 2016.
- [66] S. Stocks-Fischer and others, "Microbiological Precipitation of CaCO_3 ", *Soil Biology and Biochemistry*, 1999.
- [67] A. Qabany and others, "Factors Affecting Efficiency of Microbially Induced Calcite Precipitation", *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 2012.
- [68] S. Ramachandran and others, "Remediation of Concrete using Micro-organisms", *ACI Materials Journal*, 2001.
- [69] Q. Chunxiang and others, "Corrosion Protection of Cement-Based Materials by Surface Deposition of CaCO_3 by *Bacillus pasteurii*", *Materials Science and Engineering*, 2008.
- [70] V. Achai and others, "Strain Improvement of *Sporosarcina pasteurii* for Enhanced Urease and Calcite Production", *Ind Microbiol Biotechnol*, 2009.
- [71] S. Bang and others, "Calcite Precipitation Induced by Polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*", *Enzyme and Microbial Technology*, 2001.
- [72] Spinreact, "Determinación cuantitativa de urea", *Urea-37, Colorimétrico*, pp. 99 – 100 (Consulta: 24.10.2018). Disponible en: <<http://bioquimicanicolebasurtop.blogspot.com/2017/05/insertos-de-bioquimica.html>>.
- [73] J. González, "Cinética enzimática", *Curso de biomoléculas* (Consulta: 05.03.2019). Disponible en: <http://www.biorom.uma.es/contenido/UPV_EHU/enzimas/enz3.htm>.

Referencias bibliográficas

Anexo A. Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias en medio acuoso

A.1. Introducción.

En el presente anexo se presentan los detalles más relevantes de la reproducción de la bacteria *Sporosarcina pasteurii*. Los estudios se centraron en dos vertientes: determinación de los parámetros del cultivo en condiciones totalmente controladas y la reproducción de los agentes biológicos en condiciones ambientales.

El primer aspecto, el cultivo, se estudió de forma experimental realizando diferentes pruebas en laboratorio con la bacteria *Sporosarcina pasteurii*; modificando tanto la aportación de nutrientes (tipo y cantidad) como las condiciones térmicas, de agitación, etc. que caracterizan el cultivo en reactores biológicos.

El segundo aspecto, la reproducción del agente biológico en condiciones ambientales, buscaba analizar la influencia de la temperatura ambiental, del tipo de sustrato, la cantidad y el momento de aportación de este sustrato sobre el crecimiento bacteriano. Para ello se controló el crecimiento de colonias en Erlenmeyers donde posteriormente se realizaron pruebas químicas analíticas para poder determinar la influencia de los parámetros anteriormente listados.

Este anexo contiene tres apartados generales en los que se explican los materiales que se utilizaron para realizar el ensayo, su procedimiento y los resultados que se obtuvieron, posteriormente.

A.2. Materiales.

A continuación se enumeran y describen los productos (y sus especificaciones) utilizados en los experimentos detallados en el presente anexo.

A.2.1. Materiales para preparar la solución de cementación.

A.2.1.1. Urea.

La urea es un compuesto químico cristalino e incoloro, de fórmula química CO(NH₂)₂. Es el principal producto final resultante del proceso metabólico de las proteínas en los mamíferos. Se encuentra en abundancia en la orina. Para uso industrial, la urea se produce a partir de amoníaco sintético y dióxido de carbono. La Figura A1. 1 enseña el producto T3Q que se distribuye para uso en laboratorio. La urea se encuentra en estado sólido, concretamente en forma de perlas de uno a cuatro mm de diámetro, y es soluble en agua.

Anexo A. Precipitación de CaCO₃ inducida por bacterias en medio acuoso



Figura A1. 1: Perlas de urea T3Q 5 kg.

En la Tabla A1 1 se pueden ver las especificaciones del producto perlas de urea T3Q en envase de 5 kg.

Ensayo	Especificación
Sólido grano blanco	
Riqueza	Min 99,00 %
Amoniaco libre	Max 100 ppm
Biuret	Max 0,6000 %
Cenizas	Max 0,0020 %
Hierro	Max 1 ppm
Humedad	Max 0,2000 %
Insolubles	Max 0,0050 %
pH (sol 10 %)	9,00 – 10,00

Tabla A1 1: Especificaciones del producto T3Q para 5 kg.

A.2.1.2. Cloruro de calcio di-hidrato.

El cloruro de calcio es un compuesto químico, mineral e inorgánico, de fórmula química CaCl₂. Se usa en las industrias farmacéutica y alimentaria. El cloruro de calcio usado (ver la Figura A1. 2) está hidratado con dos moléculas de agua (CaCl₂ • 2H₂O). Se encuentra en estado sólido, concretamente en forma de polvo blanco, y es soluble en agua. También se distribuye principalmente para uso en laboratorio.

Anexo A. Precipitación de CaCO₃ inducida por bacterias en medio acuoso



Figura A1. 2: Cloruro de calcio di hidrato Riedel-de Haën 500 g.

En la Tabla A1 2 se pueden ver las especificaciones del Cloruro de calcio di hidrato Riedel-de Haën en envase de 500 g.

Ensayo	Especificación
Ensayo químico	Min 99 %
pH (5 %. 20 °C)	4,5 – 8,5
Amonio (NH ₄)	Max 0,005 %
Al	Max 0,0001 %
Ba	Max 0,005 %
Cd	Max 0,0005 %
Cu	Max 0,0005 %
Fe	Max 0,0005%
K	Max 0,005 %
Mg	Max 0,005 %
Na	Max 0,005 %
Sr	Max 0,01 %
Pb	Max 0,0005 %
Metales pesados (como Pb)	Max 0,0005 %
Nitrato (NO ₃)	Max 0,002 %
Sulfate (SO ₄)	Max 0,005 %

Tabla A1 2: Especificaciones del producto Riedel-de Haën 500 g.

A.2.1.3. Lactato de calcio hidrato.

El lactato de calcio es una sal del ácido láctico. Se encuentra de forma natural en el queso y se usa habitualmente en alimentación y en medicina. Su fórmula química es C₆H₁₀CaO₆. El lactato de calcio usado (ver la Figura A1. 3) está hidratado con moléculas de agua (C₆H₁₀CaO₆ • xH₂O). Se encuentra en estado sólido, en forma de polvo blanco, y es soluble en agua. Se distribuye para uso en laboratorio.

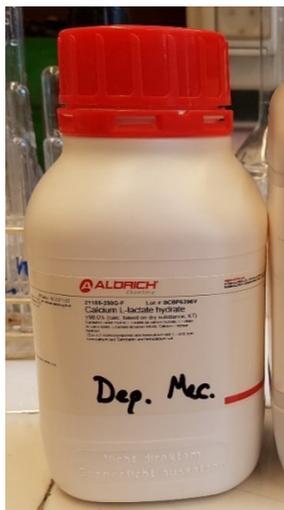


Figura A1. 3: Lactato de calcio hidrato Sigma-Aldrich 500 g.

En la Tabla A1 3 se pueden ver las especificaciones del producto lactato de calcio hidrato Sigma-Aldrich en envase de 500 g.

Ensayo	Especificación
Ensayo químico	≥98,0 %
Concentración	C=5 en agua
Perdida por secado	22 – 27 %
Contenido de carbono	24,83 %
Contenido de hidrógeno	6,25 %

Tabla A1 3: Especificaciones del producto Aldrich 500 g.

A.2.2. Materiales para preparar Bang media.

A.2.2.1. Triptona.

La triptona es una degradación enzimática de la caseína (la principal proteína de la leche). Se utiliza en cultivos de bacterias como fuente de nitrógeno. El producto usado (ver Figura A1. 4) se encuentra en estado sólido, en forma de polvo, de color blanco amarillento, y es soluble en agua. Se distribuye para uso en laboratorio.



Figura A1. 4: Triptona Labkem 500 g.

En la Tabla A1 4 se pueden ver las especificaciones del producto Triptona Labkem en envase de 500 g.

Ensayo	Especificación
	Homogéneo
	Fluye libremente
	Beige
Perdida por secado	≤ 6 %
Total N (en seco)	≥ 10 %
Amino N (en seco)	≥ 3,9 %
Ceniza	≤ 15 %
pH (2 %)	6,5 – 7,5
Ca	≤ 0,019 %
Na	≤ 2,10 %
Mg	≤ 0,0065 %
K	≤ 0,95 %

Tabla A1 4: Especificaciones del producto Triptona Labkem 500 g.

A.2.2.2. Extracto de levadura.

El extracto de levadura está formado por la degradación de las células de levadura por sus propias enzimas. Es un producto rico en vitaminas, aminoácidos y otros factores de crecimiento. Se utiliza en la preparación del cultivo de bacterias como fuente de nutrientes. También se utiliza en la industria alimentaria. El extracto de levadura de la Figura A1. 5 se encuentra en estado sólido, en forma de polvo, de color blanco amarillento, y es soluble en agua. Se distribuye para uso en laboratorio.

Anexo A. Precipitación de CaCO₃ inducida por bacterias en medio acuoso



Figura A1. 5: Extracto de levadura Labkem 500 g.

En la Tabla A1 5 se pueden ver las especificaciones del producto Extracto de levadura Labkem en envase de 500 g.

Ensayo	Especificación
	Homogéneo
	Fluye libremente
	Beige
Humedad	≤ 6,0 %
Total N (en seco)	≥ 10 %
Amino N (en seco)	≥ 4,0 %
NaCl	≤ 2,0 %
pH	4,5 – 6,5
Recuento total en placa	≤ 10000 cfu/g
Bacterias coliformes	≤ 30 MPN/100 g
Análisis patógeno	Negativo

Tabla A1 5: Especificaciones del producto Extracto de levadura Labkem 500 g.

A.2.2.3. Tricina.

La tricina es un compuesto orgánico que se usa en soluciones que mantienen su pH durante la adición de pocas cantidades una base y un ácido (disoluciones Tampón). Es un derivado del compuesto orgánico tris y del aminoácido glicina. La Figura A1. 6 muestra el producto Tricina en envase de 250 g. Es de color blanco, en forma de polvo cristalino, y moderadamente soluble en agua. Se distribuye para uso en laboratorio.



Figura A1. 6: Tricina Sigma-Aldrich 250 g.

En la Tabla A1 6 se pueden ver las especificaciones del producto Tricina Sigma-Aldrich en envase de 250 g.

Ensayo	Especificación
Color	Blanco
Forma	Polvo cristalino
Solubilidad (color)	Incoloro
Solubilidad (turbiedad)	Transparente
Agua	≤ 0,2 %
A290 UV absorbancia	≤ 0,02
Metales pesados	≤ 5 ppm
Valoración con NaOH	≥ 99 %

Tabla A1 6: Especificaciones del producto Tricina Sigma-Aldrich 250 g.

A.2.2.4. Sulfato de amonio.

El sulfato de amonio es una sal que se usa como reactivo para precipitar proteínas solubles. Su fórmula química es $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El producto de la Figura A1. 7 se encuentra en estado sólido, blanco, en forma de cristales, y es soluble en agua. También se distribuye para uso en laboratorio.

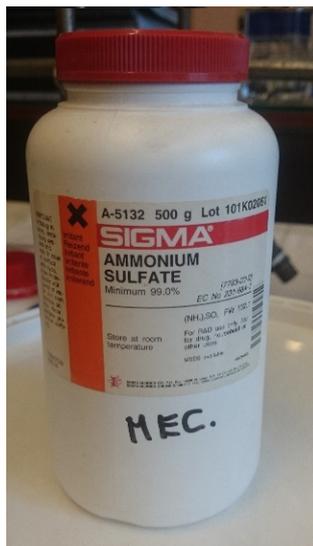


Figura A1. 7: Sulfato de amonio Sigma-Aldrich 500 g.

En la Tabla A1 7 se pueden ver las especificaciones del producto Sulfato de amonio Sigma-Aldrich en envase de 500 g.

Ensayo	Especificación
Color	Blanco
Forma	Polvo o cristales
Solubilidad (color)	De incoloro a amarillo
Solubilidad (turbiedad)	De transparente a poco brumoso
Amonio	Positivo
Sulfato	Positivo
Fe	≤ 10 ppm
Pb	≤ 3 ppm
Se	≤ 5 ppm
Valoración con NaOH	≥ 99 %

Tabla A1 7: Especificaciones del producto Sulfato de amonio Sigma-Aldrich 500 g.

A.2.2.5. Ácido l-glutámico.

El ácido l-glutámico es un aminoácido no esencial. Su proporción es de las más abundantes en el organismo. Se usa habitualmente en la industria alimentaria. También se usa como fuente de nitrógeno en los cultivos. Su fórmula química es $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$. El producto de la Figura A1. 8 se encuentra en estado sólido, en forma de polvo de color blanco, y es soluble en agua. Se distribuye para uso en laboratorio.

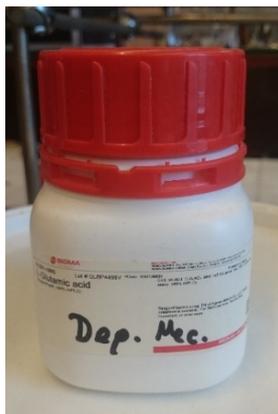


Figura A1. 8: Ácido L-glutámico Sigma-Aldrich 100 g.

En la Tabla A1 8 se pueden ver las especificaciones del producto Ácido L-glutámico Sigma-Aldrich en envase de 100 g.

Ensayo	Especificación
Masa molecular	147,13 g/mol
Mp	205 °C
Ensayo	≥ 99 % (HPLC)
Solubilidad 1 M HCl	Soluble 100 mg/mL

Tabla A1 8: Especificaciones del producto Ácido L-glutámico Sigma-Aldrich 100 g.

A.2.3. Materiales (reactivos) necesarios para realizar la determinación de urea.

A.2.3.1. O-ftalaldehído.

El o-ftalaldehído es un compuesto químico con formulación: C₈H₆O₂. Es un reactivo muy sensitivo que resalta las aminas volviéndolas fluorescentes. Principalmente aquellas contenidas en proteínas, péptidos, y aminoácidos. El producto en Figura A1. 9 se encuentra en estado sólido, en forma de polvo, y es fácilmente soluble en agua.

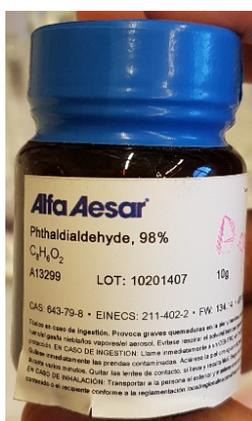


Figura A1. 9: O-ftalaldehído Alfa Aesar 10 g.

Anexo A. Precipitación de CaCO₃ inducida por bacterias en medio acuoso

En la Tabla A1 9 se pueden ver las especificaciones del producto O-ftalaldehído, 98 % Alfa Aesar en envase de 10 g.

Ensayo	Especificación
	Tóxico
	Provoca graves quemaduras en la piel
UV iluminación y oxidación del aire	Sensitivo
pH	7,2 – 7,8

Tabla A1 9: Especificaciones del producto O-ftalaldehído, 98 % Alfa Aesar 10 g.

A.2.3.2. Di-sodio tetraborato decahidratado.

El di-sodio tetraborato decahidratado es un compuesto químico basado en boro con formula: Na₂B₄O₇•10H₂O. De forma natural, se encuentra en los depósitos producidos por la evaporación continua de lagos estacionarios. Su utilización es muy amplia. El di-sodio tetraborato decahidratado en Figura A1. 10 es para uso exclusivo en laboratorio, análisis e investigación y química fina. Se encuentra en estado sólido, en forma de polvo cristalino, de color blanco, y soluble en agua.



Figura A1. 10: Di-sodio tetraborato decahidratado para análisis 500 g.

En la Tabla A1 10 se pueden ver las especificaciones del producto Di-sodio tetraborato decahidratado para análisis en envase de 500 g.

Anexo A. Precipitación de CaCO₃ inducida por bacterias en medio acuoso

Ensayo	Especificación
Ensayo químico	99,5 – 103,0 %
pH de 0,01 mol/l solución	9,15 – 9,20
Materia insoluble en H ₂ O	0,005 %
Cl	0,001 %
NH ₄	0,001 %
PO ₄	0,001 %
SO ₄	0,0025 %
Metales pesados (como Pb)	0,001 %

Tabla A1 10: Especificaciones del producto Di-sodio tetraborato decahidratado para análisis 500 g.

A.2.3.3. Ácido sulfúrico.

El ácido sulfúrico es un compuesto químico que se formula: H₂SO₄. Se usa en la obtención de abono. También se usa para la síntesis de otros ácidos y sulfatos. El ácido sulfúrico en la Figura A1. 11 es mezclable con agua, líquido, incoloro, e inodoro. También es de uso exclusivo en laboratorio, análisis, investigación y química fina.

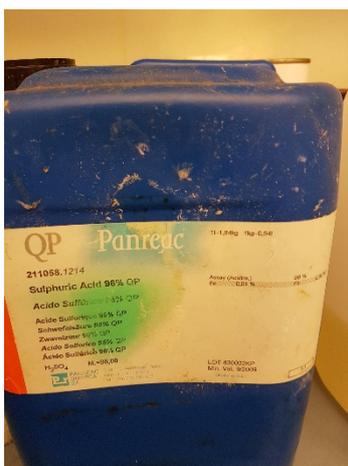


Figura A1. 11: Ácido sulfúrico 96 % QP 1l ≈ 1,84 kg.

En la Tabla A1 11 se pueden ver las especificaciones del producto Ácido sulfúrico 96 % QP en envase de 1l ≈ 1,84 kg.

Ensayo	Especificación
	Extremadamente tóxico
	Corosivo
Indicaciones de peligro	Provoca graves quemaduras en la piel
Fe	0,01 %
Pb	0,01 %
Densidad relativa	1,203 g/ml

Tabla A1 11: Especificaciones del producto Ácido sulfúrico 96 % QP 1l ≈ 1,84 kg.

A.3. Procedimiento experimental.

A.3.1. Procedimiento de preparación de disoluciones.

A.3.1.1. Preparación de suspensiones de *Sporosarcina pasteurii*.

La suspensión de *Sporosarcina pasteurii* (Figura A1. 12) fue preparada por La Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Para la preparación de la suspensión bacteriana se requerían 4 días. Este tiempo fue necesario para poder hacer crecer las bacterias y que no sufrieran ninguna alteración en su genética evitando mutaciones.

Día 1

- Se siembra la cepa de *Sporosarcina pasteurii* en los nutrientes denominados medio sólido Bang-urea, y se incuba a 30°C durante 18-24 h.

Día 2

- Se realizan dos cultivos líquidos de noche de 10 mL cada uno de medio Bang y se incuban a 30°C en agitación.

Día 3

- Se realiza una resiembra del cultivo anterior (dilución 1/100) para obtener un volumen final de 200 mL con medio recién preparado Bang.
- Se preparan 7 Erlenmeyers de estas características en total. Esto es necesario para obtener suspensiones finales con una concentración de 1E+09 cfu/mL.
- Incubar (aproximadamente 20-24h) a 30°C en agitación.

Día 4

- Se centrifugan los cultivos a 8.000 rpm durante 10 min.
- Se retira el sobrenadante y se resuspende mediante agitación por vortex de los sedimentos obtenidos, para obtener un volumen final de 1 litro de medio Bang.

Para determinar la concentración de la suspensión se realizan diluciones decimales seriadas tomando una alícuota de dicha suspensión y sembrando 0,1 mL de las diluciones oportunas en medio Bang sólido mediante siembra en superficie.



Figura A1. 12: *Sporosarcina pasteurii* (concentración $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ cfu/ml) con medio Bang.

A.3.1.2. Preparación de medio Bang.

El medio Bang se preparó en un Erlenmeyer de 2 L (Figura A1. 13) y era 3 veces más concentrado que la concentración inicial necesaria para el crecimiento de las bacterias. La Tabla A1 12 muestra los 5 componentes y la cantidad necesaria de cada uno.

Producto	Cantidad Necesaria (g)	Cantidad Utilizada (g)
Triptona	10	30
Extracto de levadura	5	15
Tricina	4,5	13,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	15
Ácido glutámico	2	6

Tabla A1 12: Tabla resumen de las cantidades del medio Bang.

- Se disuelven todos los componentes en un vaso de precipitados con una mosca.
- Una vez disueltos se enrasa en un volumen final de 1 L.
- Se esteriliza mediante autoclave para eliminar otros microorganismos.



Figura A1. 13: Medio Bang recomendado por UAB.

A.3.1.3. Preparación de la solución de urea.

El medio utilizado para realizar los experimentos debía contener urea con una concentración de 20 g/L. Finalmente, por los motivos que se explican en el siguiente párrafo, la concentración de la solución de urea se aumentó a 250 g/L.

$$\frac{250 \text{ g urea}}{L} * 0,5 \text{ L} = 125 \text{ g urea} \quad (\text{Ec. A1. 1})$$

Se eligió la concentración de 250g/L para reducir costes de producción. Para ello se realizaban soluciones más concentradas que posteriormente se diluían a la concentración deseada. Para preparar la solución (Figura A1. 14) se siguieron los siguientes pasos:

- Pesar 125 g de urea.
- Verter la solución en un matraz aforado de 0.5L.
- Enrasar con agua destilada hasta la marca.
- Esterilizar con Autoclave.



Figura A1. 14: Concentración de urea de 250 g/l.

A.3.1.4. Preparación de la solución de cloruro de calcio.

El cloruro de calcio utilizado, está hidratado con dos moléculas de agua. Sabiendo su masa molecular (pm: 147 g/mol), se calculó la concentración en g/L:

$$25 \text{ mM} = \frac{1 \text{ mol CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}{10^3 \text{ mmol Ca}^{+2}} \cdot \frac{147 \text{ g CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = 3.675 \frac{\text{g CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}{L} \quad (\text{Ec. A1. 2})$$

Una vez determinada la concentración que debe contener el medio, también se decidió utilizar en paralelo una concentración 100 veces superior (367,5 g/L). Este aumento de la concentración suplió la necesidad del aporte de calcio en un volumen menor de líquido.

La concentración de la solución madre del cloruro de calcio que se utilizó era 300 g/L (Figura A1. 15). Es muy importante que la concentración de la solución madre no exceda la solubilidad de los reactivos. La solubilidad del cloruro de calcio es 745 g/L.

$$\frac{300 \text{ g CaCl}_2}{L} * \frac{147.0146 \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}{(147.0146 - 36)\text{CaCl}_2} * 0.5 \text{ L} = 198.642 \text{ g CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \quad (\text{Ec. A1. 3})$$



Figura A1. 15: Concentración de cloruro cálcico 300 g/l.

A.3.1.5. Preparación de la solución de lactato de calcio.

Al igual que en el caso anterior, el lactato de calcio utilizado en este caso está hidratado con moléculas de agua. Sabiendo la masa molecular del lactato de calcio (pm: 218.22 g/mol), se calculó la concentración en g/L:

$$25 \text{ mM} = \frac{1 \text{ mol}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2\text{Ca}}{10^3 \text{ mmol Ca}^{+2}} \cdot \frac{218.22 \text{ g}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2\text{Ca}}{1 \text{ mol}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2\text{Ca}} = 5.45 \frac{\text{g}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2\text{Ca}}{L} \quad (\text{Ec. A1. 4})$$

Una vez determinada la concentración del lactato de calcio que debe contener el medio, se preparó una concentración 10 veces superior (54,5 g/L; Figura A1. 16). Este aumento de la concentración suplió la necesidad del aporte de calcio en un volumen menor de líquido.

$$\frac{54,5 \text{ g C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6 * x\text{H}_2\text{O}}{L} * 0.5 \text{ L} = 27.25 \text{ g C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6 \quad (\text{Ec. A1. 5})$$

Con el objetivo de simplificar la parte experimental se decidió que existiera una relación entre el volumen de la solución del lactato de calcio y el volumen a utilizar en los ensayos. De esa manera, el volumen necesario para los ensayos también se preparó con una concentración 10 veces superior.



Figura A1. 16: Concentración de lactato de calcio 54,5 g/l.

A.3.2. Procedimiento y configuración de los ensayos.

El segundo aspecto de este estudio fue analizar la evolución del agente biológico para cada tipo de condiciones de cultivo.

El objetivo de este experimento fue determinar la cantidad de urea, la cantidad de carbonato de calcio precipitado y el pH a lo largo del tiempo para cada tipo de cultivo. Se realizó el mismo procedimiento en 11 Erlenmeyers diferentes en las mismas condiciones de agitación y temperatura, puestos en un baño con agitación (el procedimiento y las condiciones de los ensayos están explicados en los siguientes dos apartados). Posteriormente, cada hora se determinaba la cantidad de urea, la cantidad de carbonato cálcico precipitado y el pH del medio. De esta manera se pudo observar el comportamiento que tenía la reacción bio-química en función del tiempo y se pudieron representar gráficos que caracterizaban la cinética de la reacción.

A.3.2.1. Preparación de las probetas.

Para realizar cada prueba, se utilizaron 11 Erlenmeyers todos previamente limpiados con jabón y aclarados con agua destilada. Para ajustar la concentración requerida de bacteria, primero se preparaba la suspensión bacteriana requerida con el medio Bang y agua destilada. De esta forma se podía verter la solución bacteriana con la concentración adecuada directamente.

En cada Erlenmeyer se introducía el medio Bang con la concentración requerida de bacterias, dejando el volumen justo para las disoluciones de calcio y urea. Una vez se tenían introducidas las cantidades de suspensión bacteriana, se introducían los Erlenmeyers dentro del baño térmico con agitación, tal y como se muestra en la Figura A1. 17.

Una vez posicionados los Erlenmeyers, se realizaba la adición de urea y calcio correspondiente al mismo tiempo. De esta forma se pudo confirmar que todas las probetas estaban en las mismas condiciones y la reacción que se producía en su interior era la misma en todas. Una vez hecha la adición, se ponía en funcionamiento la agitación del baño térmico y se realizaban las pruebas correspondientes durante 10 horas para ver la evolución de los parámetros de estudio en el tiempo. Finalmente, se dejaba un Erlenmeyer en agitación

durante toda la noche, para poder determinar las mismas variables al transcurrir 24h. El baño térmico con agitación utilizado es el que se muestra en la Figura A1. 18.



Figura A1. 17: Posición de las probetas en el baño con agitación.



Figura A1. 18: Baño térmico con agitación utilizado.

En continuación se muestra el cálculo de la cantidad de las soluciones utilizadas conforme el número del test (Tabla A1 13):

- Cantidad de urea

$$50 \text{ ml Erlenmayer} * \frac{20 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} * \frac{1000 \text{ ml}}{250 \text{ g}} \quad (\text{Ec. A1. 6})$$

= 4ml de la solución concentrada de urea

- Cantidad de cloruro de calcio

$$50 \text{ ml Erlenmayer} * \frac{3,675 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} * \frac{1000 \text{ ml}}{397.28 \text{ g}} \quad (\text{Ec. A1. 7})$$

= 0.5 ml de la solución concentrada de CaCl₂ · 2H₂O

- Cantidad de lactato de calcio

$$50 \text{ ml Erlenmayer} * \frac{5.45 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} * \frac{1000 \text{ ml}}{54.5 \text{ g}} \quad (\text{Ec. A1. 8})$$

= 5 ml de la solución concentrada de C₆H₁₀CaO₆ · xH₂O

A.3.2.2. Determinación de los parámetros de cultivo.

Con el objetivo de examinar las condiciones ideales para el crecimiento de las bacterias, se llevaron a cabo 6 pruebas diferentes. En la Tabla A1 13 se pueden observar los parámetros de las 6 pruebas.

Estas pruebas se centraron en determinar la influencia de 5 factores:

Anexo A. Precipitación de CaCO₃ inducida por bacterias en medio acuoso

- Temperatura.
- Fuente de calcio.
- Concentración de calcio.
- Concentración de bacteria.
- Combinación de una alta concentración de calcio y bacteria.

Test	Temperatura [°C]	Concentración de bacterias [cfu/ml]	Fuente de calcio	Concentración de iones de calcio [mmol/L]	Concentración de urea [mmol/L]
1	37	1.10 ⁷	CaCl ₂	25	333
2	25	1.10 ⁷	C ₆ H ₁₀ CaO ₆	25	333
3	25	1.10 ⁷	CaCl ₂	25	333
4	25	1.10 ⁷	CaCl ₂	250	333
5	25	1.10 ⁹	CaCl ₂	25	333
6	25	1.10 ⁹	CaCl ₂	250	333

Tabla A1 13: Condiciones de las pruebas a realizar.

Para realizar el contraste entre pruebas, se determinó la cinética que tenían las bacterias en los diferentes escenarios y posteriormente se analizaron las diferencias entre ellas. El contraste que se realizó entre las diferentes pruebas para determinar la influencia de los factores, se muestra en la Tabla A1 14:

Test	Información de la influencia
[1 – 3]	Temperatura.
[2 – 3]	Fuente de calcio.
[4 – 3]	Concentración de calcio.
[5 – 3]	Concentración de bacterias.
[5 – 6]	Efecto de elevar la concentración de calcio cuando la de bacterias es alta.

Tabla A1 14: Tabla resumen de los contrastes de las pruebas.

A.3.2.3. Determinación del consumo de urea.

Para poder cuantificar el consumo de urea que realizaban las bacterias, se procedió en primer lugar a determinar su cantidad.

Una primera aproximación hallada en la literatura [72] fue intentar controlar la cantidad de urea de forma directa, mediante un análisis espectrofotómetro. La urea en presencia de o-ftalaldehído en un medio ácido reacciona produciendo un complejo coloreado. La tonalidad de la reacción varía en función de la concentración de urea. Debido a que el método estaba incompleto y tras varios intentos para descartar fallos experimentales, se constató que en varios artículos en los que se utiliza esta técnica se añaden otros componentes al O-ftalaldehído que imposibilitan la determinación de urea de forma fiable.

A continuación se resumen los dos procesos realizados:

El primero consistió en preparar 2 reactivos, los cuales provocarían un cambio de color a la muestra. La concentración de urea dependería de este color. El segundo proceso, consistía en realizar una recta patrón del método, realizando el mismo procedimiento con unas concentraciones conocidas (Tabla A1 15).

Reactivo	Compuesto	Concentración
R1	O-ftalaldehído	4,8 mmol/l
R2	Solución borato Ácido sulfúrico	87 mmol/l 3 mmol/l

Tabla A1 15: Reactivos necesarios para realizar la determinación de urea [72].

Finalmente, se decidió utilizar un método alternativo consistente en determinar la urea que se consume de forma indirecta mediante la cantidad de carbonato cálcico que se forma. La producción de un mol carbonato cálcico equivale a un mol de urea consumida; de esta forma se puede determinar la cantidad de urea consumida. El procedimiento se explica en continuación.

A.3.2.4. Determinación del carbonato de calcio precipitado.

La reacción que se realiza en cada Erlenmeyer produce carbonato cálcico, el cual es un sólido insoluble y puede ser separado mediante una filtración de sólidos. Por lo tanto, el proceso consistió en filtrar el contenido del Erlenmeyer mediante un embudo Büchner conectado a un Kitasato y una bomba de vacío, tal y como se muestra en la Figura A1. 19.



Figura A1. 19: Proceso de filtración mediante un embudo Büchner conectado a un Kitasato y una bomba de vacío.

Esta filtración se realizó mediante el papel de filtro Whatman, con grado particular N°6. Esto permitió separar el carbonato de calcio del medio de reacción y cuantificarlo realizando una

pesada indirecta, pesando el papel antes y después de la filtración. Ésta masa correspondía al carbonato cálcico, pudiéndose determinar los moles producidos finalmente.

Una vez se determinaron los moles de carbonato de calcio, se podía calcular la urea que se ha consumido, ya que fue la única fuente de carbonato que se aportó al medio. La urea consumida se pudo extrapolar mediante el método de estequiometría. Este método usa una ecuación química balanceada para calcular las cantidades de reactivos y productos.

A.3.2.5. Determinación del pH.

Era necesario realizar un control del pH para poder relacionar la actividad enzimática de la ureasa y la producción de carbonato cálcico. Para tener una actividad urética máxima, el rango de pH que necesita ésta enzima está comprendida en un margen de pH entre 8 y 9. Si se tiene un control del carbonato cálcico precipitado y un correcto control del pH puede suceder que en el rango de pH descrito se obtenga la máxima cantidad de carbonato cálcico. Esto abre la puerta a pensar que si inicialmente se ajusta el pH requerido se puede acelerar la producción de carbonato cálcico.

La determinación del pH se realizó mediante un medidor de pH de forma directa. Para poder utilizar el equipo, primero se calibró mediante unas disoluciones patrones estándar de pH 4.01, posteriormente pH 7.01 y finalmente pH 10.01.

Para realizar las medidas de pH, se introdujo una muestra del Erlenmeyer dentro de un vaso de precipitado pequeño. Posteriormente, se colocó el detector dentro del vaso hasta que quedaba sumergido. Finalmente, después de leer el valor del pH se limpiaba el detector con agua destilada. El equipo utilizado fue CRISON GLP21 tal y como se muestra en la Figura A1. 20.



Figura A1. 20: Medidor de pH CRISON GLP21.

A.3.2.6. Cinética de la reacción.

Las bacterias *Sporosarcina pasteurii* tienen la capacidad de inducir la precipitación del carbonato cálcico por sí mismas, convirtiéndose en un punto de nucleación. Esto es debido a que las bacterias son capaces de producir la enzima ureasa (hidrolizando la urea en el medio), amonio y ácido carbámico. La reacción que se produce es enzimática, y esto comporta que la

cinética de la reacción sea enzimática, siguiendo el modelo de Michaelis-Menten. Este modelo describe la velocidad de la reacción a través de la concentración del sustrato, obteniendo:

$$V = V_{max} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Ec. A1. 9})$$

Donde:

V = velocidad de reacción.

K_M = constante de Michaelis-Menten.

V_{MAX} = velocidad máxima.

[S] = concentración de sustrato.

La concentración de urea y la velocidad de reacción en cada prueba se analizaron experimentalmente construyendo un gráfico de Lineweaver –Burk (o doble gráfica recíproca) que es una derivación de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{V} = \frac{(K_m + [S])}{(V_{max}[S])} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (\text{Ec. A1. 10})$$

A partir de éste gráfico se analizó más detalladamente la cinética de la ureasa en cada prueba. Existen tres restricciones que el modelo de Michaelis-Menten debe cumplir [73]:

- La enzima y el sustrato deben estar disueltos en el medio.
- La concentración de la enzima debe ser constante. Cuando la concentración de enzima-sustrato es constante, la velocidad de formación de productos también es constante.
- La concentración del sustrato debe ser mayor que la concentración de la enzima (el sustrato debe permanecer diluido a lo largo de la reacción). Cuando la concentración del complejo enzima-sustrato es baja y constante, su velocidad de formación es igual a la de su disociación.

En este caso las tres restricciones no se cumplieron, debido a que:

- La enzima y la bacteria estaban juntas (no existía un medio durante la reacción en el que estuviesen disueltas).
- La cantidad de bacterias seguía aumentando continuamente, por lo que la concentración de enzima dejó de ser constante. Este hecho, influyó en la variación de la pendiente de la gráfica.
- A lo largo de la reacción se mantuvo una concentración alta del sustrato (y con ello, de la enzima).

Debido a que estas tres restricciones no se cumplieron, no fue posible definir la cinética de la ureasa de forma cuantitativa, sin embargo, se pudo definir cualitativamente.

A.4. Resultados obtenidos.

En continuación se presentan los resultados obtenidos de las 6 pruebas realizadas. Los resultados se muestran en tres apartados generales. En el primer apartado se muestran los valores inicial y final de pH, y se representan en gráficos el consumo de urea y formación de carbonato de calcio en función del tiempo. En el segundo apartado se representa en gráficos la cinética enzimática de cada test. En el tercer apartado se muestran las fotografías del carbonato cálcico obtenido en los experimentos químicos mediante un microscopio óptico.

A.4.1. PH, consumo de urea y formación de carbonato de calcio.

A.4.1.1. Test 1.

Esta prueba consistió, en realizar la reacción con una concentración de bacterias y de cloruro cálcico baja (1.10^7 cfu/ml; 3,675 g/L) con una temperatura de 37°C dentro del baño térmico (Figura A1. 21).

Valor de pH inicial: 6,75

Valor de pH final: 9,68

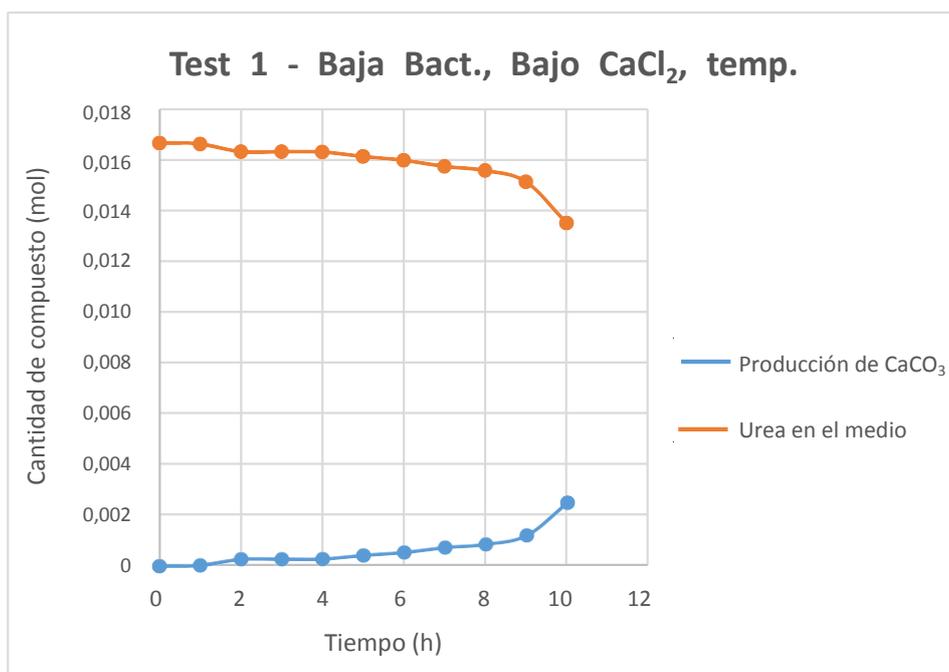


Figura A1. 21: Gráfico de consumo de urea y formación de CaCO_3 en la prueba 1.

A.4.1.2. Test 2.

Esta prueba consistió en realizar la reacción con una concentración de bacterias y de lactato de calcio baja (1.10^7 cfu/ml; 5,45 g/L) con una temperatura de 25°C dentro del baño térmico. Con esta prueba se pretendía observar la influencia del lactato de calcio como fuente de calcio (Figura A1. 1).

Valor de pH inicial: 6,58

Valor de pH final: 9,80

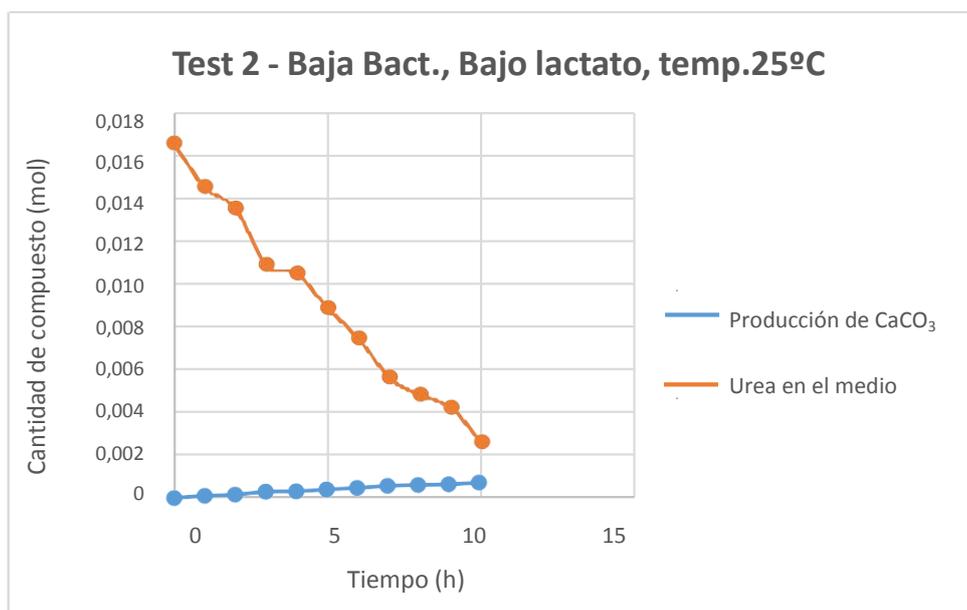


Figura A1. 22: Gráfico de consumo de urea y formación de CaCO_3 en la prueba 2.

A.4.1.3. Test 3.

Esta prueba consistió en realizar la reacción con una concentración de bacterias y de cloruro cálcico baja ($1 \cdot 10^7$ cfu/ml; 3,675 g/L) con una temperatura de 25°C dentro del baño térmico. Con esta prueba se pretende observar la influencia de la temperatura (Figura A1. 23).

Valor de pH inicial: 6,65

Valor de pH final: 9,50

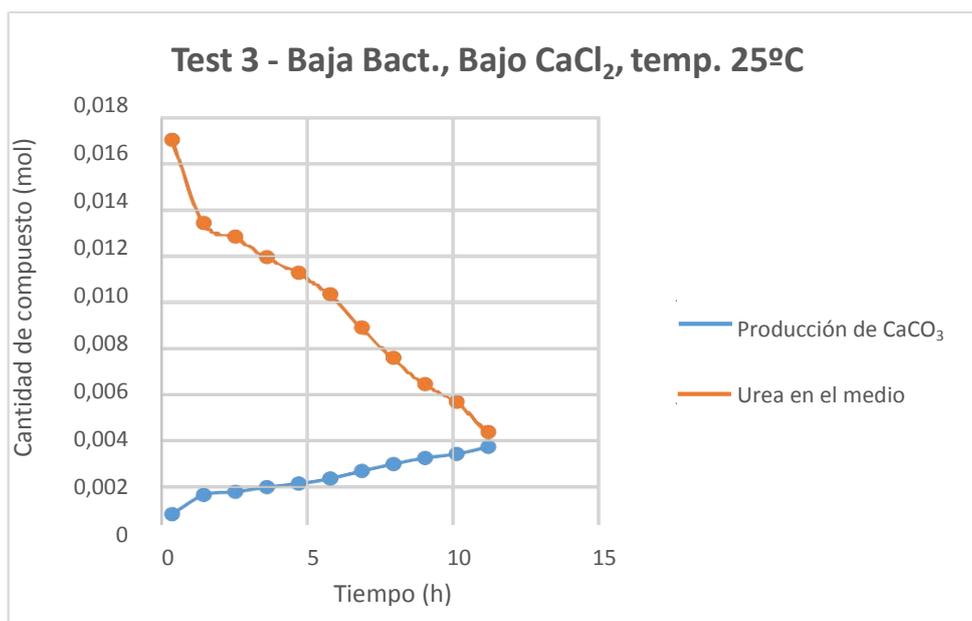


Figura A1. 23: Gráfico de consumo de urea y formación de CaCO_3 en la prueba 3.

A.4.1.4. Test 4.

Esta prueba consistió en realizar la reacción con una concentración de bacterias baja con una alta concentración de cloruro cálcico (1.10^7 cfu/ml; 367,5 g/L) y con una temperatura de 25°C dentro del baño térmico. Con esta prueba se pretendía observar la influencia de la concentración de calcio (Figura A1. 24).

Valor de pH inicial: 6,24

Valor de pH final: 8,33

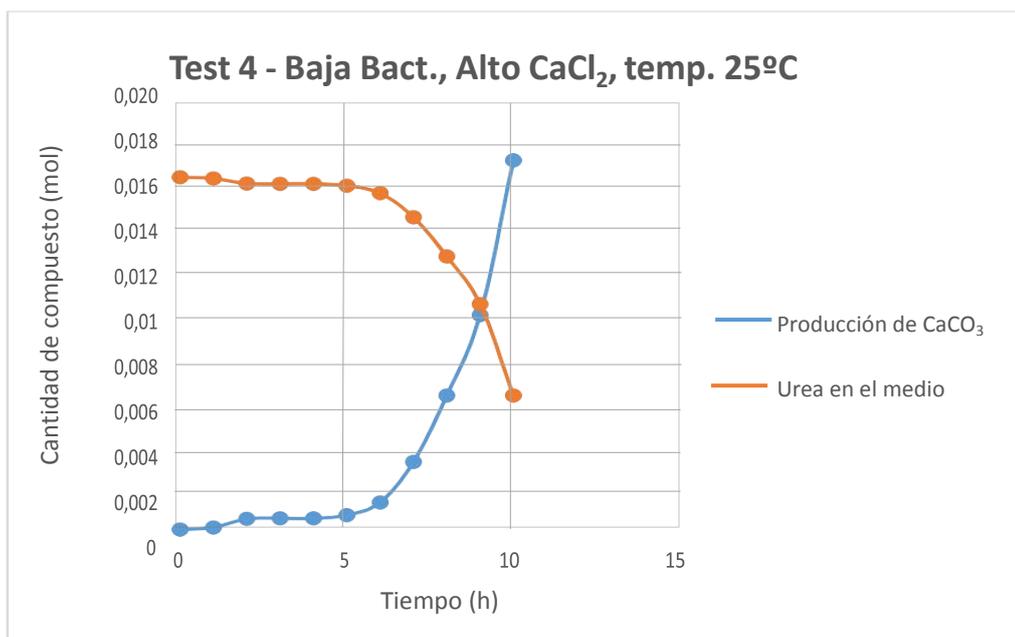


Figura A1. 24: Gráfico de consumo de urea y formación de CaCO_3 en la prueba 4.

A.4.1.5. Test 5.

Esta prueba consistió en realizar la reacción con una concentración de cloruro cálcico baja (3,675 g/L), pero con una alta concentración de bacterias (1.10^9 cfu/ml) y con una temperatura de 25°C dentro del baño térmico. Con esta prueba se pretendía observar la influencia de la concentración de las bacterias (Figura A1. 25).

Valor de pH inicial: 9,51

Valor de pH final: 9,67

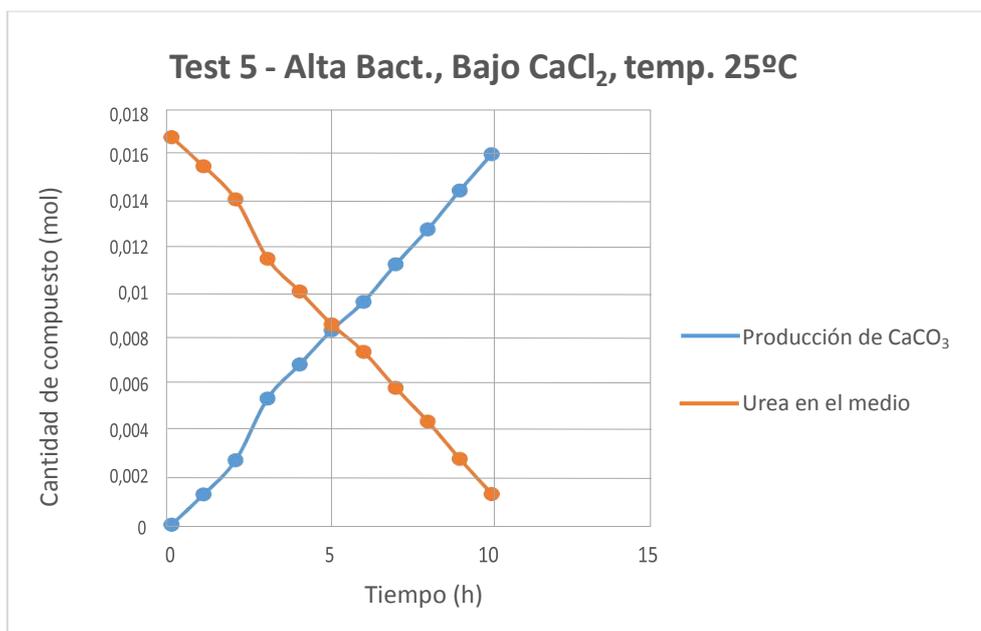


Figura A1. 25: Gráfico de consumo de urea y formación de CaCO_3 en la prueba 5.

A.4.1.6. Test 6.

Esta prueba consistió en realizar la reacción con una concentración de bacterias y de cloruro cálcico alta (1.10^9 cfu/ml; 367,5 g/L) con una temperatura de 25°C dentro del baño térmico. Con esta prueba se pretendía observar el comportamiento de la reacción a una alta concentración (Figura A1. 26).

Valor de pH inicial: 8,80 Valor de pH final: 9,08

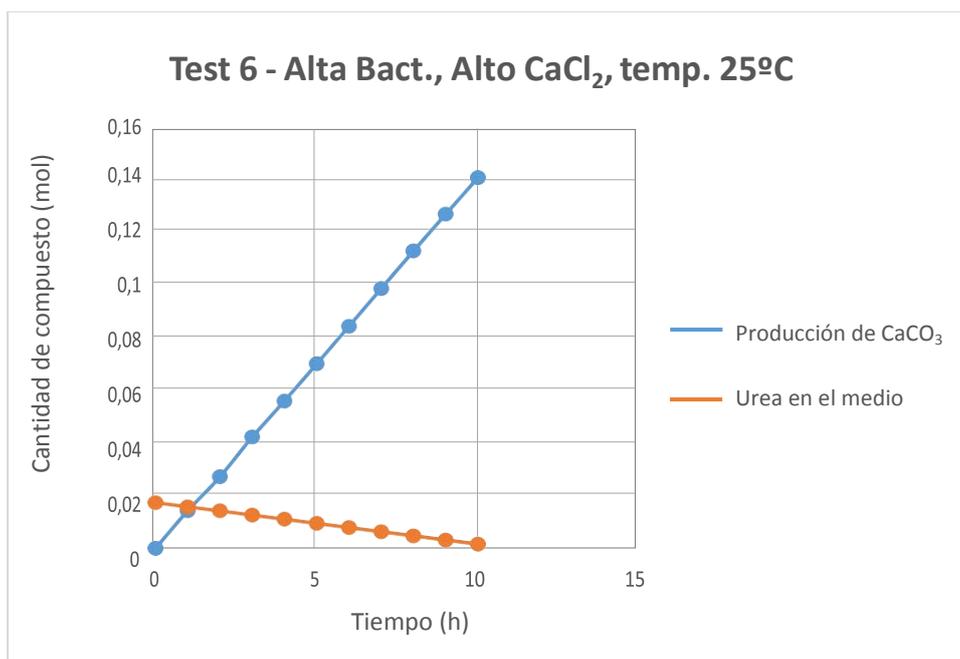


Figura A1. 26: Gráfico de consumo de urea y formación de CaCO_3 en la prueba 6.

A.4.2. Representación de la cinética de la reacción.

A.4.2.1. Test 1 (1.10^7 cfu/ml; 3,675 g/L; temp. 37°C).

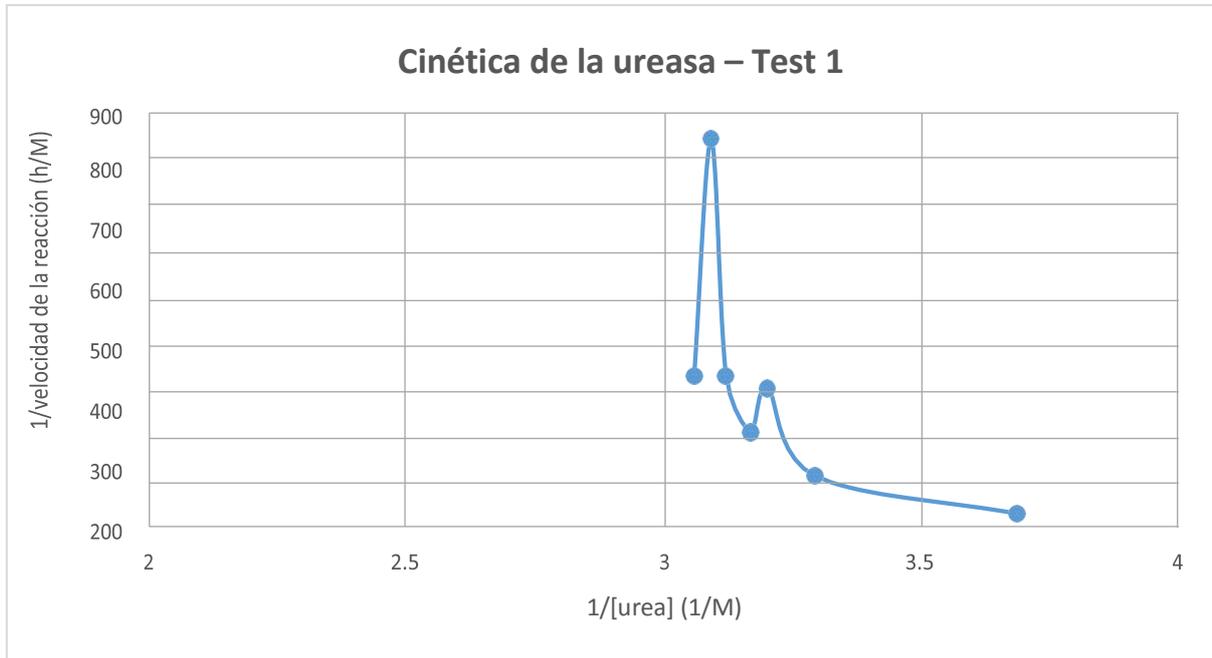


Figura A1. 27: Gráfico de la cinética del test 1.

A.4.2.2. Test 2 (1.10^7 cfu/ml; 5,45 g/L temp. 25°C).

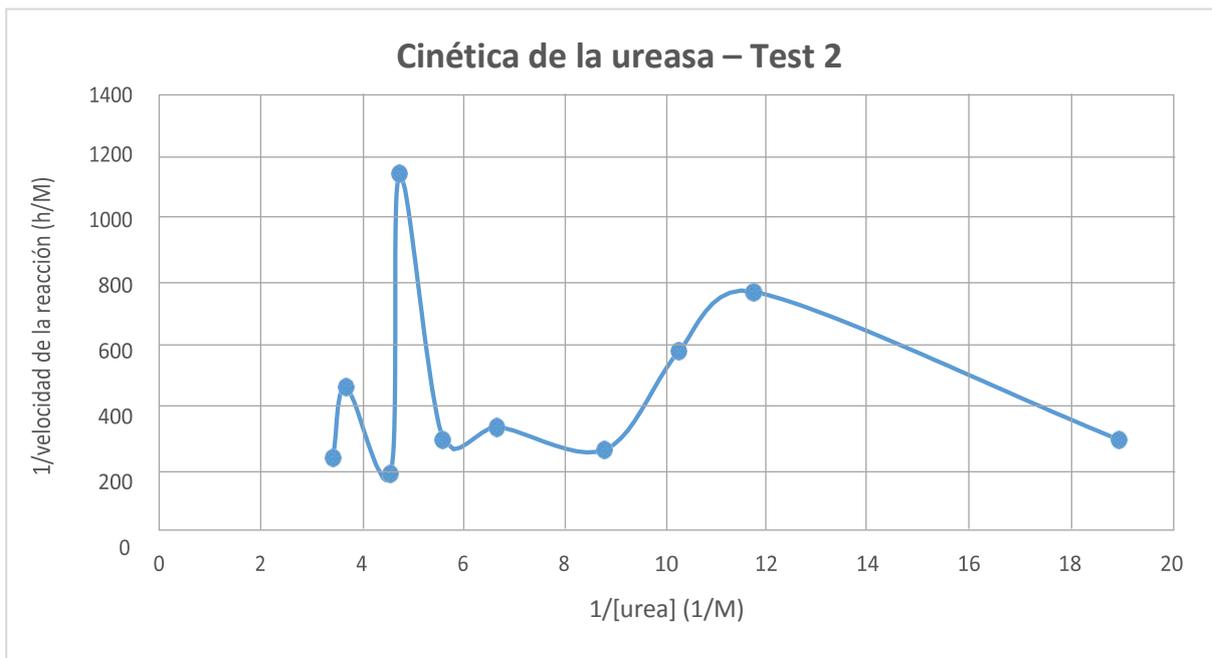


Figura A1. 28: Gráfico de la cinética del test 2.

A.4.2.3. Test 3 (1.10⁷ cfu/ml; 3,675 g/L; temp. 25°C).

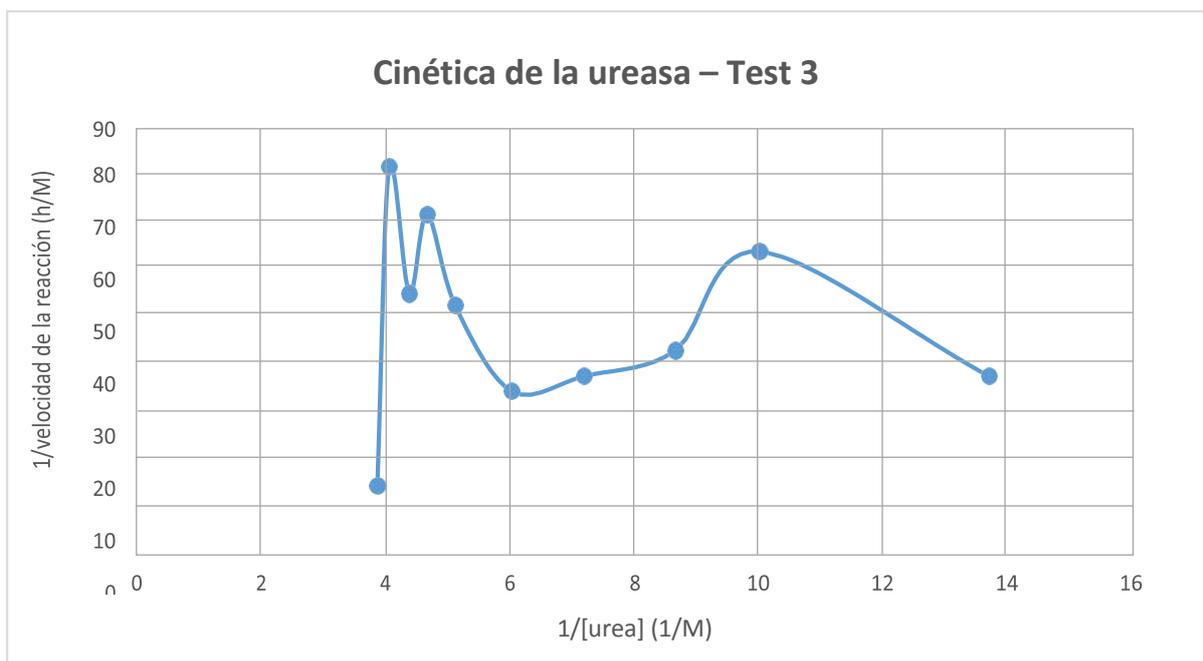


Figura A1. 29: Gráfico de la cinética del test 3.

A.4.2.4. Test 4 (1.10⁷ cfu/ml; 367,5 g/L; temp. 25°C).

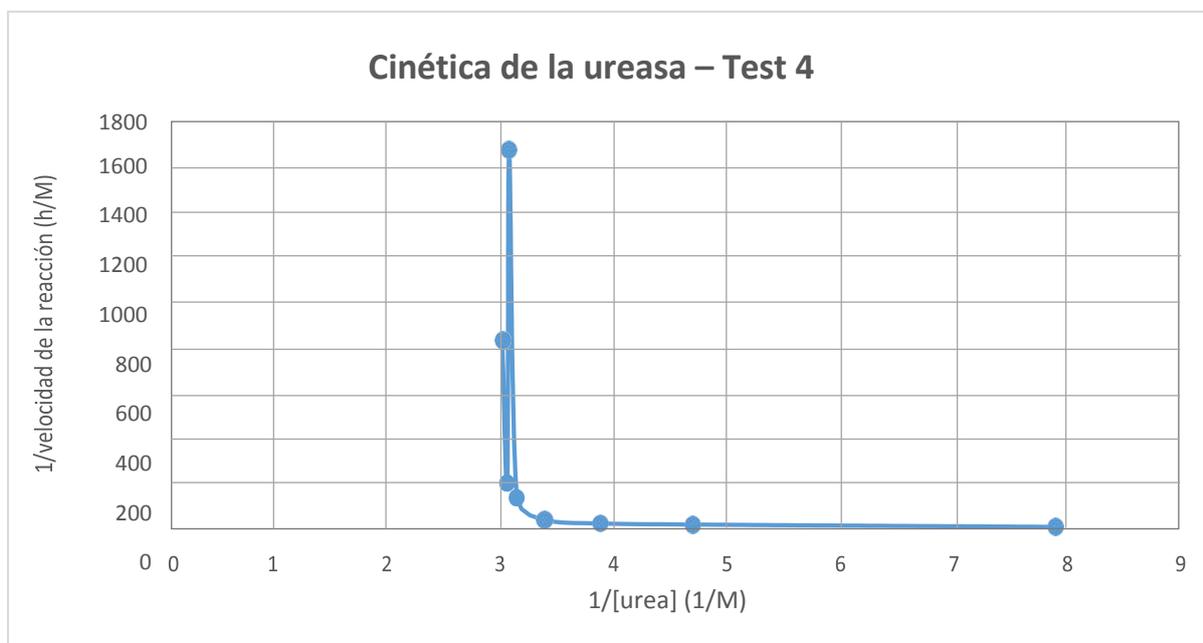


Figura A1. 30: Gráfico de la cinética del test 4.

A.4.2.5. Test 5 (1.10^9 cfu/ml; 3,675 g/L; temp. 25°C).

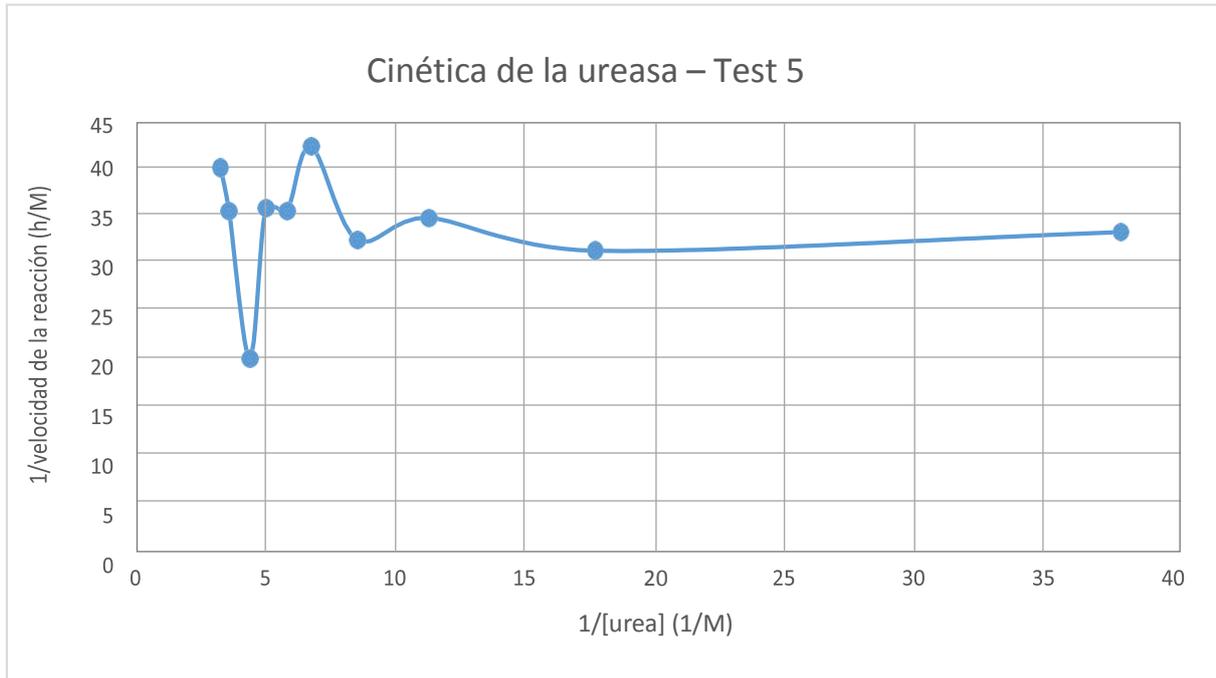


Figura A1. 31: Gráfico de la cinética del test 5.

A.4.2.6. Test 6 (1.10^9 cfu/ml; 367,5 g/L; temp. 25°C).

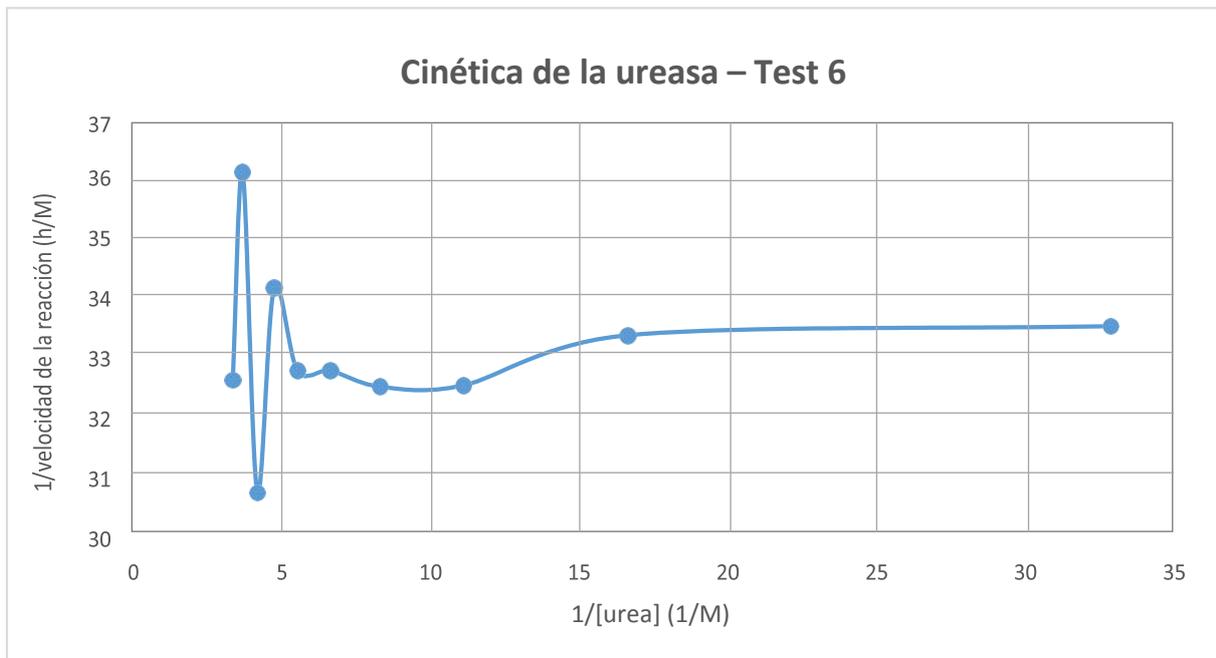


Figura A1. 32: Gráfico de la cinética del test 6.

A.4.3. Forma del carbonato cálcico obtenido.

El carbonato cálcico obtenido en los experimentos anteriores fue observado mediante un microscopio óptico como el mostrado en la Figura A1. 29. En todos los experimentos se observó que se habían formado cristales con forma esférica, y que su tamaño seguía una distribución Gaussiana teniendo como valor medio 10µm y en los extremos 2µm y 20µm.



Figura A1. 33: Microscopio óptico OLYMPUS.

A.4.3.1. Test 1 (Figura A1. 34).

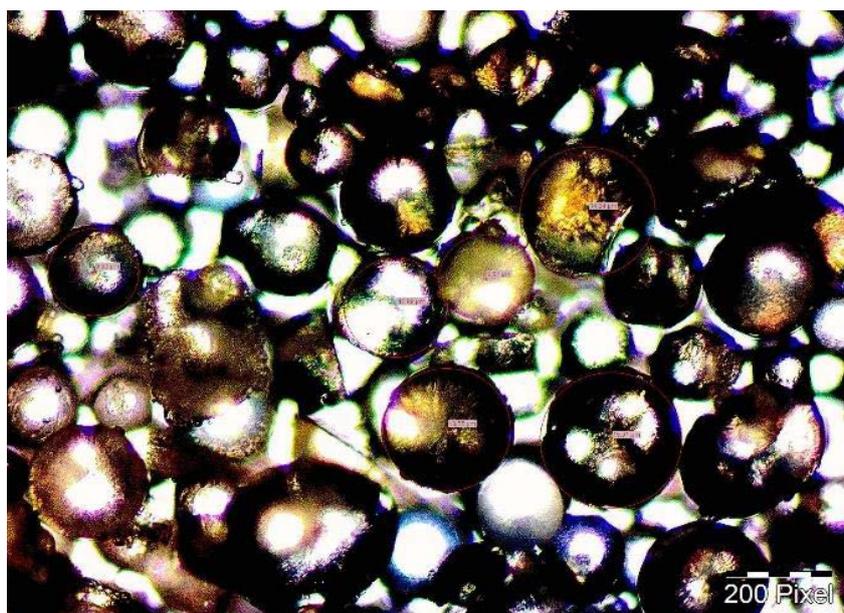


Figura A1. 34: Fotografía de los cristales obtenidos en la prueba 1.

A.4.3.2. Test 2 (Figura A1. 35).



Figura A1. 35: Fotografía de los cristales obtenidos en la prueba 2.

A.4.3.3. Test 3 (Figura A1. 36).

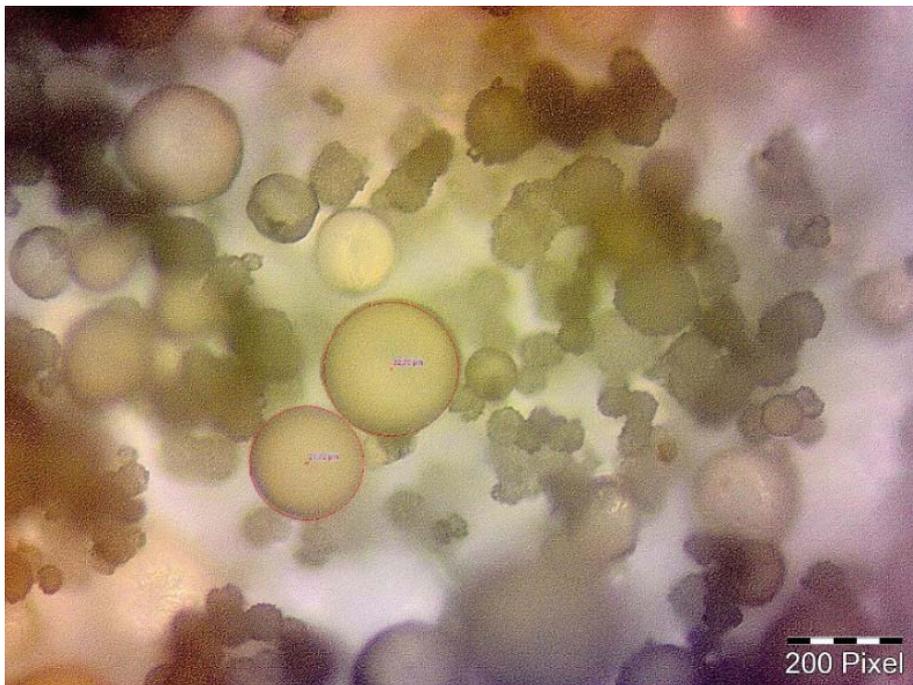


Figura A1. 36: Fotografía de los cristales obtenidos en la prueba 3.

A.4.3.4. Test 4 (Figura A1. 37).

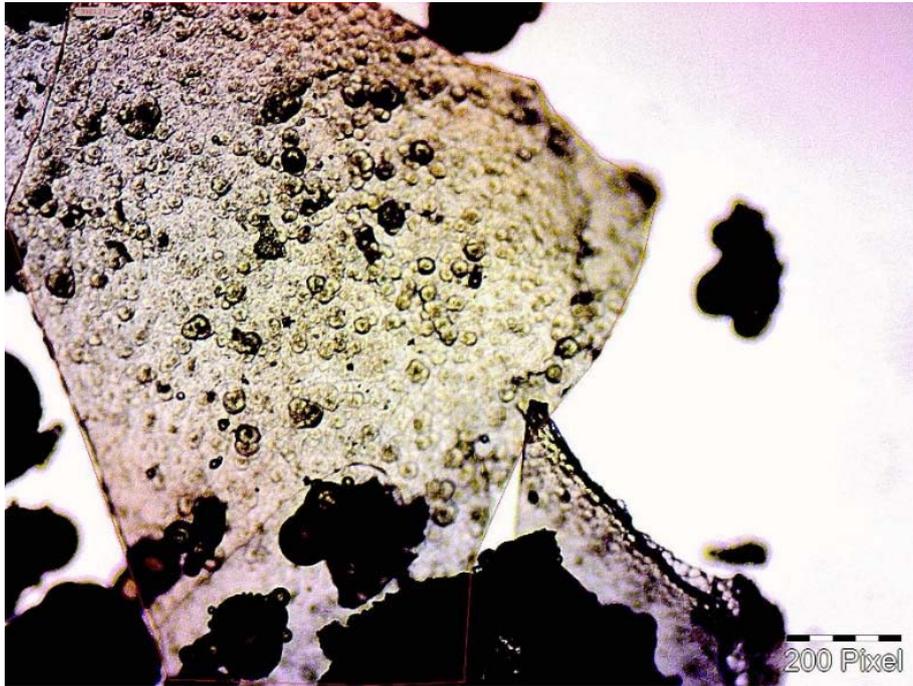


Figura A1. 37: Fotografía de los cristales obtenidos en la prueba 4.

A.4.3.5. Test 5 (Figura A1. 38).

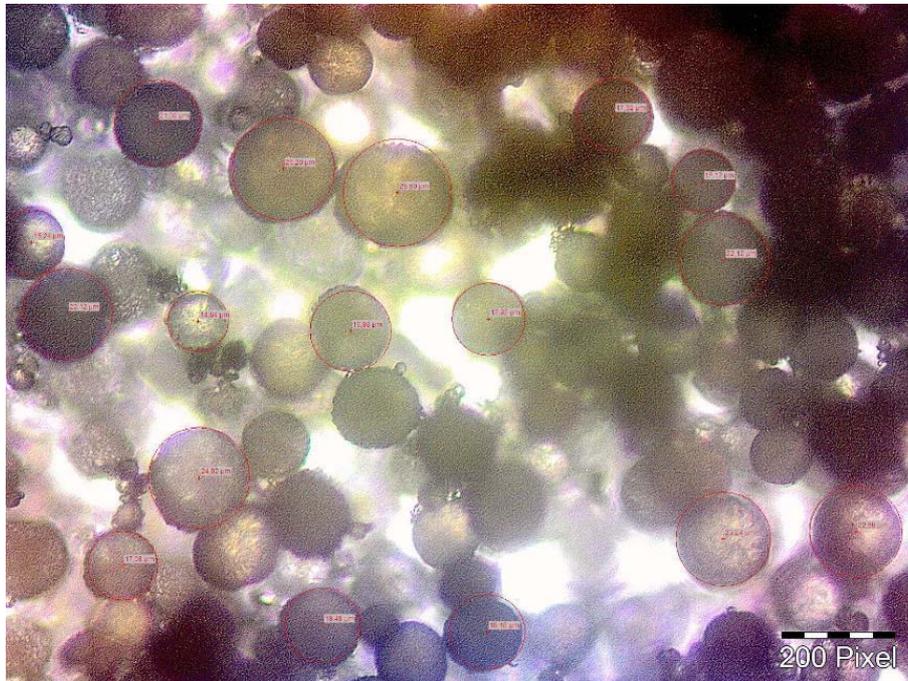


Figura A1. 38: Fotografía de los cristales obtenidos en la prueba 5.

A.4.3.6. Test 6 (Figura A1. 39).

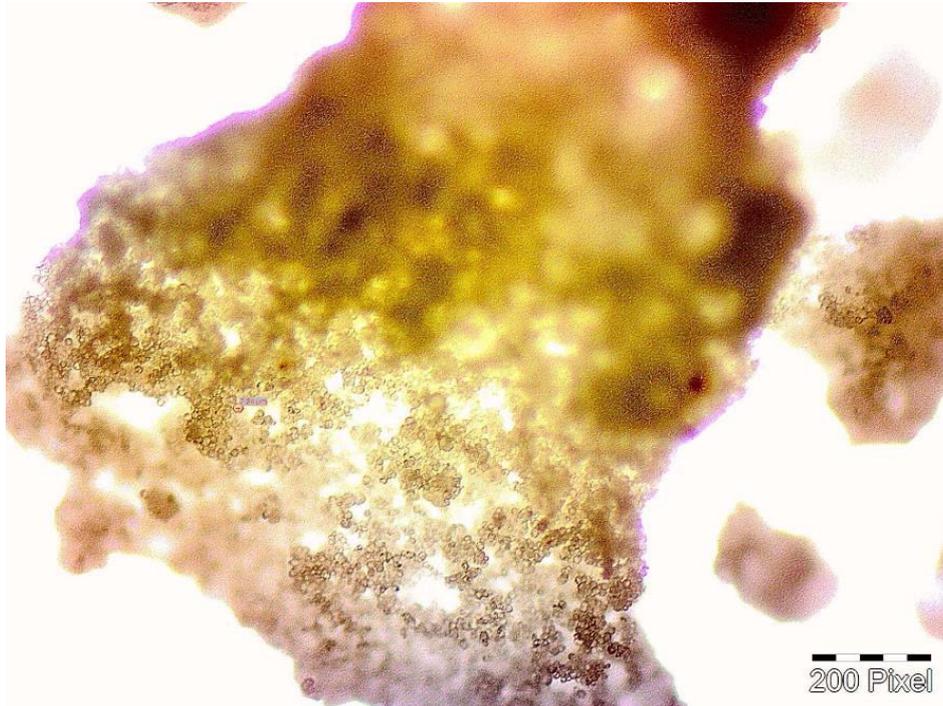


Figura A1. 39: Fotografía de los cristales obtenidos en la prueba 6.

Anexo B. Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

B.1. MICP en probetas cilíndricas de suelo sin compactación.

B.1.1. Introducción.

El objetivo de este ensayo fue determinar los parámetros más importantes del cultivo que permitirían optimizar el proceso de bioestabilización y aumentar la efectividad bacteriana en la precipitación del carbonato de calcio.

Para conseguir este objetivo, en primer lugar se caracterizaron los suelos que se consideraban prioritarios para la aplicación de la tecnología de bioestabilización microbiana. Esta caracterización de los suelos se realizó básicamente en función de su distribución granulométrica. Además, se consideró la humedad inicial en términos de capacidad de absorción de líquido, ya que este factor podía limitar el aporte total de suspensiones y disoluciones durante el proceso de estabilización, y consecuentemente requerir de concentraciones mayores.

En segundo lugar se realizaron diversos ensayos sobre probetas sometidas a tratamientos de estabilización con concentraciones bacterianas diferentes y un ensayo de hielo-deshielo para comprobar la efectividad de la bioestabilización bacteriana frente a este tipo de acción.

Por último se llevaron a cabo ensayos a compresión uniaxial no confinada sobre las probetas tratadas con MICP y sobre probetas de control. Los resultados se tabularon y posteriormente resumieron para facilitar el diseño de las soluciones de bioestabilización.

El presente anexo contiene tres apartados generales en los que se explican los materiales que se utilizaron para realizar el ensayo, el procedimiento de producción/ensayo y los resultados que se obtuvieron mediante los tests a compresión.

B.1.2. Materiales.

A continuación se enumeran y describen los productos y los materiales (y sus especificaciones) utilizados en los experimentos detallados en el presente anexo.

B.1.2.1. Suelos a estabilizar.

Para realizar este ensayo se establecieron dos tipologías principales de suelos a estabilizar: suelos granulares finos y suelos arcillosos. Su caracterización se basó en la distribución granulométrica según la norma UNE 103-101-1995.

B.1.2.1.1. Suelos granulares finos.

Dos distribuciones granulométricas de suelos granulares finos se tuvieron en cuenta para los ensayos de estabilización: SS y CS, correspondiendo respectivamente a un suelo de arena fina y

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

un suelo de arena gruesa. Las distribuciones granulométricas de estos suelos pueden observarse en la Figura B1. 1.

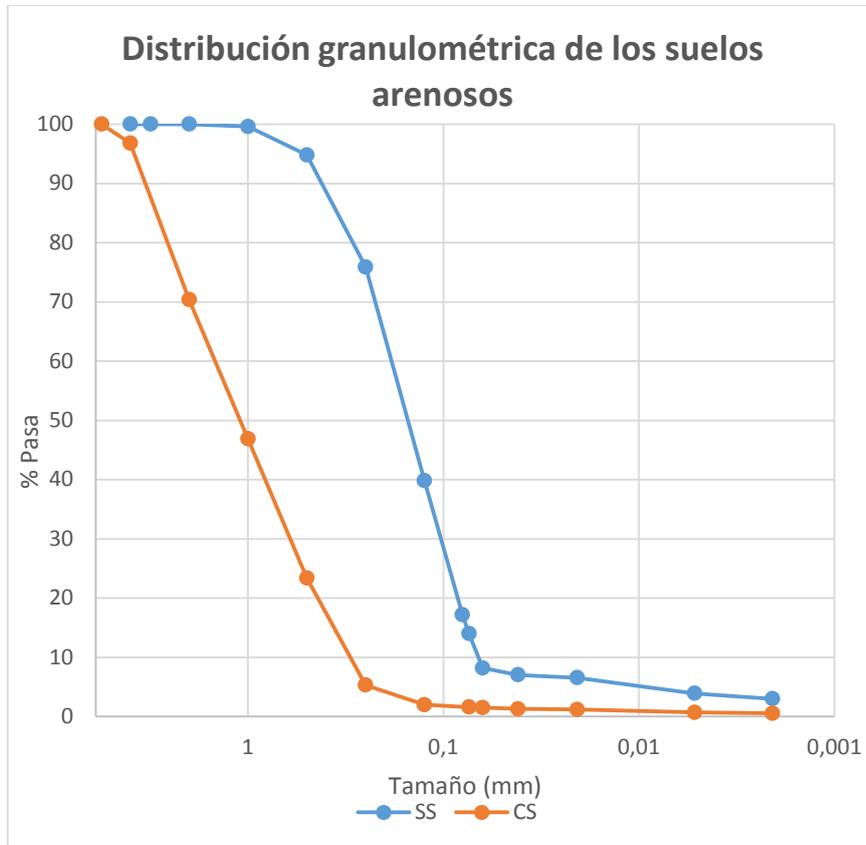


Figura B1. 1: Distribución granulométrica de los suelos arenosos.

B.1.2.1.2. Suelos arcillosos.

Dos distribuciones granulométricas de suelos arcillosos se tuvieron en cuenta para los ensayos de estabilización:

- M1, que corresponde a un suelo arenoso con arcilla. Su composición es 65 % de arena fina, 25 % de arena gruesa, y 10 % de arcilla + limo.
- M2, que corresponde a un suelo arcilloso con arena. Su composición es 45 % de arena fina, 15 % de arena gruesa, y 40 % de arcilla + limo.

Las distribuciones granulométricas de estos suelos puede observarse en la Figura B1. 2.

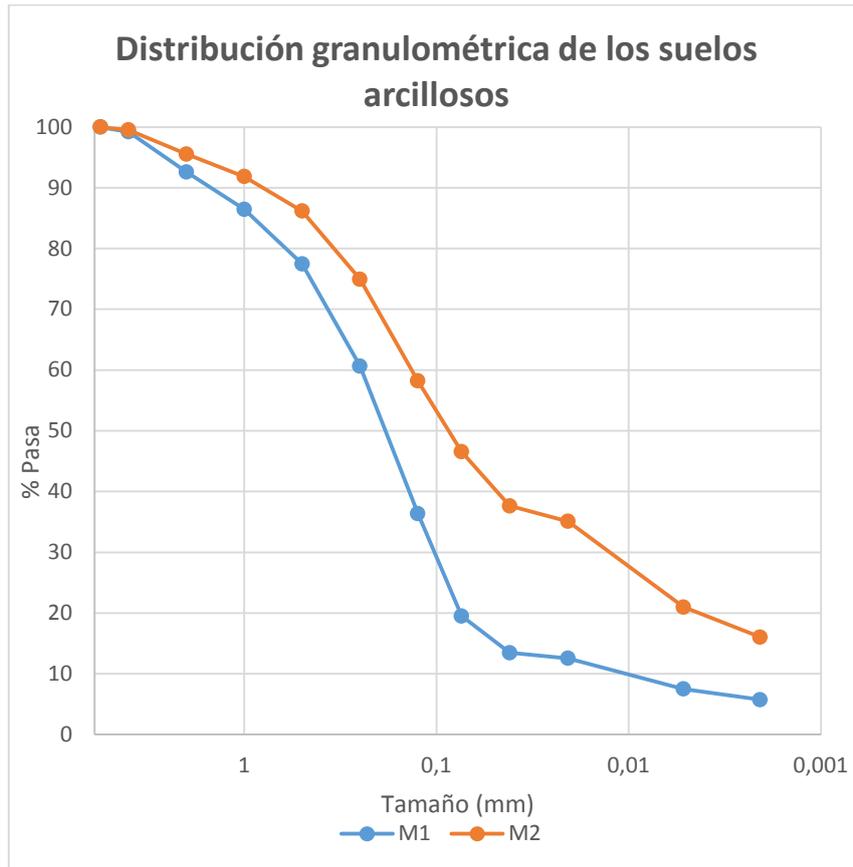


Figura B1. 2: Distribución granulométrica de los suelos arcillosos.

B.1.2.2. Materiales para preparar la solución de cementación.

Los materiales necesarios para preparar la solución de cementación están descritos en Anexo A, apartados A.2.1.: A.2.1.1. (Urea) y A.2.1.2. (Cloruro de calcio di-hidrato).

B.1.2.3. Materiales para preparar medio Bang.

Los materiales necesarios para preparar el medio Bang están descritos en Anexo A, apartados A.2.2.: A.2.2.1. (Tryptona); A.2.2.2. (Extracto de levadura); A.2.2.3. (Tricina); A.2.2.4. (Sulfato de amonio) y A.2.2.5. (Ácido l-glutámico).

B.1.2.4. Preparación de suspensión de *Sporosarcina pasteurii*.

El procedimiento de preparación de la suspensión de *Sporosarcina Pasteurii* está descrito en Anexo A, apartado A.3.1.1. (Preparación de suspensiones de *Sporosarcina pasteurii*).

B.1.3. Procedimiento experimental.

B.1.3.1. Procedimiento de preparación de las probetas de suelo cilíndricas.

Para realizar los ensayos de compresión uniaxial no confinados y los ensayos de hielo/deshielo, se prepararon las probetas en recipientes cilíndricos. Éstos se fabricaron a partir de un tubo circular de PVC con un $\phi_{ext} = 50\text{mm}$, $\phi_{int} = 45\text{mm}$ y 150mm de altura. El propósito de estas medidas fue aportar a la probeta resultante una altura que cumpliera el requisito mínimo de medir el doble del diámetro para así poder realizar el ensayo a

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

compresión. En función de la relación entre el diámetro y la altura se estableció, posteriormente y de acuerdo a la norma UNE-EN-12504-1 un factor de corrección de los resultados de compresión uniaxial no confinada simple, cuyos valores, asemejados a los usados en hormigón y mortero, quedan recogidos en la Figura B1. 3.

Relación Altura/Diámetro	2	1,75	1,5	1,25	1,1	1
Factor de corrección	1	0,98	0,96	0,94	0,90	0,80

Figura B1. 3: Tabla de las distintas relaciones entre la altura y el diámetro y el factor de corrección correspondiente.

En el caso de incumplir el requerimiento de esbeltez = 2 y que la altura fuera inferior al doble del diámetro, la fuerza que podría soportar sería superior, por lo que se debería aplicar un factor correctivo (<1). También se extrapola la tabla para probetas de esbeltez >2. Se interpoló entre los valores de la tabla en los casos posibles

Los moldes para las probetas cilíndricas se obtuvieron a partir de un tubo de 2000 mm de longitud, al que se realizaron los cortes de 150 mm con una sierra de cinta (Figura B1. 4) que permitió ajustar con gran precisión la perpendicularidad del corte.



Figura B1. 4: Sierra cinta.

Posteriormente, a esos tubos ya cortados, se les añadió una malla metálica de 75µm con una arandela de Ø50 mm en un extremo del tubo. La malla se colocó con objetivo de asegurar que las fracciones mayores del suelo quedaban retenidas mientras que los fluidos excedentes del tratamiento podían atravesar la barrera. El cometido de la arandela fue dar una mayor sujeción a la malla y conectividad con el molde, ya que en la arandela se puso cinta adhesiva uniendo la arandela y el tubo. Para incrementar la seguridad, se añadió más cinta adhesiva en

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

el tubo de modo que se reforzase la unión entre el tubo y la arandela. Una muestra de este tipo de molde listo para su uso se puede observar en la Figura B1. 5.



Figura B1. 5a: Malla metálica y arandela, utilizadas en el ensayo; B1. 4b: Recipiente preparado con suelo.

Una vez se tenía el recipiente listo, se procedía a rellenarlo con el tipo de suelo designado hasta 100mm respetando la geometría de la probeta. Finalmente, las probetas se ataban a un perfil de aluminio cuadrado mediante bridas. Se eligió un perfil cuadrado para aportar una mayor estabilidad. Las probetas estaban distribuidas de forma alterna en cada lado del perfil cuadrado para poder compensar la masa tal y como se muestra en la Figura B1. 6. La sujeción de los moldes a los perfiles era necesaria para elevarlos y permitir el correcto flujo de los líquidos excedentes durante el tratamiento.



Figura B1. 6: Posición de las varias probetas en el perfil cuadrado de aluminio.

B.1.3.2. Procedimiento de preparación de disoluciones.

B.1.3.2.1. Preparación de suspensiones de *Sporosarcina pasteurii*.

La suspensión de *Sporosarcina pasteurii* fue preparada por La Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Para la preparación de la suspensión bacteriana se requieren 4 días. Todo el

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

procedimiento de preparación de suspensiones de *Sporosarcina pasteurii* está descrito en el anexo A, apartado A.3.1.1. (Preparación de suspensiones de *Sporosarcina pasteurii*).

B.1.3.2.2. Preparación de la solución de cloruro cálcico y urea en el medio Bang.

En primer lugar se preparó el medio Bang. Al igual que en el ensayo realizado anteriormente, el medio Bang era 3 veces más concentrado que la concentración inicial. En el anexo A, apartado A.3.1.2. (Preparación de medio Bang, está descrito el proceso de preparación) se describe el proceso de preparación.

Posteriormente, se prepararon las concentraciones de cloruro de calcio y urea. Su preparación también está descrita en el anexo A, apartados A.3.1.3 (Preparación de la solución de urea) y A.3.1.4. (Preparación de la solución de cloruro de calcio). Estos compuestos se diluían en medio Bang para su aplicación.

A continuación se muestra el cálculo de la cantidad necesaria de la concentración madre de la urea, el cloruro cálcico y el medio Bang a usar. La solución fue diluida en agua destilada dentro de un matraz aforado de 1 L.

- Cantidad necesaria a extraer de la concentración madre de urea 250 g/L:

$$1000ml * \frac{20g}{1000ml} * \frac{1000ml}{250g} = 80 ml \quad (Ec. B1. 1)$$

- Cantidad necesaria a extraer de la concentración madre de cloruro de calcio 300 g/L:

$$1000ml * \frac{3.675g}{1000ml} * \frac{1000ml}{300g} = 12.25 ml \quad (Ec. B1. 2)$$

- Cantidad necesaria a extraer de la concentración madre de medio Bang:

$$1000ml * \frac{1g \text{ medio Bang}}{1000ml} * \frac{1000ml}{3g \text{ medio Bang}} = 333 ml \quad (Ec. B1. 3)$$

B.1.3.3. Determinación de la aportación máxima de líquido en una probeta.

El primer paso realizado, consistió en determinar la cantidad de agua que se podía aportar a cada tipo de suelo sin que llegase a fluir. Esto permitió extrapolar el volumen máximo de líquido que se podía aportar a la probeta.

Conocer este volumen fue importante debido a que, si se añadía más fluido del necesario, éste saldría por el fondo de la probeta y se desperdiciaría o incluso podría arrastrar las bacterias fuera de la probeta.

El proceso para determinar inicialmente la cantidad de líquido máxima que podían absorber las probetas consistió en realizar probetas cilíndricas con cada tipo de suelo. A continuación se determinó empíricamente, a partir de la masa, la cantidad de agua que se podía añadir a la probeta hasta que el fluido salía por la parte inferior. Los valores obtenidos en esta determinación quedan recogidos en la Tabla B1 1.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

TIPO	CANTIDAD DE AGUA CORRIENTE [g]
M1	54,3
M2	56,6
CS	43,7
SS	54

Tabla B1 1: Tabla con las cantidades máximas de agua que se pueden añadir a la probeta cilíndrica seca.

Una vez determinada la cantidad de agua que se podía añadir a la probeta inicialmente, se estimó la cantidad necesaria después de la primera adición y a lo largo del tiempo mediante ensayos de adición de agua en probetas húmedas del mismo volumen. Los valores obtenidos se muestran en Tabla B1 2.

Día	Tipo suelo	Cantidad máxima de agua corriente [g]	
		10h	16h
1	M1	11,9	0,9
	M2	37,1	3,0
	CS	15,1	2,6
	SS	11,6	2,0
2	M1	2,0	2,8
	M2	3,0	3,2
	CS	5,6	4
	SS	1,9	5,8
3	M1	3,9	2,1
	M2	3,9	3,4
	CS	2,6	6,1
	SS	1,6	3,8

Tabla B1 2: Cantidad de agua a añadir en probetas cilíndricas húmedas para cada tipo de suelo hasta su escorrentía.

B.1.3.4. Determinación del cultivo.

Una vez averiguada la cantidad de agua que requería cada tipo de suelo, se determinó el volumen de líquido que sería utilizado para el tratamiento de cada tipo de suelo.

La suspensión bacteriana fue entregada en dos envases de 480 mL y un envase con 40 mL de medio Bang para limpiar los dos primeros envases (Anexo A, figura A1 13), constituyendo un total de 1L.

Primero se depositaron los dos envases de solución bacteriana dentro de un matraz aforado. Posteriormente, se enjuagaron los envases con el medio Bang y se depositaron en el mismo matraz. El motivo de utilizar un matraz fue para poder verter la solución bacteriana dentro de un recipiente que podía ser cerrado para evitar una posible contaminación. Otra razón fue que

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

la solución bacteriana tenía un olor fuerte, que hacía necesario utilizar un recipiente cerrado. Una vez se tenía toda la solución bacteriana dentro del mismo recipiente se realizaba una aplicación directa a las probetas o se diluían según qué tratamiento se iba a realizar. Los tratamientos realizados están descritos en el siguiente apartado (B1.3.5).

Pasadas 4h de la inoculación de las bacterias se realizó una aportación de medio Bang de 4 ml en cada molde cilíndrico para favorecer el crecimiento y estabilización de los microorganismos.

Pasadas 24h de la primera inoculación, se inició el tratamiento con riegos enriquecidos. Éstos también se realizaron añadiendo la cantidad determinada en la Tabla B1 2 de disolución de urea (20g/L) y cloruro de calcio (3,675g/L) en medio Bang.

B.1.3.5. Determinación de la influencia de los riegos enriquecidos en la resistencia a compresión uniaxial no confinada.

El objetivo de estos ensayos fue estudiar los siguientes 7 parámetros:

- Influencia de la presencia de bacterias en los diferentes tipos de suelo.
- Influencia de la concentración bacteriana sin tratamiento posterior.
- Influencia de una segunda inoculación de bacterias.
- Influencia de realizar o no el tratamiento para una misma concentración bacteriana.
- Influencia de la concentración bacteriana con el mismo procedimiento de curado.
- Influencia de la concentración de calcio.
- Determinar la influencia de los ciclos hielo/deshielo.

Determinar estos parámetros permitiría prolongar el proceso de bioestabilización de suelos y de esta manera optimizaría la efectividad de la componente bacteriana. Para determinar los 6 parámetros descritos anteriormente, se llevaron a cabo 13 pruebas diferentes. Las pruebas se pueden observar en la Tabla B1 3.

Test	Concentración de bacterias [cfu/ml]	Medio Bang	Concentración de urea [mmol/L]	Concentración de iones de calcio [mmol/L]	Periodo entre tratamientos por día [h]
1	-	-	-	-	-
2	-	+	333	25	2
3	$1 \cdot 10^7$	-	-	-	-
4	$1 \cdot 10^7$	+	333	25	-
5	$1 \cdot 10^7$	+	333	25	2
6	$1 \cdot 10^9$	-	-	-	-
7	$1 \cdot 10^9$	+	333	25	-
8	$1 \cdot 10^9$	+	333	25	2
9	$1 \cdot 10^9$	+	333	25	4
10	$1 \cdot 10^9$ +2 ^{da} adición	+	333	25	2
11	-	-	-	-	-
12	$1 \cdot 10^7$	+	333	25	2
13	$1 \cdot 10^9$	+	333	250	2

Tabla B1 3: Pruebas realizadas para determinar la influencia de los riegos enriquecidos.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

En la Tabla B1 3 la alta concentración de bacterias era de entre $1 \cdot 10^8$ cfu/ml y $1 \cdot 10^9$ cfu/ml. La baja concentración de bacterias, entre $1 \cdot 10^6$ cfu/ml y $1 \cdot 10^7$ cfu/ml. En test Nº10 se utilizó una segunda inoculación de bacterias de 4 ml, pasadas 24 horas y con la misma concentración ($1 \cdot 10^8$ cfu/ml - $1 \cdot 10^9$ cfu/ml). La concentración del medio Bang que se utilizó está descrita en el siguiente punto inferior. La urea y el calcio se diluían en el medio Bang. Se decidió que la concentración fuera fija durante todo el ensayo. Solamente, en test Nº13 se añadió una alta concentración de calcio con el objetivo de poder comparar. El ritmo de los tratamientos se realizaba durante 5 días, de 10h a 18h a cada 2 o 4 horas (dependiendo del periodo de tiempo entre tratamientos).

Para realizar el contraste entre pruebas, se ensayaría la resistencia a compresión uniaxial no confinada que pudiera resistir cada probeta en los diferentes escenarios y posteriormente se analizarían las diferencias entre ellas. El contraste que se realizó entre las diferentes pruebas para determinar la influencia de los factores se muestra en la Tabla B1 4.

Test	Información de la influencia
[1,2 – Todos]	Influencia de la presencia de bacterias en los tipos de suelo.
[6 – 3]	Influencia de la concentración bacteriana sin tratamiento posterior.
[8 – 10]	Influencia de una segunda inoculación de bacterias.
[8 – 9]	Influencia del período entre tratamientos para una misma concentración bacteriana.
[5 – 8]	Influencia de la concentración bacteriana con el mismo procedimiento de curado.
[8 – 12,13]	Influencia de la concentración de calcio.

Tabla B1 4: Tabla de las comparaciones entre pruebas.

Las últimas 3 pruebas (11ª, 12ª y 13ª) se realizaron con el ciclo hielo – deshielo. Este ciclo pretendía analizar la resistencia de los suelos y el efecto de la adición de bacterias introduciendo las probetas secas en un congelador durante un día y posteriormente, dejándolas descongelar durante 2 días.

B.1.3.6. Proceso para desmoldar las probetas.

Con el objetivo de acelerar el proceso de secado, las probetas se desmoldaron 2 días después de finalizar los tratamientos correspondientes, cuando el suelo todavía estaba húmedo. Debido a la falta de cohesión del suelo en condiciones húmedas, este proceso fue el más crítico porque la probeta podía romperse en el momento de desmoldar. No obstante, realizarlo en estas edades fue el método más fiable para desmoldar en serie varias probetas evitando su adherencia al molde.

El proceso consistía en retirar la cinta adhesiva de la parte inferior del recipiente sacando la malla y la arandela. Posteriormente, se introducía con precaución dentro del tubo por su parte inferior una barra maciza de un diámetro ligeramente inferior al diámetro interior del recipiente. La barra debía estar verticalmente apoyada encima de una superficie estable. Una

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

vez se tenía estabilizada la barra, se ponía la probeta encima y se ejercía presión en la pared del cilindro mediante elementos auxiliares, tirando el cilindro hacia abajo. Llegados a este punto, la velocidad de ejecución debía ser constante y lenta, ya que si se hacía demasiado rápido el suelo podía desmoronarse. En la Figura B1. 7 se muestra una probeta justo después de su desmolde.



Figura B1. 7: Proceso de desmoldar la probeta.

Una vez extraída la probeta del cilindro, se depositaba la probeta en un útil que permitía la manipulación minimizando el riesgo de rotura. Este artificio consistía en una sección del mismo tubo dividido verticalmente en dos partes iguales tal y como se muestra en la Figura B1. 8.



Figura B1. 8: Cilindro cortado verticalmente utilizado para desmoldar.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

Para realizar el procedimiento con seguridad, era necesario humedecer ligeramente el útil en agua antes de acoplarle la probeta. Posteriormente, se inclinaba la probeta dejando caer toda la masa encima del útil. Finalmente, cada probeta se depositaba en una base donde se dejaba secar 2 semanas para garantizar su completo secado.

Las muestras desmoldadas se pueden observar en la Figura B1. 9.



Figura B1. 9: Muestras desmoldadas.

B.1.3.7. Ciclo hielo-deshielo.

Una vez finalizadas las dos semanas del proceso de secado, se prepararon las probetas seleccionadas para el ciclo hielo-deshielo. Antes de introducirlas dentro del congelador se envolvieron en film transparente, con el objetivo de evitar su rotura (Figura B1. 10).



Figura B1. 10: Muestras envueltas en film transparente antes de estar colocadas en el congelador.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

Después de colocar las probetas en el congelador, la humedad que hay en la probeta se transforma en hielo aumentando su volumen, lo que puede producir un deterioro interno de la probeta.

Finalmente, se dejaron descongelar las probetas durante 2 días y se realizó el ensayo de compresión axial no confinada.

B.1.3.8. Metodología de los ensayos a compresión axial no confinada.

Una vez las probetas estuvieron completamente secas se procedió a realizar el ensayo de compresión. Estos ensayos, se realizaron en una prensa electromecánica capaz de medir la fuerza de tensión o compresión generada por un desplazamiento impuesto sobre una probeta.

El rango de medida de este equipo estaba preparado para medir fuerzas hasta 50 kN. Como las fuerzas máximas que se iban a medir fueron mucho más pequeñas (del orden de 200N) y para poder aportar una mayor exactitud en las distintas mediciones, se acopló al cabezal superior del equipo una célula de carga, que permitió realizar medidas con mayor exactitud en el rango entre 0 y 200N.

Esta célula de carga, estaba conectada mediante un sistema de adquisición de datos a un ordenador donde se registraba de forma continua la fuerza aplicada. En el caso de que la fuerza que resistía la probeta fuera superior a 200N, se podía cambiar la célula por una de 10 kN de rango. La instalación del sistema de adquisición tiene el aspecto que se muestra en la Figura B1. 11.



Figura B1. 11: Instalación donde se realizaron los ensayos.

Para realizar el ensayo, en primer lugar, era necesario que las dos caras planas estuvieran paralelas entre la base y el cabezal superior de la máquina de compresión. El motivo de esto, era asegurar que la probeta recibía una fuerza de compresión completamente axial. Para ello se mecanizaban (pulido) las probetas hasta conseguir el paralelismo deseado.

Posteriormente, se debía medir el diámetro inferior, el diámetro superior y la altura de la probeta. Estas medidas fueron realizadas con un pie de rey electrónico, aportando una gran precisión.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

Por último se introducía la probeta dentro del equipo de ensayo y se acercaba manualmente el cabezal del equipo a la probeta hasta que el espacio entre ellos fuera mínimo. Una vez realizado, se iniciaba el ensayo con una velocidad de 1mm/min. Finalmente, se detenía el ensayo cuando en la célula de carga se observaba que la fuerza a compresión empezaba a decrecer constantemente. En la Figura B1. 12 se muestra la realización del proceso.



Figura B1. 12a: La probeta introducida dentro del equipo; B1. 12b: La probeta durante el ensayo.

B.1.4. Cálculo de los resultados obtenidos.

Una vez obtenidos los resultados experimentales, se procedió a los cálculos de resistencia.

- Se calculó la media de los diámetros y la relación entre alturas y diámetro medio. Una vez obtenido este último valor, se debía elegir el factor de corrección correspondiente en la Figura B1. 3. En el caso que la relación entre altura y diámetro estuviera comprendida entre valores, se interpolaba.
- Una vez conocido el factor de corrección, se calculó la superficie circular que tenía la probeta. Esto se calculó a partir del diámetro medio entre el inferior y superior, cuya expresión sería la siguiente:

$$A = \frac{\pi d^2_{\text{medio}}}{4} \quad (\text{Ec. B1. 4})$$

- También se calculó el esfuerzo de compresión que podía soportar la probeta, dividiendo la fuerza aplicada entre la superficie circular del apartado anterior:

$$\sigma_{\text{compresión}} = \frac{F}{A} \quad (\text{Ec. B1. 5})$$

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

- Se calculó asimismo el esfuerzo de compresión corregido, multiplicando el esfuerzo de compresión por el factor de corrección. Finalmente, con éste valor se pudo establecer una comparación entre las diferentes probetas, ya que en estos ensayos, la geometría tenía una influencia importante. Los valores para los diferentes tipos de suelo se recogen en las Tablas siguientes:

Arena fina (SS):

<i>Test</i>	<i>Ø inferior (mm)</i>	<i>Ø superior (mm)</i>	<i>Ø medio (mm)</i>	<i>Altura (mm)</i>	<i>Relación Altura/ Ø</i>	<i>Factor de corrección</i>	<i>Fuerza de compresión (N)</i>	<i>Tensión de compresión (kPa)</i>	<i>Tensión de compresión corregido (kPa)</i>
1.1	43,22	43,86	43,54	86,00	1,97	0,998	16,7	11,2	11,2
1.2	43,90	42,21	43,06	82,05	1,90	0,992	17,8	12,2	12,1
2.1	44,35	42,70	43,53	90,51	2,07	1,006	75,4	50,7	51,0
2.2	43,50	42,45	42,98	98,27	2,28	1,023	74,0	51,0	52,2
3.1	42,84	43,84	43,34	96,27	2,22	1,018	55,6	37,7	38,4
3.2	43,02	43,44	43,23	96,21	2,22	1,018	118,1	80,5	81,9
4.1	43,81	42,86	43,34	91,04	2,10	1,008	9,6	6,5	6,5
4.2	43,04	43,01	43,03	90,00	2,09	1,007	12,3	8,5	8,6
5.1	43,82	43,09	43,46	92,12	2,12	1,010	75,6	51,0	51,5
5.2	42,70	43,72	43,21	90,36	2,09	1,007	46,0	31,4	31,7
6.1	43,31	43,16	43,24	95,05	2,19	1,016	107,0	72,9	74,0
6.2	43,39	43,23	43,31	95,42	2,20	1,016	69,6	47,2	48,0
7.1	43,65	43,88	43,77	97,79	2,23	1,019	44,9	29,8	30,4
7.2	42,90	42,53	42,72	97,16	2,27	1,022	76,6	53,4	54,6
8.1	43,62	43,27	43,45	90,73	2,08	1,007	63,8	43,1	43,4
8.2	45,16	42,92	44,04	88,24	2,00	1,000	126,3	82,9	82,9
9.1	43,33	42,96	43,15	98,06	2,27	1,022	76,0	52,0	53,1
9.2	43,29	44,80	44,05	90,62	2,05	1,005	56,9	37,4	37,5
10.1	43,52	42,85	43,19	96,17	2,22	1,018	115,7	79,0	80,4
10.2	44,14	42,94	43,54	89,88	2,06	1,005	188,4	126,5	127,2

Tabla B1 5: Resultados obtenidos en arena fina, SS.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

Arena gruesa (CS):

<i>Test</i>	<i>Ø inferior (mm)</i>	<i>Ø superior (mm)</i>	<i>Ø medio (mm)</i>	<i>Altura (mm)</i>	<i>Relación Altura/ Ø</i>	<i>Factor de corrección</i>	<i>Fuerza de compresión (N)</i>	<i>Tensión de compresión (kPa)</i>	<i>Tensión de compresión corregido (kPa)</i>
1.1	42,44	42,44	42,44	96,00	2,26	1,021	54,1	7,5	7,6
1.2	43,08	41,81	42,45	74,19	1,74	0,980	63,0	14,6	14,3
2.1	44,72	43,23	43,98	92,44	2,10	1,008	172,0	25,6	25,8
2.2	44,79	42,33	43,56	97,36	2,23	1,019	163,0	21,9	22,3
3.1	42,00	42,00	42,00	100,05	2,38	1,031	32,0	4,1	4,2
3.2	43,05	42,61	42,83	89,27	2,08	1,007	51,7	8,3	8,3
4.1	43,38	42,48	42,93	95,43	2,22	1,018	16,4	2,3	2,3
4.2	42,92	42,27	42,60	49,12	1,15	0,932	14,3	7,6	7,0
5.1	43,53	43,05	43,29	97,10	2,24	1,019	151,0	20,4	20,8
5.2	46,06	43,08	44,57	86,73	1,94	0,996	75,1	12,7	12,7
6.1	44,44	42,91	43,68	102,07	2,33	1,027	38,2	25,5	26,2
6.2	42,88	42,70	42,79	91,05	2,12	1,010	132,3	92,0	93,0
7.1	43,64	43,09	43,37	101,78	2,34	1,028	97,6	12,0	12,3
7.2	43,40	42,72	43,06	95,30	2,21	1,017	89,8	12,6	12,8
8.1	44,44	43,03	44,74	92,49	2,11	1,009	119,2	17,7	17,9
8.2	45,28	43,21	44,25	90,40	2,04	1,003	131,9	20,6	20,6
9.1	45,17	42,52	43,85	92,30	2,10	1,008	195,0	29,1	29,4
9.2	43,17	42,46	42,82	93,96	2,19	1,016	147,0	21,2	21,5
10.1	44,18	43,03	43,06	97,38	2,23	1,019	215,6	29,0	29,5
10.2	43,95	42,66	43,31	95,17	2,19	1,016	61,0	8,6	8,7

Tabla B1 6: Resultados obtenidos en arena gruesa, CS.

Mezcla 1 (M1):

<i>Test</i>	<i>Ø inferior (mm)</i>	<i>Ø superior (mm)</i>	<i>Ø medio (mm)</i>	<i>Altura (mm)</i>	<i>Relación Altura/ Ø</i>	<i>Factor de corrección</i>	<i>Fuerza de compresión (N)</i>	<i>Tensión de compresión (kPa)</i>	<i>Tensión de compresión corregido (kPa)</i>
1.1	46,00	43,00	44,50	79,00	1,77	0,982	41,6	26,8	26,3
1.2	43,01	43,28	43,15	91,00	2,10	1,009	32,9	22,5	22,7
2.1	44,68	42,98	43,83	100,16	2,28	1,023	53,6	35,5	36,3
2.2	44,04	43,16	43,60	95,98	2,20	1,016	44,0	29,5	29,9
3.1	43,62	42,69	43,16	91,00	2,10	1,009	21,1	14,4	14,5
3.2	44,06	43,79	43,93	98,00	2,23	1,018	32,9	21,7	22,1
4.1	42,52	42,50	42,51	61,00	1,43	0,955	11,4	8,0	7,6
4.2	43,33	42,58	42,96	90,00	2,09	1,008	18,1	12,5	12,6
5.1	43,30	43,38	43,34	99,47	2,29	1,024	110,4	74,9	76,6
5.2	42,52	43,74	43,13	95,95	2,22	1,018	106,4	72,9	74,2
6.1	43,20	42,92	43,06	90,00	2,09	1,007	102,6	70,4	70,9
6.2	43,43	43,39	43,41	86,00	1,98	0,998	109,2	73,8	73,6
7.1	43,18	43,08	43,13	98,00	2,27	1,022	24,0	16,4	16,8
7.2	43,00	43,44	43,22	92,00	2,12	1,010	34,7	23,6	23,9
8.1	43,39	43,21	43,30	100,21	2,31	1,025	83,1	56,5	57,9
8.2	42,73	44,02	43,38	96,04	2,21	1,017	65,4	44,3	45,1
9.1	44,31	42,90	43,61	104,71	2,40	1,032	89,1	59,7	61,6
9.2	43,20	42,92	43,06	101,87	2,36	1,029	134,1	92,1	94,8
10.1	42,85	43,27	43,06	97,68	2,26	1,021	55,3	38,0	38,8
10.2	42,98	42,41	42,70	93,92	2,20	1,016	253,2	176,9	179,7

Tabla B1 7: Resultados obtenidos en mezcla 1, M1.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

Mezcla 2 (M2):

<i>Test</i>	<i>Ø inferior (mm)</i>	<i>Ø superior (mm)</i>	<i>Ø medio (mm)</i>	<i>Altura (mm)</i>	<i>Relación Altura/ Ø</i>	<i>Factor de corrección</i>	<i>Fuerza de compresión (N)</i>	<i>Tensión de compresión (kPa)</i>	<i>Tensión de compresión corregido (kPa)</i>
1.1	43,00	42,37	42,69	88,76	2,07	1,006	63,2	10,2	10,3
1.2	42,51	41,60	42,06	93,00	2,21	1,017	57,4	8,4	8,6
2.1	43,76	42,82	43,29	59,38	1,37	0,950	53,3	36,2	34,4
2.2	44,32	42,72	43,52	96,93	2,22	1,018	66,7	44,9	45,7
3.1	42,92	42,76	42,84	60,00	1,40	0,952	50,4	17,8	17,0
3.2	43,14	42,91	43,03	91,00	2,11	1,009	46,6	7,2	7,2
4.1	42,22	42,13	42,18	83,00	1,96	0,997	53,3	9,8	9,8
4.2	42,62	42,48	42,55	81,00	1,90	0,992	63,2	12,3	12,2
5.1	42,70	43,36	43,03	96,71	2,24	1,020	82,9	57,0	58,1
5.2	42,40	43,12	42,76	93,67	2,19	1,015	40,6	28,3	28,7
6.1	43,20	42,92	43,06	90,00	2,09	1,007	66,6	10,5	10,6
6.2	43,43	43,39	43,41	86,00	1,98	0,998	106,0	18,2	18,2
7.1	43,31	42,50	42,91	89,00	2,07	1,006	45,0	7,2	7,3
7.2	42,54	42,34	42,44	56,00	1,32	0,946	32,5	13,2	12,5
8.2	43,63	42,67	43,15	89,18	2,06	1,005	95,0	65,0	65,4
9.1	44,10	42,58	42,84	99,05	2,31	1,025	104,3	72,4	74,2
9.2	43,16	42,29	43,73	99,42	2,32	1,026	57,0	39,8	40,8
10.1	42,81	42,60	42,71	92,46	2,16	1,013	111,5	77,9	78,9
10.2	42,57	42,05	42,31	95,50	2,25	1,021	88,8	63,2	64,5

Tabla B1 8: Resultados obtenidos en mezcla 2, M2.

Ciclo hielo-deshielo

Arena fina (SS):

Test	Ø inferior (mm)	Ø superior (mm)	Ø medio (mm)	Altura (mm)	Relación Altura/ Ø	Factor de corrección	Fuerza de compresión (N)	Tensión de compresión (kPa)	Tensión de compresión corregido (kPa)
11.1	-	-	-	-	-	-	-	-	rota
11.2	-	-	-	-	-	-	-	-	rota
12.1	43.55	43.16	43.35	92.65	2.13	1.011	119,4	80,9	81,8
12.2	43.66	43.23	43.44	91.55	2.10	1.009	110,9	74,8	75,5
13.1	43.48	43.05	43.26	93.95	2.17	1.014	118,1	80,4	81,5
13.2	-	-	-	-	-	-	-	-	rota

Tabla B1 9: Resultados obtenidos de las probetas SS sometidas al ciclo hielo-deshielo.

Arena gruesa (CS):

Test	Ø inferior (mm)	Ø superior (mm)	Ø medio (mm)	Altura (mm)	Relación Altura/ Ø	Factor de corrección	Fuerza de compresión (N)	Tensión de compresión (kPa)	Tensión de compresión corregido (kPa)
11.1	-	-	-	-	-	-	-	-	rota
11.2	-	-	-	-	-	-	-	-	rota
12.1	-	-	-	-	-	-	-	-	rota
12.2	42.48	42.45	42.47	34.34	0.80	0.800	73,2	51,7	41,3
13.1	43.01	44.32	43.67	98.36	2.25	1.020	160,8	107,4	109,5
13.2	-	-	-	-	-	-	-	-	rota

Tabla B1 10: Resultados obtenidos de las probetas CS sometidas al ciclo hielo-deshielo.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

Mezcla 1 (M1):

Test	Ø inferior (mm)	Ø superior (mm)	Ø medio (mm)	Altura (mm)	Relación Altura/ Ø	Factor de corrección	Fuerza de compresión (N)	Tensión de compresión (kPa)	Tensión de compresión corregido (kPa)
11.1	42,55	41,77	42,16	78,83	1,87	0,990	51,1	36,6	36,2
11.2	43,91	42,10	43,01	86,95	2,02	1,002	13,2	9,1	9,1
12.1	42,96	42,72	42,84	101,38	2,36	1,029	115,5	80,1	82,5
12.2	42,78	42,53	42,66	93,68	2,19	1,016	135,6	94,9	96,4
13.1	43,27	42,49	42,88	93,72	2,18	1,015	85,8	59,4	60,3
13.2	43,36	43,13	43,25	95,53	2,20	1,017	119,3	81,2	82,6

Tabla B1 11: Resultados obtenidos de las probetas M1 sometidas al ciclo hielo-deshielo.

Mezcla 2 (M2):

Test	Ø inferior (mm)	Ø superior (mm)	Ø medio (mm)	Altura (mm)	Relación Altura/ Ø	Factor de corrección	Fuerza de compresión (N)	Tensión de compresión (kPa)	Tensión de compresión corregido (kPa)
11.1	42,87	42,70	42,79	98,80	2,30	1,025	119,7	83,2	85,3
11.2	42,61	42,54	42,58	91,79	2,15	1,012	78,6	55,2	55,9
12.1	42,83	42,02	42,43	97,19	2,29	1,023	146,9	103,9	106,3
12.2	42,41	42,31	42,36	95,67	2,25	1,021	152,6	108,3	110,5
13.1	43,80	42,54	43,17	95,60	2,21	1,017	157,1	107,3	109,2
13.2	42,41	43,65	43,03	90,97	2,11	1,009	131,1	90,1	90,9

Tabla B1 12: Resultados obtenidos de las probetas M2 sometidas al ciclo hielo-deshielo.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

B.1.4.1. Comparativa y tabla resumen.

La comparativa de la influencia de las adiciones de bacterias y calcio sobre la durabilidad frente a ciclos de hielo y deshielo en probetas de suelo tipo M1 y M2 puede observarse en la Tabla B1 13.

Suelo	Baja concentración de bacterias/calcio	Alta concentración de bacterias/calcio
M1	294.9	215.5
M2	53.5	41.7

Tabla B1 13: Influencia de las adiciones bacterianas (variación en % respecto las probetas de control) sobre la capacidad resistente a compresión después de un ciclo de hielo/deshielo.

En base a los resultados obtenidos, se resume el tratamiento óptimo para cada tipo de suelo (Tabla B1 14) remarcando (en negrita) aquel parámetro que muestra una mayor influencia:

<i>Suelo</i>	<i>Concentración de bacterias</i>	<i>Ritmo de tratamiento</i>	<i>Concentración de calcio</i>	<i>Segunda inoculación de bacterias</i>
SS	Alta	Rápido	Baja	Beneficioso
CS	Alta	Lento	Alta	Indiferente
M1	Baja	Lento	Alta	Indiferente
M2	Alta	Rápido	Indiferente	Beneficioso

Tabla B1 14: Procedimiento de curado óptimo para cada tipo de suelo.

B.2. MICP en probeta cilíndrica compactada.

B.2.1. Introducción.

Los objetivos de este ensayo fueron analizar cómo el proceso de compactación influía en la capacidad resistente de los suelos bioconsolidados y estudiar en qué momento resultaba óptimo realizar la compactación: antes o después de los riegos enriquecidos que constituyen el tratamiento de curado. En cualquier caso, siempre se compactaría después de haber mezclado el suelo con la suspensión bacteriana correspondiente para permitir su penetración.

Para ello se realizaron unos ensayos previos para la determinación de la humedad óptima de compactación de los suelos sin bioestabilizar. Esta humedad sería la preferible en el momento de emprender cualquier proceso de compactación, también para los suelos bioestabilizados.

Posteriormente se realizaron ensayos sobre suelos bioestabilizados siguiendo un único procedimiento de curado por suelo, incorporando el proceso de compactación antes o después de los riegos, y realizando ensayos de compresión uniaxial no confinada sobre las probetas resultantes.

B.2.2. Materiales.

En este ensayo se utilizaron los mismos materiales que en el ensayo anterior: anexo B, apartado B1.2. (Materiales).

B.2.3. Procedimiento experimental.

B.2.3.1. Ensayos previos. Determinación de la humedad óptima de compactación.

Estos ensayos siguen las directrices del ensayo Proctor Modificado norma UNE 103-501-94, que se basa en determinar la densidad seca de un suelo compactado siempre con la misma energía (2,632 J/cm³) pero con diferentes grados de humedad a fin de obtener la humedad óptima de compactación para cada tipo de suelo.

Para cada tipo de suelo, el ensayo consistió en los siguientes pasos:

1. Se prepararon 5 muestras de 400 g de suelo a compactar de forma que llenara el molde donde se procedería a la compactación.
2. Las 5 muestras fueron humedecidas (con variaciones de $\pm 2\%$ a $\pm 3\%$) con agua corriente hasta que quedó íntima y uniformemente distribuida en la mezcla.
3. Se retiraron 150 g de la muestra humectada, se pesaron y secaron a 105°C durante 24h. Pasadas las 24h, la porción extraída se pesó nuevamente para poder determinar la humedad real del suelo en el momento de su compactación. Esta humedad se calculó mediante la expresión:

$$W_0 = \frac{P_{\text{inicial de agua}}}{P_{\text{suelo seco}}} \cdot 100 = \frac{P_{\text{inicial de suelo}} - P_{\text{suelo seco}}}{P_{\text{suelo seco}}} \cdot 100 \quad (\text{Ec. B2. 1})$$

Donde:

W_0 = humedad real del suelo.

P = masa.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

4. Compactación de las muestras realizando un total de 3 capas y recibiendo 11 impactos con una masa de 752.1 g liberada desde una altura de 30 cm. Estos valores se calcularon a partir de la siguiente ecuación:

$$E_c = \frac{N \cdot n \cdot W \cdot h}{V}, \text{kgf} - \text{cm/cm}^3 \quad (\text{Ec. B2. 2})$$

Donde:

E_c = energía de compactación.

N = número de golpes del pisón compactador por capa.

n = número de capas que se disponen hasta llenar el molde.

W = masa del pisón compactador (kgf).

H = altura de caída del pisón compactador (cm).

V = volumen del molde de compactación (cm^3).

En la Figura B2. 1 se puede observar el mecanismo utilizado para la compactación de las muestras en el ensayo Proctor Modificado:



Figura B2. 1: El mecanismo utilizado para compactar las probetas en el ensayo Proctor Modificado.

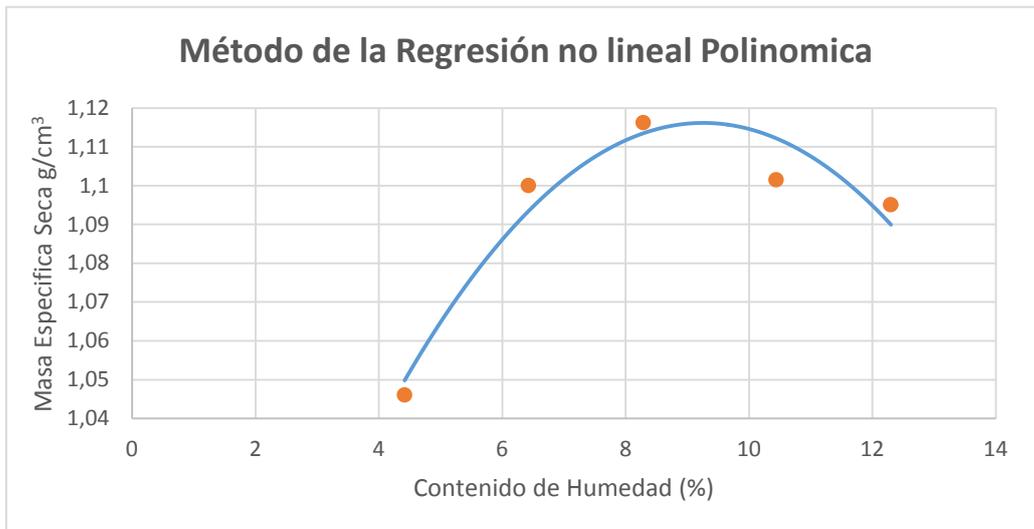
5. Enrasado de las muestras y determinación de su masa y volumen una vez compactadas para obtener la densidad húmeda del suelo compactado.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

6. Cálculo de la densidad seca del suelo compactado a partir de la humedad real del suelo (*Ec. B2. 1*) y la densidad húmeda del suelo compactado.
7. Ajuste del polinomio que relaciona densidad seca y humedad del suelo en el momento de compactación alrededor de su máximo y búsqueda de la humedad óptima.

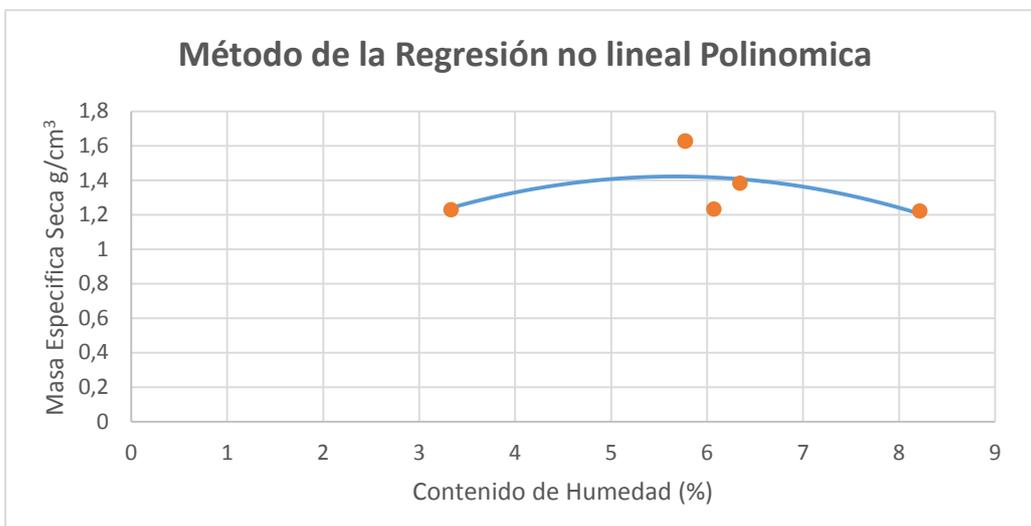
A continuación, se muestran los valores de ensayo y los resultados orientados a determinar la humedad óptima de compactación para cada tipo de suelo:

Arena fina (SS):



RESULTADO:	
CONTENIDO DE HUMEDAD ÓPTIMO (%):	9,26%
MASA ESPECÍFICA SECA MÁXIMA (kN/m³):	1,12 g/cm³

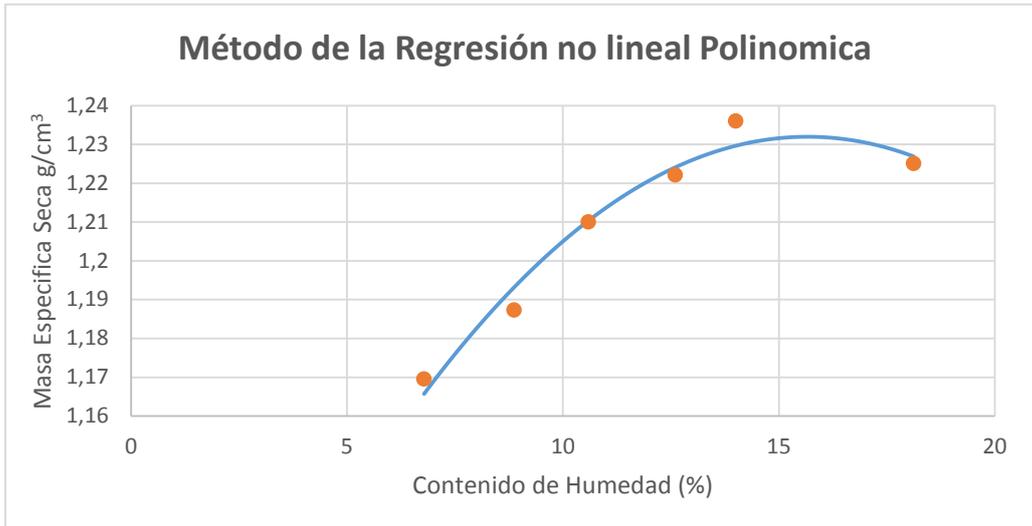
Arena gruesa (CS):



Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

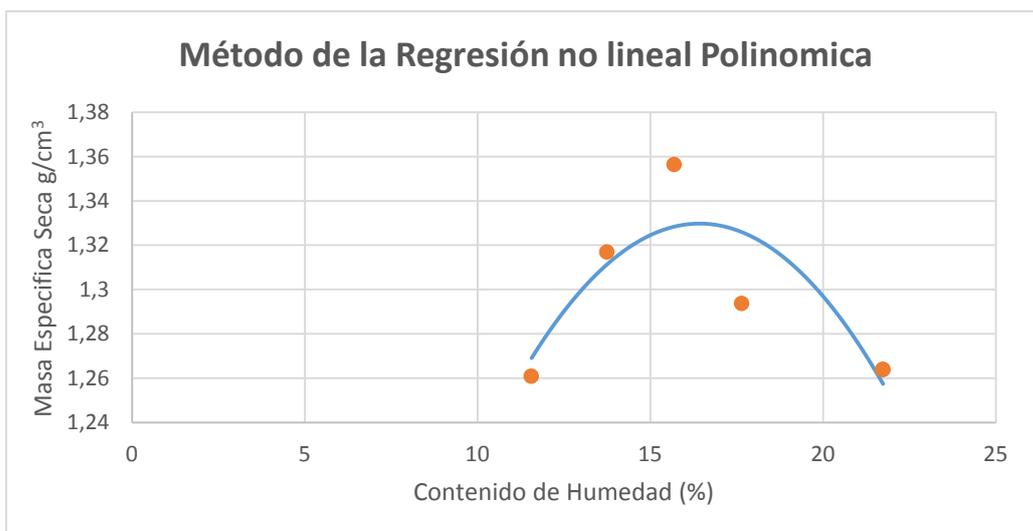
RESULTADO:	
CONTENIDO DE HUMEDAD ÓPTIMO (%):	5,67%
MASA ESPECÍFICA SECA MÁXIMA (kN/m ³):	1,42 g/cm ³

Mezcla 1 (M1):



RESULTADO:	
CONTENIDO DE HUMEDAD ÓPTIMO (%):	15,66%
MASA ESPECÍFICA SECA MÁXIMA (kN/m ³):	1,23 g/cm ³

Mezcla 2 (M2):



Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

RESULTADO:	
CONTENIDO DE HUMEDAD ÓPTIMO (%):	16,42%
MASA ESPECÍFICA SECA MÁXIMA (kN/m ³):	1,33 g/cm ³

B.2.3.2. Metodología y producción de las probetas.

Al igual que el ensayo anterior, en este también se utilizaron probetas en forma de cilindro. El suelo se recolectó y guardó en condiciones de laboratorio durante una semana, con el objetivo de tener el mismo grado de humedad durante los ensayos. Para cada tipo de suelo (SS, CS, M1 y M2) se fabricaron tres tipos de probetas:

- *Probetas de control compactadas:* Durante la compactación se realizó un único riego con agua destilada (C_XX_-Y).
- *Probetas compactadas antes de iniciar los riegos enriquecidos:* Los riegos de estas probetas se realizaron de dos maneras: Con urea y cloruro de calcio diluidos en agua destilada (B_XX_AD_Y) y con los mismos ingredientes diluidos en medio Bang (B_XX_MB_Y).
- *Probetas compactadas después de realizar los riegos enriquecidos:* Los riegos de las probetas compactadas después del tratamiento biológico también se realizaron con urea y cloruro de calcio diluidos en agua (A_XX_AD_Y) o en medio Bang (A_XX_MB_Y).

Aclaración: A/B/C_XX_Y/AD/MB_-/Y

A/B/C: A = Después. B = Antes. C = Control.

XX: Tipo de suelo (SS, CS, M1 o M2).

-/AD/MB: - = agua corriente. AD = agua destilada. MB = Medio Bang.

Y = Número de probetas (1, 2 o 3).

En el caso de las probetas compactadas después de realizar los riegos enriquecidos, antes de la inoculación de bacterias se realizó una probeta adicional para determinar la humedad en el momento de la compactación. Esto no fue necesario para las probetas de control o compactadas en inicio porque se podía retirar una muestra del suelo humectado antes de compactarlo ya que no se realizó ningún riego adicional anterior a la compactación.

Además, para las probetas compactadas, después de realizar los riegos enriquecidos, se realizó un control de la evolución de la masa de la probeta con el objetivo de que la humedad en el momento de la compactación no distara en exceso de aquella determinada como óptima.

Así pues, el listado completo de las probetas fabricadas se puede ver en la Tabla B2 1:

Suelo	Tipo de probeta	Disolución de urea y cloruro de calcio	Repetición	Nombre de la probeta
SS	Control		1	C_SS_1
			2	C_SS_2
			3	C_SS_3

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

	Compactada antes de los riegos enriquecidos	con agua destilada	1	B_SS_AD_1
			2	B_SS_AD_2
			3	B_SS_AD_3
		con medio Bang	1	B_SS_MB_1
			2	B_SS_MB_2
			3	B_SS_MB_3
	Compactada después de los riegos enriquecidos	con agua destilada	1	A_SS_AD_1
			2	A_SS_AD_2
			3	A_SS_AD_3
			4	A_SS_AD_4
		con medio Bang	1	A_SS_MB_1
			2	A_SS_MB_2
3			A_SS_MB_3	
4			A_SS_MB_4	
CS	Control		1	C_CS_1
			2	C_CS_2
			3	C_CS_3
	Compactada antes de los riegos enriquecidos	con agua destilada	1	B_CS_AD_1
			2	B_CS_AD_2
			3	B_CS_AD_3
		con medio Bang	1	B_CS_MB_1
			2	B_CS_MB_2
			3	B_CS_MB_3
	Compactada después de los riegos enriquecidos	con agua destilada	1	A_CS_AD_1
			2	A_CS_AD_2
			3	A_CS_AD_3
4			A_CS_AD_4	
con medio Bang		1	A_CS_MB_1	
		2	A_CS_MB_2	
		3	A_CS_MB_3	
		4	A_CS_MB_4	
M1	Control		1	C_M1_1
			2	C_M1_2
			3	C_M1_3
	Compactada antes de los riegos enriquecidos	con agua destilada	1	B_M1_AD_1
			2	B_M1_AD_2
			3	B_M1_AD_3
		con medio Bang	1	B_M1_MB_1
			2	B_M1_MB_2
			3	B_M1_MB_3
	Compactada después de los riegos enriquecidos	con agua destilada	1	A_M1_AD_1
			2	A_M1_AD_2
			3	A_M1_AD_3
4			A_M1_AD_4	
con medio Bang		1	A_M1_MB_1	
		2	A_M1_MB_2	
		3	A_M1_MB_3	
		4	A_M1_MB_4	

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

M2	Control		1	C_M2_1
			2	C_M2_2
			3	C_M2_3
	Compactada antes de los riegos enriquecidos	con agua destilada	1	B_M2_AD_1
			2	B_M2_AD_2
			3	B_M2_AD_3
		con medio Bang	1	B_M2_MB_1
			2	B_M2_MB_2
			3	B_M2_MB_3
	Compactada después de los riegos enriquecidos	con agua destilada	1	A_M2_AD_1
			2	A_M2_AD_2
			3	A_M2_AD_3
			4	A_M2_AD_4
		con medio Bang	1	A_M2_MB_1
			2	A_M2_MB_2
			3	A_M2_MB_3
4			A_M2_MB_4	

Tabla B2 1: Listado de las probetas fabricadas en este ensayo.

B.2.3.3. Determinación del volumen de inoculación.

La correspondiente cantidad de bacterias que se debía aportar fue calculada para cada tipo de suelo mediante la ecuación:

$$P_{bacterias} = \frac{(W_{opt.} - W_o) \cdot P_{suelo}}{1 + W_o} \quad (Ec. B2. 3)$$

Donde:

P = masa.

$W_{opt.}$ = humedad óptima de compactación conforme los resultados del ensayo previo (Tabla B2 2).

W_o = humedad real del suelo (Ec. B2. 1).

Tipo de suelo	Humedad óptima de compactación, $W_{opt.}$ [%]
SS	9,26
CS	5,67
M1	15,66
M2	16,42

Tabla B2 2: La humedad óptima de compactación de los 4 tipos de suelo.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

La humedad real del suelo se calculó un día antes del inicio de los ensayos. Se recogió una muestra de cada tipo de suelo y se secó en el horno (paso 3).

La concentración de bacterias que se añadió a cada tipo de suelo se puede observar en la Tabla B2 3. El volumen de inoculación se determinó a partir de la ecuación (Ec. B2. 3).

Tipo de suelo	Concentración de bacterias [cfu/ml]	Segunda inoculación de bacterias
SS	1.10^9	Beneficioso
CS	1.10^9	Indiferente
M1	1.10^7	Indiferente
M2	1.10^9	Indiferente

Tabla B2 3: Concentración de bacterias añadida en los 4 tipos de suelo.

Posteriormente, se compactaron las probetas que debían ser compactadas antes de iniciar los riegos enriquecidos.

Pasadas 4h de la inoculación de las bacterias se realizó una aportación de medio Bang de 4 ml por cilindro para favorecer el crecimiento y estabilización de las bacterias.

B.2.3.4. Determinación de los riegos enriquecidos.

El tipo del tratamiento se eligió en base a los resultados obtenidos en el ensayo anterior. Para cada tipo de suelo se eligió el parámetro que mostraba una mayor influencia (Tabla B1 16).

En este ensayo se optó por establecer un único volumen de líquido a añadir en cada inoculación del tratamiento. Este volumen debería ser válido tanto para los ensayos con periodo de tiempo de dos horas entre tratamientos como para los que tenían definido un tratamiento cada 4h y para todos los tipos de suelo. De este modo, el promedio de cantidad de agua a añadir en cada suelo fue de 2,5ml, 3,3ml, 5,1ml y 4,8ml para M1, M2, CS y SS respectivamente con intervalos de 6h, lo que correspondía a un volumen cada 2h de 0,8ml, 1,1ml, 1,7ml y 1,2ml. Por lo tanto, se decidió inocular un volumen de 1,4ml de disolución de urea (20g/L) y calcio (3,675g/L o 36,75g/L) en medio Bang o agua destilada en cada riego del tratamiento, ya fuera cada 2h o 4h e independientemente del tipo de suelo.

El tratamiento se realizó durante 5 días de 10 a 18h. La Tabla B2 4 muestra las condiciones y el ritmo de los riegos enriquecidos:

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

Tipo de suelo	Condiciones		Intervalos de tratamiento					
			Hora					Vol/día
	[CaCl ₂] g/L	[Urea] g/L	10:00h	12:00h	14:00h	16:00h	18:00h	n=1
SS	3,675	20	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml	7 ml
CS	36,75	20	1,4 ml	0	1,4 ml	0	1,4 ml	4,2 ml
M1	36,75	20	1,4 ml	0	1,4 ml	0	1,4 ml	4,2 ml
M2	3,675	20	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml	7 ml

Tabla B2 4: Condiciones e intervalos de los riegos enriquecidos.

En la Figura B2. 2 se muestran las probetas fabricadas:



Figura B2. 2: Probetas fabricadas.

B.2.3.5. Compactación de las probetas.

Todas las probetas fueron compactadas conforme el método Proctor Modificado antes o después de realizar los riegos enriquecidos. El procedimiento de producción de cada tipo de probeta se describe a continuación.

B.2.3.5.1. Probetas de control.

En primer lugar se preparó la mezcla necesaria para realizar 3 probetas de cada tipo de suelo en condiciones de laboratorio. Posteriormente cada suelo se humedeció con agua destilada hasta alcanzar su humedad óptima de compactación (Tabla B2 2). Se llenaron completamente los moldes con 3 capas de suelo y cada capa se compactó con 11 golpes (B2.3.1. paso 4). Se retiró una muestra de 150 g de cada tipo de suelo (B2.3.1. paso 3). Finalmente, las probetas se desmoldaron y se dejaron secar. En el punto B2.3.6 se describe el proceso para desmoldar las probetas.

B.2.3.5.2. Probetas compactadas antes de iniciar los riegos enriquecidos.

En primer lugar se preparó la mezcla necesaria para realizar 3 probetas de cada tipo de suelo en condiciones de laboratorio. Posteriormente a cada suelo se le añadió la suspensión bacteriana en la concentración deseada (Tabla B2 3) hasta alcanzar su humedad óptima de compactación (Tabla B2 2). Se llenaron completamente los moldes con 3 capas de suelo y

cada capa se compactó con 11 golpes (B2.3.1. paso 4). Se retiró una muestra de 150 g de cada tipo de suelo (B2.3.1. paso 3). En 4 horas se aportó el medio Bang y pasadas otras 24 horas, se inició el tratamiento con cloruro de calcio y urea diluidos en agua destilada o medio Bang (Tabla B2 4). Finalmente, las probetas se dejaron secar durante una semana, se desmoldaron y se dejaron secar definitivamente.

B.2.3.5.3. Probetas compactadas después de iniciar los riegos enriquecidos.

En primer lugar se pesaron los moldes vacíos (P_1). Esto permitiría calcular la humedad que contenían las probetas durante el proceso de secado y saber el momento apropiado para compactarlas. Se preparó la mezcla necesaria para realizar 4 probetas de cada tipo de suelo en condiciones de laboratorio. Posteriormente a cada suelo se añadió la suspensión bacteriana en la concentración deseada (Tabla B2 3) hasta alcanzar su humedad óptima de compactación (Tabla B2 2). Se llenaron completamente los moldes y se retiró una muestra de 150 g de cada tipo de suelo (B2.3.1. paso 3). Los moldes se pesaron otra vez con el suelo contenido (P_2). Tras 4 horas se aportó el medio Bang y pasadas otras 24 horas, se inició el tratamiento con cloruro de calcio y urea diluidos en agua destilada o medio Bang (Tabla B2 4). Las probetas se dejaron secar mientras se controlaba la evolución de su masa hasta alcanzar la humedad óptima. El proceso de controlar la evolución de la masa consistió en realizar mediciones de la masa (P_4) y calcular su humedad.

Para calcular la humedad de la probeta, en primer lugar, se calculó la masa si estuviera seca (P_3):

$$P_3 = \frac{P_2 - P_1}{1 + W_0} \quad (\text{Ec. B2. 4})$$

Donde:

P_3 = masa del suelo dentro del molde si estuviera seco.

P_2 = masa del suelo después de añadir las bacterias y antes de los nutrientes.

P_1 = masa del molde vacío.

W_0 = humedad real del suelo (Ec. B2. 1).

Una vez obtenido este valor, se calculó la humedad real que contenía la probeta en aquel instante (W_5):

$$W_5 = \frac{(P_4 - P_1) - (P_2 - P_1)}{P_3} \quad (\text{Ec. B2. 5})$$

Donde:

W_5 = humedad en este momento.

P_4 = masa del suelo en el instante preciso.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

Cuando la humedad que contenía la probeta calculada al momento alcanzaba la humedad óptima de compactación, se procedió a compactar las probetas conforme al apartado B2.3.1 apartado 4. Posteriormente se dejó secar a 105° C la probeta adicional para determinar la humedad real en el momento de la compactación. Finalmente, las probetas se dejaron secar durante una semana, se desmoldaron y se dejaron secar definitivamente.

La humedad real de compactación de las probetas compactadas después de los riegos enriquecidos y su comparativa con la humedad óptima de compactación puede verse en la Tabla B2 5 y la Tabla B2 6.

	SS	CS	M1	M2
Humedad real A_XX_AD_4 (%)	9,15	5,40	11,84	14,60
Humedad óptima (%)	9,26	5,67	15,66	16,42

Tabla B2 5: Humedad real y humedad óptima de compactación de las probetas tratadas con urea, cloruro cálcico, diluidos en agua destilada.

	SS	CS	M1	M2
Humedad real A_XX_MB_4 (%)	9,47	5,83	15,04	15,23
Humedad óptima (%)	9,26	5,67	15,66	16,42

Tabla B2 6: Humedad real y humedad óptima de compactación de las probetas tratadas con urea, cloruro cálcico, diluidos en medio Bang.

B.2.3.6. Proceso para desmoldar las probetas.

Una vez finalizado el tratamiento y la compactación, las probetas se dejaron secar durante una semana. Transcurrida esta semana se procedió al desmoldado. Debido al proceso de compactación, no fue posible desmoldar las probetas utilizando el procedimiento anterior (B1.3.6. Proceso para desmoldar las probetas). La presión que se ejercía en la pared del cilindro no era suficiente para deslizarlo y extraer la probeta. Por esta razón las probetas se desmoldaron mediante la ayuda de una prensa electromecánica (Figura B2. 3).

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión



Figura B2. 3: Instantánea durante el proceso de desmoldado de probetas en la máquina de compresión.

En primer lugar se retiró la cinta adhesiva en la parte inferior y se extrajeron la malla y la arandela que fueron sustituidas por un segundo cilindro vacío acoplado mediante cinta adhesiva. Éste cilindro estaba cortado longitudinalmente de forma simétrica para facilitar la separación entre la probeta y el cilindro. Posteriormente ambos cilindros se colocaban en la máquina de compresión, quedando el cilindro vacío por encima del que contenía la probeta. A continuación, se aplicaba un desplazamiento descendente de 1,0 mm/min hasta que la probeta se había transferido al cilindro superior. Finalmente, la probeta y el cilindro superior se situaban horizontalmente y se ejercía fuerza en los laterales para poder extraer las paredes del cilindro deslizándolas. En la Figura B2. 4 se pueden observar diversos instantes del proceso.



Figura B2. 4a: La probeta dentro del cilindro cortado, situados horizontalmente. Figura B2 4b: El cilindro desmoldado.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

Las probetas desmoldadas se pueden observar en la Figura B2. 5:



Figura B2. 5: Las probetas desmoldadas.

B.2.3.7. Metodología de los ensayos a compresión axial no confinada.

Estos ensayos se realizaron en una prensa electrometálica, capaz de medir la fuerza de tensión o compresión generada en un desplazamiento constante. Su rango de medida estaba preparado para medir fuerzas hasta 50 kN (B1.3.8. Metodología de los ensayos a compresión no confinada) y se podían acoplar células de carga para medición de rangos menores tal y como se ha descrito anteriormente (B1.3.8. Metodología de los ensayos a compresión axial no confinada).

Antes de iniciar los ensayos de compresión, las probetas se dejaron secar definitivamente durante 2 semanas tras el desmoldado. Paralelamente al ensayo anterior, se midió el diámetro inferior, el superior y la altura de las probetas con un pie de rey.

Para uniformizar la distribución de la carga de compresión se colocaron sendas piezas de goma en los extremos superior e inferior de la probeta. Esto supone una mejora respecto a los ensayos anteriores sobre probetas no compactadas, limitando posibles efectos locales. Posteriormente se situó la probeta ya preparada en la máquina de compresión y se aplicó una carga descendente de 1,0 mm/min. Finalmente, se detuvo el ensayo cuando se observó que la probeta estaba fracturada y la fuerza a compresión empezaba a decrecer constantemente. En la Figura B2. 6 se muestra la realización del ensayo.

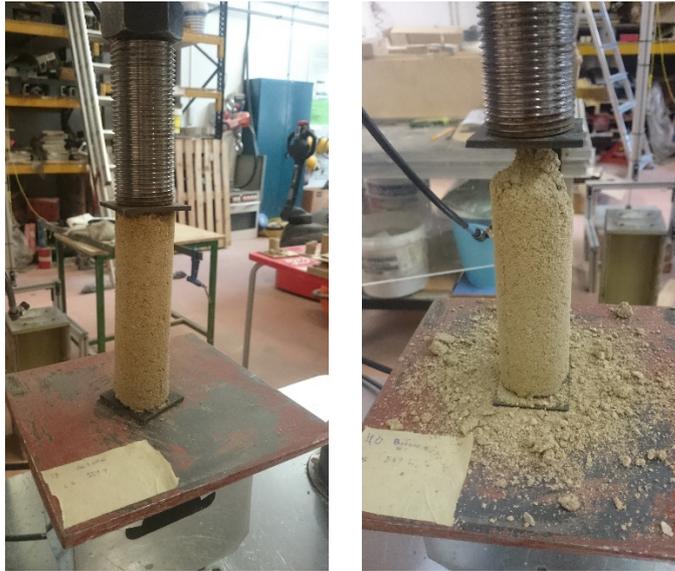


Figura B2. 6: Una probeta durante el ensayo a compresión.

B.2.4. Cálculo de los resultados obtenidos.

Los resultados en este ensayo se calcularon de manera equivalente al ensayo previo. El procedimiento de los cálculos está descrito en B1.4 (Cálculo de los resultados obtenidos) y a modo de resumen, consistió en: calcular la media de los diámetros y posteriormente, calcular la relación entre la altura y el diámetro medio. Luego se eligió el factor de corrección conforme la Figura B1. 3 y se calculó la superficie circular que tenía la probeta. Finalmente, se calcularon el esfuerzo de compresión que podía soportar la probeta y el esfuerzo de compresión corregido. Los valores obtenidos para cada tipo de suelo se muestran en las tablas siguientes:

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

Test	Ø inferior (mm)	Ø superior (mm)	Ø medio (mm)	Altura (mm)	Relación Altura/ Ø	Factor de corrección	Fuerza de compresión (N)	Tensión de compresión (kPa)	Tensión de compresión corregido (kPa)
C_SS_1	43,5	44,7	44,1	147	3,33	1,1064	53	34,6	38,2
C_SS_2	42,9	43,4	43,15	148	3,42	1,11432	96	65,6	73,1
C_SS_3	42,6	42,4	42,5	148	3,48	1,11856	38	26,7	29,8
B_SS_AD_1	41	40	40,5	154	3,80	1,14416	35	27,1	31,0
B_SS_AD_2	43,3	43	43,15	146	3,38	1,11064	58	39,6	43,9
B_SS_AD_3	-	-	-	-	-	-	-	-	rota
A_SS_AD_1	42,6	42	42,3	140	3,30	1,10472	43	30,6	33,1
A_SS_AD_2	42,5	42,7	42,6	136	3,19	1,09536	52	36,4	39,8
A_SS_AD_3	43,8	42,7	43,25	138	3,1	1,0952	27	18,3	20,0

Tabla B2 7: Resultados para las probetas de arena fina (SS), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en agua destilada.

Test	Ø inferior (mm)	Ø superior (mm)	Ø medio (mm)	Altura (mm)	Relación Altura/ Ø	Factor de corrección	Fuerza de compresión (N)	Tensión de compresión (kPa)	Tensión de compresión corregido (kPa)
C_CS_1	43,3	43,3	43,3	144	3,32	1,106	101	68,5	75,7
C_CS_2	44,5	43,3	43,9	147	3,38	1,11072	75	49,5	54,9
C_CS_3	42,9	43	42,95	100	2,32	1,02624	130	89,7	92,0
B_CS_AD_1	43	43,1	43,05	150	3,48	1,11872	58	39,8	44,5
B_CS_AD_2	42	42,4	42,2	150	3,55	1,12432	32	22,8	25,6
B_CS_AD_3	42,4	42,3	42,35	80	1,88	0,99112	69	48,9	48,4
A_CS_AD_1	41,2	42,7	41,95	143	3,40	1,11264	24	17,3	19,2
A_CS_AD_2	42,8	41,4	42,1	145	3,44	1,11552	17	12,2	13,6
A_CS_AD_3	-	-	-	-	-	-	-	-	rota

Tabla B2 8: Resultados para las probetas de arena gruesa (CS), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en agua destilada.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

Test	\varnothing inferior (mm)	\varnothing superior (mm)	\varnothing medio (mm)	Altura (mm)	Relación Altura/ \varnothing	Factor de corrección	Fuerza de compresión (N)	Tensión de compresión (kPa)	Tensión de compresión corregido (kPa)
C_M1_1	42,9	42,2	42,55	144	3,38	1,11072	496	348	386,5
C_M1_2	43	44	43,5	141	3,24	1,09928	472	317	348,4
C_M1_3	43,3	43,7	43,5	140	3,21	1,09744	450	302	331,4
B_M1_AD_1	43	42,4	42,7	147	3,44	1,11536	177	123	137,1
B_M1_AD_2	48	42,5	45,25	147	3,47	1,11832	249	154	172,2
B_M1_AD_3	42,3	42	42,15	95	2,25	1,02024	340	243	247,9
A_M1_AD_1	43,1	42,1	42,6	146	3,42	1,11416	299	209	232,8
A_M1_AD_2	43	42	42,6	144	3,38	1,11104	333	234	259,9
A_M1_AD_3	42,6	42,4	42,5	146	3,43	1,1148	362	255	284,2

Tabla B2 9: Resultados para las probetas de mezcla 1 (M1), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en agua destilada.

Test	\varnothing inferior (mm)	\varnothing superior (mm)	\varnothing medio (mm)	Altura (mm)	Relación Altura/ \varnothing	Factor de corrección	Fuerza de compresión (N)	Tensión de compresión (kPa)	Tensión de compresión corregido (kPa)
C_M2_1	43,7	46,6	45,15	143	3,16	1,09336	1323	826	903,1
C_M2_2	44,5	40,2	42,35	144	3,40	1,112	1471	1044	1160,9
C_M2_3	43,3	41,9	42,6	143	3,35	1,10848	659	462	512,1
B_M2_AD_1	42,5	42,7	42,6	148	3,47	1,11792	845	592	661,8
B_M2_AD_2	42,1	41,6	41,85	144	3,44	1,1152	943	685	763,9
B_M2_AD_3	42,3	42,3	42,3	150	3,54	1,12368	1041	74	83,1
A_M2_AD_1	43	41,6	42,3	140	3,30	1,10472	1245	885	977,6
A_M2_AD_2	42,8	42,6	42,7	141,5	3,31	1,10504	769	537	593,4
A_M2_AD_3	43	42,3	42,65	137	3,21	1,09696	807	564	618,6

Tabla B2 10: Resultados para las probetas de mezcla 2 (M2), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en agua destilada.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

Test	\varnothing inferior (mm)	\varnothing superior (mm)	\varnothing medio (mm)	Altura (mm)	Relación Altura/ \varnothing	Factor de corrección	Fuerza de compresión (N)	Tensión de compresión (kPa)	Tensión de compresión corregido (kPa)
C_SS_1	43,5	44,7	44,1	147	3,33	1,1064	53	34,6	38,2
C_SS_2	42,9	43,4	43,15	148	3,42	1,11432	96	65,6	73,1
C_SS_3	42,6	42,4	42,5	148	3,48	1,11856	38	26,7	29,8
B_SS_MB_1	43,54	42,4	42,97	144	3,35	1,10808	34	23,4	25,9
B_SS_MB_2	42,5	42,6	42,55	146	3,43	1,11448	78	54,8	61,0
B_SS_MB_3	42,6	43,1	42,85	130	3,03	1,08264	85	58,9	63,7
A_SS_MB_1	42,6	42	42,3	131	3,09	1,08768	75	53,3	57,9
A_SS_MB_2	43,4	42,6	43	125	2,90	1,07248	72	49,5	53,0
A_SS_MB_3	42,3	42,1	42,2	114	2,70	1,05608	72	51,4	54,2

Tabla B2 11: Resultados para las probetas de arena fina (SS), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en medio Bang.

Test	\varnothing inferior (mm)	\varnothing superior (mm)	\varnothing medio (mm)	Altura (mm)	Relación Altura/ \varnothing	Factor de corrección	Fuerza de compresión (N)	Tensión de compresión (kPa)	Tensión de compresión corregido (kPa)
C_CS_1	43,3	43,3	43,3	144	3,32	1,106	101	68,5	75,7
C_CS_2	44,5	43,3	43,9	147	3,38	1,11072	75	49,5	54,9
C_CS_3	42,9	43	42,95	100	2,32	1,02624	130	89,7	92,0
B_CS_MB_1	42,76	42,4	42,58	138	3,24	1,0992	46	32,3	35,5
B_CS_MB_2	42	42,2	42	113	2,69	1,0552	55	39,6	41,7
B_CS_MB_3	-	-	-	-	-	-	-	-	rota
A_CS_MB_1	42,4	42,5	42,45	135	3,18	1,0944	27	19	20,7
A_CS_MB_2	43	42,3	42,65	135	3,16	1,0932	23	16	17,4
A_CS_MB_3	42,6	42,5	42,55	127	2,98	1,07872	31	21,8	23,5

Tabla B2 12: Resultados para las probetas de arena gruesa (CS), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en medio Bang.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

Test	\varnothing inferior (mm)	\varnothing superior (mm)	\varnothing medio (mm)	Altura (mm)	Relación Altura/ \varnothing	Factor de corrección	Fuerza de compresión (N)	Tensión de compresión (kPa)	Tensión de compresión corregido (kPa)
C_M1_1	42,9	42,2	42,55	144	3,38	1,11072	496	348	386,5
C_M1_2	43	44	43,5	141	3,24	1,09928	472	317	348,4
C_M1_3	43,3	43,7	43,5	140	3,21	1,09744	450	302	331,4
B_M1_MB_1	42,9	42,5	42,7	148	3,46	1,11728	246	171	191,0
B_M1_MB_2	42,8	42,5	42,65	139	3,25	1,10072	267	186	204,7
B_M1_MB_3	43	43,2	43,1	143	3,31	1,10536	365	250	276,3
A_M1_MB_1	42,96	42,6	42,78	125	2,92	1,07368	301	209	224,4
A_M1_MB_2	42,1	42,1	42,1	135	3,20	1,09648	233	167	183,1
A_M1_MB_3	43,8	42,4	43,1	143	3,31	1,10536	269	184	203,3

Tabla B2 13: Resultados para las probetas de mezcla 1 (M1), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en medio Bang.

Test	\varnothing inferior (mm)	\varnothing superior (mm)	\varnothing medio (mm)	Altura (mm)	Relación Altura/ \varnothing	Factor de corrección	Fuerza de compresión (N)	Tensión de compresión (kPa)	Tensión de compresión corregido (kPa)
C_M2_1	43,7	46,6	45,15	143	3,16	1,09336	1323	826	903,1
C_M2_2	44,5	40,2	42,35	144	3,40	1,112	1471	1044	1160,9
C_M2_3	43,3	41,9	42,6	143	3,35	1,10848	659	462	512,1
B_M2_MB_1	42,4	42,56	42,48	94	2,21	1,01696	1138	802	815,6
B_M2_MB_2	42,3	42,1	42,2	97	2,29	1,02384	1079	771	789,3
B_M2_MB_3	42,4	42,5	42,45	143	3,36	1,10944	983	694	769,9
A_M2_MB_1	42,7	42,7	42,7	139	3,25	1,1004	1334	931	1024,4
A_M2_MB_2	43,2	42,5	42,85	142	3,31	1,10504	1134	786	868,5
A_M2_MB_3	43,7	42,5	43,1	142	3,29	1,10352	1228	841	928,0

Tabla B2 14: Resultados para la mezcla 2 (M2), tratadas con urea y cloruro cálcico, diluidos en medio Bang.

Anexo B. MICP en probetas cilíndricas de suelo para la determinación de su resistencia a compresión

En la Tabla B2 15 se muestran los promedios de los resultados de la resistencia a compresión para cada ensayo, remarcados (en verde) los valores que muestran mayor influencia:

Suelo	Tipo ensayo				
	C_XX	B_XX_AD	B_XX_MB	A_XX_AD	A_XX_MB
SS	47,1	37,5	62,4	31,0	55,1
CS	74,3	39,5	38,6	16,4	20,6
M1	355,5	185,8	224,0	259,0	203,6
M2	858,7	503,0	791,6	729,9	940,4

Tabla B2 15: Tabla resumen de los resultados obtenidos.

Anexo C. Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

C.1. Introducción.

El objetivo de este ensayo fue estudiar la influencia de la presencia de bacterias sobre los parámetros de respuesta al ensayo de corte directo conforme la norma UNE 103-401-98.

Para conseguir este objetivo, en primer lugar se fabricaron probetas cúbicas de diferentes tipos de suelo, con dimensiones que permitirían realizar los ensayos a cortante. Posteriormente, se llevó a cabo un ensayo para la determinación de la aportación máxima de líquidos a añadir en las probetas.

En segundo lugar se realizaron tres pruebas con diferentes concentraciones de bacterias y finalmente, las probetas se ensayaron a corte directo.

El presente anexo contiene tres apartados generales en los que se explican los materiales que se utilizaron para realizar el ensayo, su procedimiento y los resultados que se obtuvieron posteriormente.

C.2. Materiales.

En este ensayo se utilizaron los mismos materiales que en el ensayo realizado en Anexo B: anexo B1, apartado B1.2. (Materiales).

C.3. Procedimiento del ensayo.

C.3.1. Metodología y producción de las probetas.

Para realizar los ensayos a cortante se prepararon las probetas en moldes cúbicos de 10cm de lado. Estas dimensiones permitían llevar a cabo los ensayos a cortante con partículas de arena relativamente gruesas (aproximadamente 2 mm). Los moldes cúbicos y las probetas realizadas se muestran en la Figura C1. 1 y la Figura C1. 2.

Anexo C. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

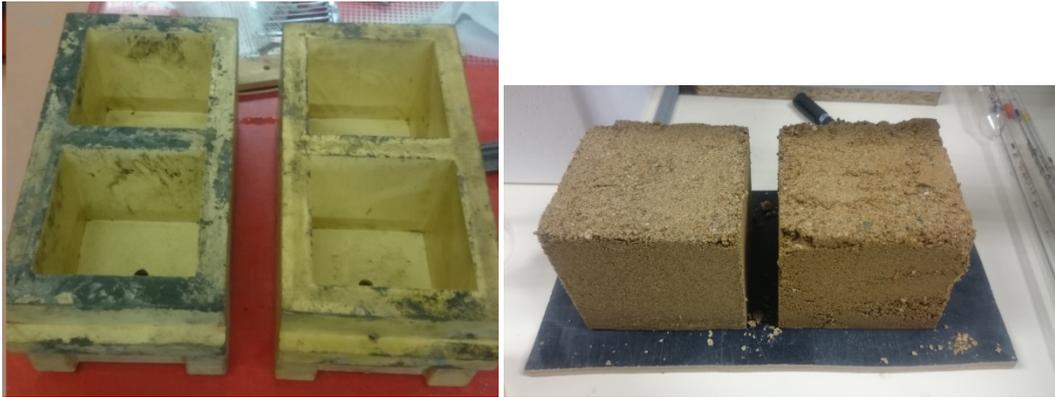


Figura C1. 1: Moldes cúbicos de 10 cm x 10 cm x 10 cm. Figura C1. 2: Probetas cúbicas realizadas.

Para facilitar el desmoldado de las probetas se colocó una rejilla metálica de ventilación en el fondo del molde, que permitía el paso de líquidos y ofrecía una superficie rígida para presionar la muestra y extraerla por la cara libre. Encima de la rejilla de ventilación se añadió una malla de 75 μm de apertura como la utilizada en las probetas cilíndricas. De esta forma fue posible asegurar que el tipo de suelo empleado quedaba bien sujeto y los fluidos del tratamiento eran capaces de atravesar la malla. En la Figura C1. 3a y b se puede observar la rejilla y la malla utilizadas:



Figura C1. 3a: Rejillas metálicas sólidas de ventilación; Figura C1. 3b: mallas de 75 μm de apertura utilizadas en las probetas cilíndricas.

Su posición dentro del molde se puede observar en la Figura C1. 4.

Anexo C. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo



Figura C1. 4: La rejilla metálica y la malla posicionadas dentro del molde cúbico.

Finalmente, se rellenaba el cubo con el tipo de suelo correspondiente (SS, CS, M1 o M2) y se ejecutaba el tratamiento previsto (Figura C1. 5).



Figura C1. 5: Probetas de M1 y M2 tratadas solo con agua corriente.

Para cada tipo de suelo se fabricaron tres tipos de probetas:

- *Probetas de control:* Durante la compactación se realizó un único riego con agua destilada (XX-0-CT3/6/9-Y).
- *Probetas de tratamiento realizado con baja concentración de bacterias:* La adición de las bacterias de estas probetas se realizó con concentración baja: 1.10^7 cfu/ml (XX-1-CT3/6/9-Y).
- *Probetas de tratamiento realizado con alta concentración de bacterias:* La adición de las bacterias de estas probetas se realizó con concentración alta: 1.10^9 cfu/ml (XX-2-CT3/6/9-Y).

Anexo C. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

Aclaración XX-0/1/2-CT3/6/9-Y:

XX: tipo de suelo (SS, CS, M1 o M2).

0/1/2: 0 = probeta de control. 1 = probeta de tratamiento realizado con baja concentración de bacterias. 2 = probeta de tratamiento realizado con alta concentración de bacterias.

CT3/6/9: ensayo realizado a corte directo con una fuerza vertical constante de 3, 6 o 9 kN.

Y: número de probetas.

En total se ensayaron 49 probetas, aunque se implementaron varias más que se colapsaron antes del ensayo debido a la fragilidad de los especímenes al perder humedad. Este hecho fue más destacable en el suelo correspondiente a la arena fina. El listado completo de las probetas cúbicas fabricadas se puede ver en la Tabla C1 1.

Suelo	[Bacteria]	Ensayo de corte	Repetición	Probeta	
SS	0	CT3	1	SS-0-CT3-1	
			2	SS-0-CT3-2	
		CT6	1	SS-0-CT6-1	
		CT9	1	SS-0-CT9-1	
	1	CT3	1	SS-1-CT3-1	
			CT6	1	SS-1-CT6-1
			CT9	1	SS-1-CT9-1
	2	CT3	1	SS-2-CT3-1	
			2	SS-2-CT3-2	
		CT6	1	SS-2-CT6-1	
			CT9	1	SS-2-CT9-1
		2		SS-2-CT9-2	
CS		0	CT3	1	CS-0-CT3-1
	2			CS-0-CT3-2	
	CT6		1	CS-0-CT6-1	
			2	CS-0-CT6-2	
	CT9		1	CS-0-CT9-1	
			2	CS-0-CT9-2	

Anexo C. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

	1	CT3	1	CS-1-CT3-1	
			2	CS-1-CT3-2	
		CT6	1	CS-1-CT6-1	
			2	CS-1-CT6-2	
		CT9	1	CS-1-CT9-1	
			2	CS-1-CT9-2	
	2	CT3	1	CS-2-CT3-1	
			2	CS-2-CT3-2	
		CT6	1	CS-2-CT6-1	
			2	CS-2-CT6-2	
CT9		1	CS-2-CT9-1		
M1	0	CT3	1	M1-0-CT3-1	
		CT6	1	M1-0-CT6-1	
		CT9	1	M1-0-CT9-1	
	1	CT3	1	M1-1-CT3-1	
		CT6	1	M1-1-CT6-1	
		CT9	1	M1-1-CT9-1	
	2	CT3	1	M1-2-CT3-1	
		CT6	1	M1-2-CT6-1	
		CT9	1	M1-2-CT9-1	
	M2	0	CT3	1	M2-0-CT3-1
				2	M2-0-CT3-2
			CT6	1	M2-0-CT6-1
2				M2-0-CT6-2	
CT9			1	M2-0-CT9-1	
			2	M2-0-CT9-2	
1		CT3	1	M2-1-CT3-1	
		CT6	1	M2-1-CT6-1	
		CT9	1	M2-1-CT9-1	

Anexo C. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

	2	CT3	1	M2-2-CT3-1
		CT6	1	M2-2-CT6-1

Tabla C1 1: Listado de las probetas fabricadas en este ensayo.

C.3.2. Procedimiento de preparación de disoluciones.

C.3.2.1. Preparación de suspensiones de *Sporosarcina pasteurii*.

Todo el procedimiento de preparación de suspensiones de *Sporosarcina pasteurii* está descrito en el anexo A, apartado A.3.1.1. (Preparación de suspensiones de *Sporosarcina pasteurii*).

C.3.2.2. Preparación de la solución de cloruro cálcico y urea en el medio Bang.

En primer lugar se preparó el medio Bang. En el anexo A, apartado A.3.1.2. (Preparación de medio Bang, está descrito el proceso de preparación) se describe el proceso de preparación.

Posteriormente, se prepararon las concentraciones de cloruro de calcio y urea. Su preparación también está descrita en el anexo A, apartados A.3.1.3 (Preparación de la solución de urea) y A.3.1.4. (Preparación de la solución de cloruro de calcio). Al igual que en el ensayo realizado en el anexo B1, la urea y el cloruro de calcio se diluían en el medio Bang.

C.3.3. Determinación de la aportación máxima de líquido en una probeta.

La cantidad de fluido máximo a añadir en las probetas cúbicas secas (Tabla C1 2) se determinó de igual modo que en el caso de los cilindros. Su determinación está descrita en el anexo B1, apartado B1.3.3. (Determinación de la aportación máxima de líquido en una probeta). Este volumen fue el usado para la adición inicial, ya fuera de agua o de suspensión bacteriana con calcio y urea añadidos.

Tipo	Cantidad H₂O [g]
SS	377,1
CS	315,9
M1	390,0
M2	408,2

Tabla C1 2: Tabla con las cantidades máximas de agua que se pueden añadir a la probeta cúbica seca.

C.3.4. Determinación de la influencia del cultivo.

El objetivo de este ensayo fue determinar la influencia de la actividad bacteriana en función de su concentración. Para conseguir este objetivo se llevaron a cabo ensayos a corte directo para cada tipo de suelo.

Anexo C. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

Para cada tipo de suelo se realizaron 3 diferentes pruebas con el mismo tratamiento, variando solamente la concentración bacteriana. En la Tabla C1 3 se pueden observar los parámetros de las 3 pruebas realizadas:

Test	Concentración de bacterias [cfu/ml]	Medio Bang	Concentración de urea [mmol/L]	Concentración de iones de calcio [mmol/L]	Periodo entre tratamientos por día [h]
1	-	-	-	-	-
2	1.10^7	+	333	25	4
3	1.10^9	+	333	25	4

Tabla C1 3: Pruebas realizadas para determinar la influencia de la actividad bacteriana.

En la tabla C1 3 el primer test se realizó solo con agua corriente. El segundo test se realizó con baja concentración de bacterias, entre 1.10^6 cfu/ml y 1.10^7 cfu/ml. La concentración utilizada para el medio Bang era la misma que se utilizó en anexo B: B1.3.2.2. (Preparación de la solución de cloruro cálcico y urea en el medio Bang). La urea y el cloruro cálcico se diluían en el medio Bang. Para poder comparar, su concentración fue fija para los tests 2 y 3. El ritmo de los tratamientos se realizaba durante 5 días, de 10h a 18h a cada 4 horas. En el tercer test se utilizó alta concentración de bacterias (1.10^8 cfu/ml - 1.10^9 cfu/ml).

Las bacterias se añadieron con la cantidad determinada anteriormente a través de la aportación máxima de líquidos en una probeta (Tabla C1 2).

Pasadas 4 horas de la inoculación de bacterias se realizó una aportación de medio Bang de 16 ml para favorecer el crecimiento y estabilización de los microorganismos.

C.3.5. Determinación de los riegos enriquecidos.

Transcurridas 24h de la primera inoculación de bacterias se realizó una segunda aportación de 16 ml. La concentración añadida en las pruebas 2 y 3 fue diferente. En el test 2 se añadió una baja concentración de bacterias ($1/100 - 1.10^7$ cfu/ml) mientras que en el test 3 se añadió una alta concentración con dilución de 3 veces: 3.10^8 cfu/ml.

Los riegos enriquecidos se realizaban con urea (20 g/l) y cloruro de calcio (3,675 g/l) diluidos en medio Bang durante 5 días de 10 a 18h a cada 4 horas. Tabla C1 4 muestra las horas de la realización de los riegos enriquecidos:

Tiempo [h]	10h	12h	14h	16h	18h
	x		x		x

Tabla C1 4: Tratamiento: período entre el riego enriquecido para las probetas cúbicas.

C.3.6. Proceso para desmoldar las probetas.

El proceso consistió en sacar las probetas del molde cúbico poniendo el recipiente del revés y empujando las probetas hacia fuera del molde con dos barras metálicas, puesto que debían

Anexo C. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

desmoldarse por parejas si los dos espacios del molde se encontraban llenos. El proceso se puede observar en la Figura C1. 6.

Cada molde contenía dos cubos. En la parte inferior de cada uno había un agujero en el que durante el desmoldado se introducían cuidadosamente las dos barras de metal en posición vertical empujando hacia abajo con suavidad los dos cubos de suelo. Una vez situadas las barras, el molde se iba extrayendo lentamente hacia arriba hasta la extracción completa.

Durante el proceso de desmoldado de las probetas cubicas era posible que alguna de ellas se rompiera debido a la humedad del suelo (y obviamente, a la falta de compactación necesaria para evaluar el efecto únicamente de las bacterias). Para evitar esto, fue necesario extraer el molde de forma muy cuidadosa, lentamente, en posición completamente vertical y con un movimiento constante. Los suelos más propensos a la rotura durante la extracción fueron la arena gruesa y la mezcla 2. Cabía la posibilidad de que la fragilidad de los cubos de arena gruesa se debiese al propio tamaño de las partículas respecto a las de arena fina.



Figura C1. 6: Instantánea durante el proceso de desmoldado de las probetas.

C.3.7. Metodología de los ensayos a corte directo.

Los ensayos de corte directo se realizaron con dos actuadores oleohidráulicos, uno en posición vertical y el otro en posición horizontal (Figura C1. 7). Ambos estaban controlados mediante un PC de sobremesa con el software específico. Un equipo basado en un sistema de bomba hidráulica se encargaba de suministrar la presión a los actuadores. Las fuerzas máximas nominales de los actuadores son: 100kN para el actuador vertical y 50kN para el actuador horizontal.

Antes de empezar el ensayo, los laterales de las probetas se tuvieron que rebajar. Esto fue necesario para facilitar la introducción de las probetas en el sistema de ensayo y evitar la rotura durante la inserción. Una vez colocada la probeta se encendía la bomba hidráulica que proporcionaba la presión a los actuadores. Finalmente, antes de comenzar el ensayo, se posicionaban los actuadores introduciendo manualmente las coordenadas de inicio del ensayo.

Anexo C. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

Al empezar el ensayo el actuador vertical comenzaba a desplazarse hasta mantener una fuerza constante de 3, 6 ó 9 kN. Una vez estabilizado el actuador vertical se mantenía la fuerza constante a base de adaptar su posición mientras se activaba el actuador horizontal realizando un desplazamiento constante de 2 mm/min aumentando la fuerza aplicada hasta producir una rotura en la probeta según un plano horizontal. Cuando la fuerza horizontal comenzaba a disminuir (manteniéndose el desplazamiento horizontal a un ritmo constante) se daba por finalizado el ensayo ya que era síntoma inequívoco de rotura en la probeta. La duración de cada uno de los ensayos osciló entre 10 y 20 min.



Figura C1. 7: Ensayos de corte directo con actuador horizontal y con actuador vertical

C.4. Cálculo de los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos se utilizaron para determinar los parámetros del criterio de fallo de Mohr-Coulomb. En primer lugar se tenía que calcular la tensión tangencial τ_m de cada ensayo, que responde a la expresión:

$$\tau_m = \frac{F_{max} - F_{inicio}}{10^4 mm^2} \quad (Ec. C1. 1)$$

Donde F_{max} es la fuerza tangencial máxima aplicada y F_{inicio} es la fuerza inicial (offset del actuador). Una vez calculada la tensión tangencial y sabiendo la tensión normal (300, 600 o 900 kPa dependiendo del ensayo), se podían mostrar los puntos obtenidos mediante gráficos y ajustar una recta de regresión lineal que, según el criterio de Mohr-Coulomb, se corresponde a la siguiente fórmula:

$$\tau = \sigma \tan(\phi) + c \quad (Ec. C1. 2)$$

Se realizaron 57 ensayos en total, de los cuales se obtuvieron resultados representativos únicamente de 19 de control, 15 de concentración baja y 15 de concentración alta. Las probetas que claramente mostraron un comportamiento anómalo y muy diferenciado del resto de las de su subconjunto fueron excluidas de los gráficos y el análisis posterior.

Anexo C. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

A continuación se presentan los resultados de los ensayos de las probetas de control, que contienen agua destilada:

Arena fina (SS):

	SS-0	
Probeta	σ	τ
	Mpa	MPa
SS-0-CT3-1	0.30	0.22
SS-0-CT3-2	0.30	0.20
SS-0-CT6-1	0.60	0.41
SS-0-CT9-1	0.90	0.61

Tabla C1 5: Resultados del ensayo de corte directo de las probetas SS-0.

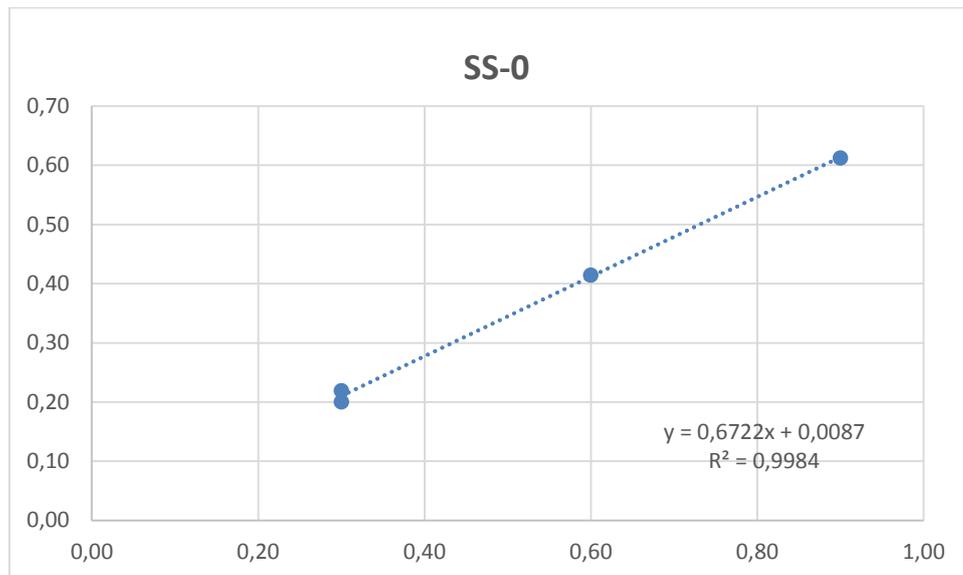


Figura C1. 8: Ajuste sobre los resultados de las probetas SS-0. Datos en MPa.

Arena gruesa (CS):

Anexo C. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

CS-0		
Probeta	σ	τ
	MPa	MPa
CS-0-CT3-1	0.30	0.25
CS-0-CT3-2	0.30	0.24
CS-0-CT6-1	0.60	0.43
CS-0-CT6-2	0.60	0.44
CS-0-CT9-1	0.90	0.70
CS-0-CT9-2	0.90	0.73

Tabla C1 6: Resultados del ensayo de corte directo de las probetas CS-0.

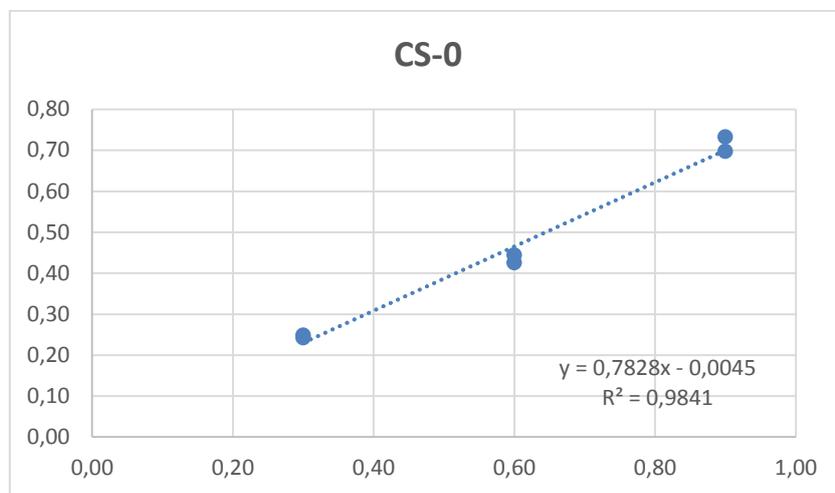


Figura C1. 9: Ajuste sobre los resultados de las probetas CS-0. Datos en MPa.

Mezcla 1 (M1):

M1-0		
Probeta	σ	τ
	MPa	MPa
M1-0-CT3-1	0.30	0.20
M1-0-CT6-1	0.60	0.37
M1-0-CT9-1	0.90	0.58

Tabla C1 7: Resultados del ensayo de corte directo de las probetas M1-0.

Anexo C. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

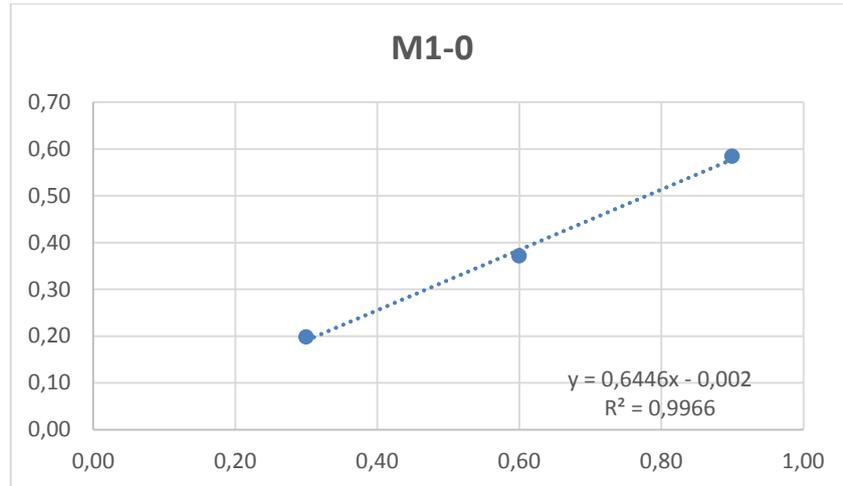


Figura C1. 10: Ajuste sobre los resultados de las probetas M1-0. Datos en MPa.

Mezcla 2 (M2):

	M2-0	
Probeta	σ	τ
	MPa	MPa
M2-0-CT3-1	0.30	0.22
M2-0-CT3-2	0.30	0.21
M2-0-CT6-1	0.60	0.40
M2-0-CT6-2	0.60	0.42
M2-0-CT9-1	0.90	0.62
M2-0-CT9-2	0.90	0.66

Tabla C1 8: Resultados del ensayo de corte directo de las probetas M2-0.

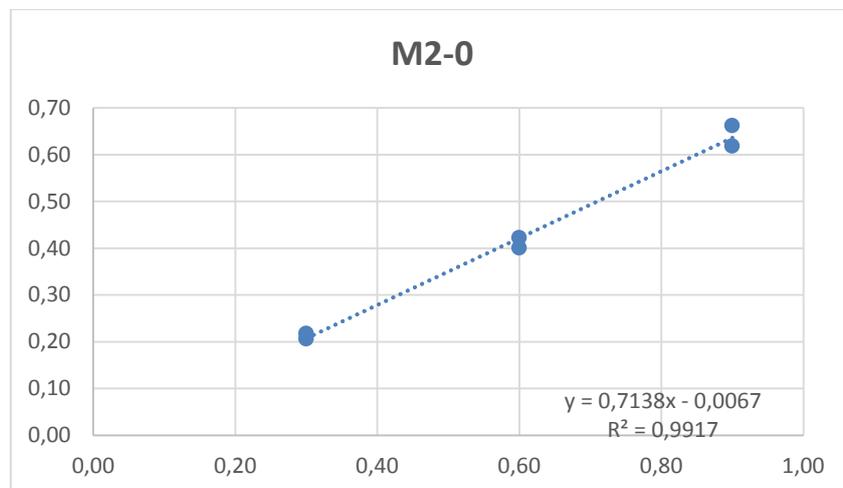


Figura C1. 11: Ajuste sobre los resultados de las probetas M2-0. Datos en MPa.

Anexo C. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

Resultados de los ensayos sobre probetas con bacterias. Concentraciones baja: SS-1 (1.10^7 cfu/ml) y alta: SS-2 (3.10^8 cfu/ml).

Arena fina (SS):

SS-2		
Probeta	σ	τ
	MPa	MPa
SS-2-CT3-1	0.30	0.20
SS-2-CT3-2	0.30	0.28
SS-2-CT6-1	0.60	0.36
SS-2-CT9-1	0.90	0.71
SS-2-CT9-2	0.90	0.52

Tabla C1 9: Resultados de las probetas SS-2.

SS-1		
Probeta	σ	τ
	MPa	MPa
SS-1-CT3-1	0.30	0.20
SS-1-CT6-1	0.60	0.40
SS-1-CT9-1	0.90	0.62

Tabla C1 10: Resultados de las probetas SS-1.

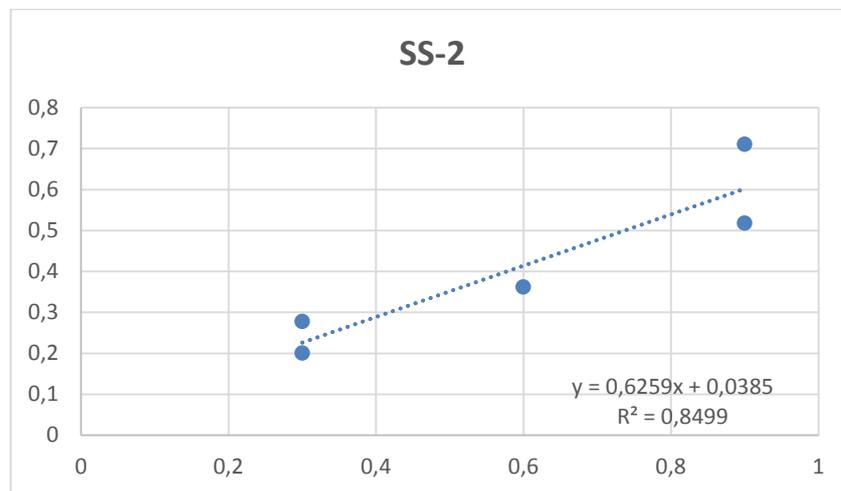


Figura C1. 12: Ajuste sobre los resultados de las probetas SS-2. Datos en MPa.

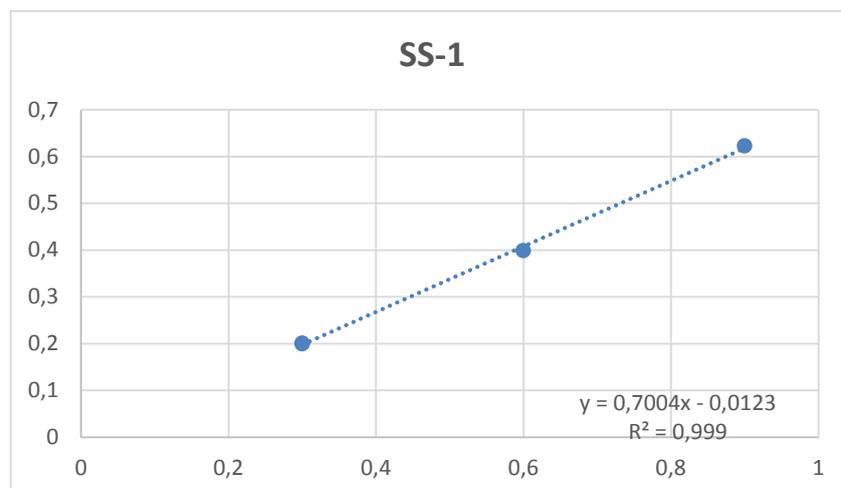


Figura C1. 13: Ajuste sobre los resultados de las probetas SS-1. Datos en MPa.

Anexo C. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

Arena gruesa (CS):

	CS-2	
Probeta	σ	τ
	MPa	MPa
CS-2-CT3-1	0.30	0.19
CS-2-CT3-2	0.30	0.19
CS-2-CT6-1	0.60	0.44
CS-2-CT6-2	0.60	0.39
CS-2-CT9-1	0.90	0.60

Tabla C1 11: Resultados de las probetas CS-2.

	CS-1	
Probeta	σ	τ
	MPa	MPa
CS-1-CT3-1	0.30	0.27
CS-1-CT3-2	0.30	0.22
CS-1-CT6-1	0.60	0.46
CS-1-CT6-2	0.60	0.45
CS-1-CT9-1	0.90	0.64
CS-1-CT9-2	0.90	0.60

Tabla C1 12: Resultados de las probetas CS-1.

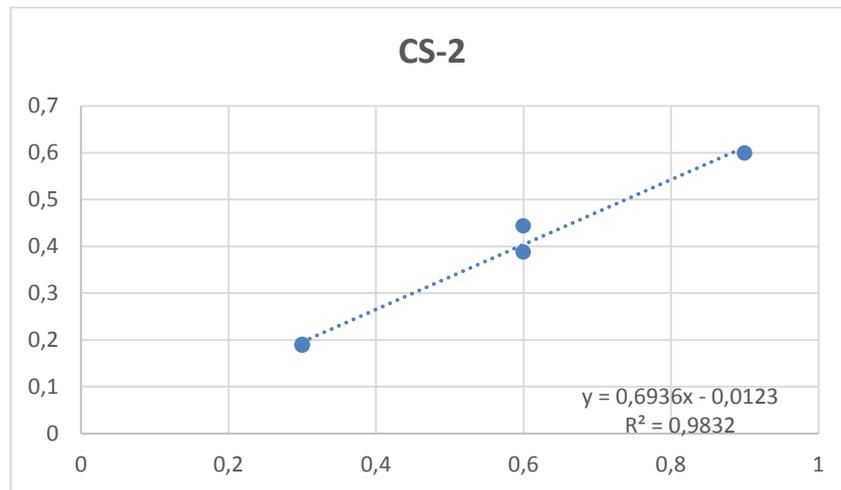


Figura C1. 14: Ajuste sobre los resultados de las probetas CS-2. Datos en MPa.

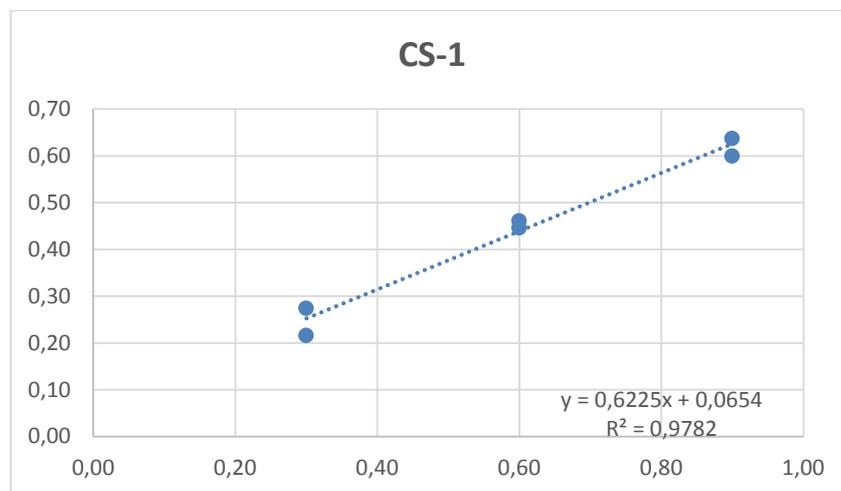


Figura C1. 15: Ajuste sobre los resultados de las probetas CS-1. Datos en MPa.

Mezcla 1 (M1):

M1-2		
Probeta	σ	τ
	MPa	MPa
M1-2-CT3-1	0.30	0.20
M1-2-CT6-1	0.60	0.38
M1-2-CT9-1	0.90	0.56

Tabla C1 13: Resultados de las probetas M1-2.

M1-1		
Probeta	σ	τ
	MPa	MPa
M1-1-CT3-1	0.30	0.19
M1-1-CT6-1	0.60	0.34
M1-1-CT9-1	0.90	0.54

Tabla C1 14: Resultados de las probetas M1-1.

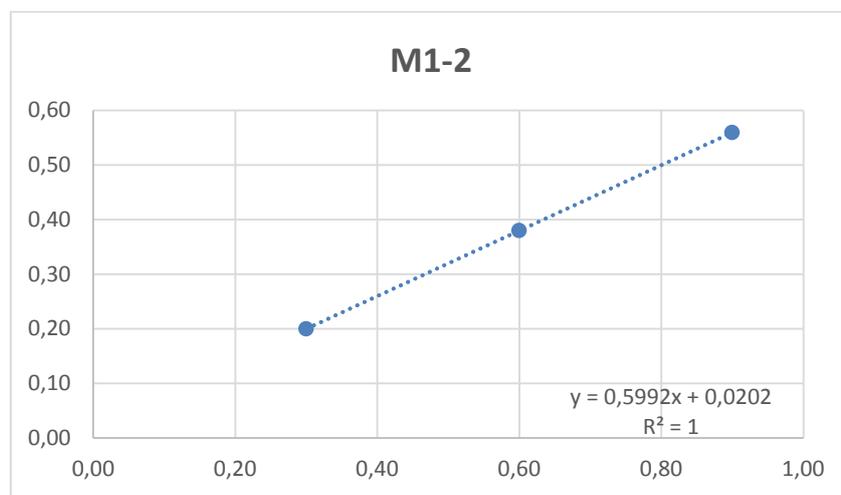


Figura C1. 16: Ajuste sobre los resultados de las probetas M1-2. Datos en MPa.

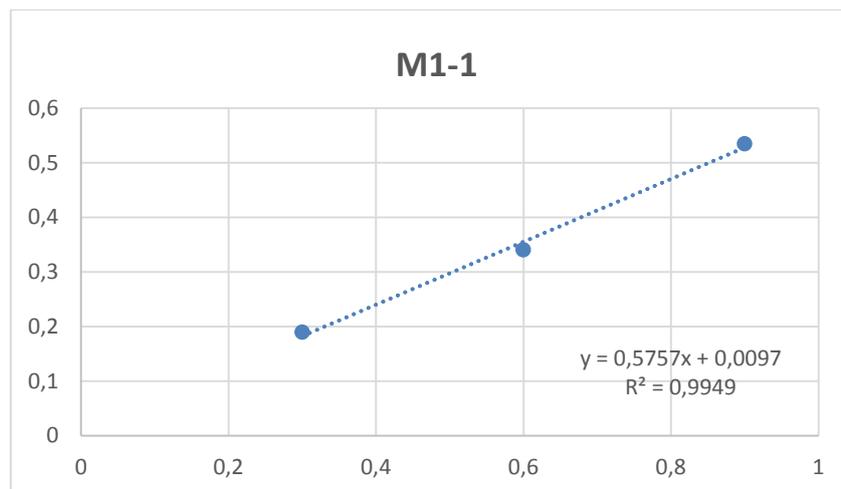


Figura C1. 17: Ajuste sobre los resultados de las probetas M1-1. Datos en MPa.

Mezcla 2 (M2):

Anexo C. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

De los ensayos sobre las muestras de mezcla 2 con concentración alta tan solo se obtuvieron dos puntos. Los resultados son válidos, por lo cual han sido incluidos en las tablas, aunque su ajuste no fue estadísticamente representativo.

M2-2		
Probeta	σ	τ
	MPa	Mpa
M2-2-CT3-1	0.30	0.18
M2-2-CT6-1	0.60	0.44

Tabla C1 15: Resultados de las probetas M2-2.

M2-1		
Probeta	σ	τ
	MPa	MPa
M2-1-CT3-1	0.30	0.20
M2-1-CT6-1	0.60	0.40
M2-1-CT9-1	0.90	0.60

Tabla C1 16: Resultados de las probetas M2-1.

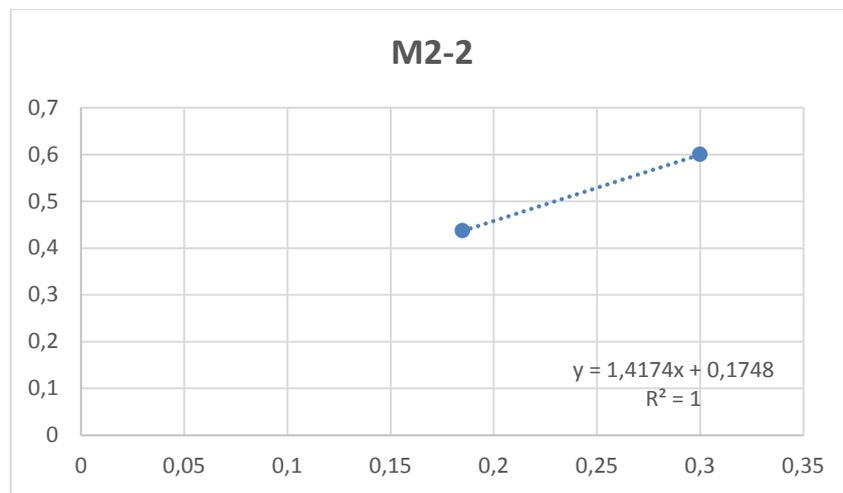


Figura C1. 18: Ajuste sobre los resultados de las probetas M2-2. Datos en MPa.

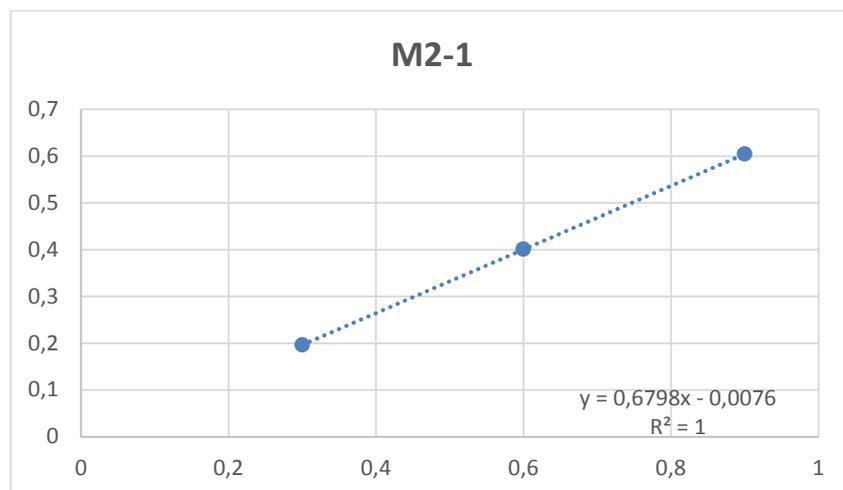


Figura C1. 19: Ajuste sobre los resultados de las probetas M2-1. Datos en MPa.

C.4.1. Tabla resumen.

A partir de los resultados obtenidos, en la Tabla C1 17 se indican el tipo de concentración de bacterias más recomendable para cada suelo en función de la propiedad mecánica y la recomendación general según el tipo de suelo.

Suelo	Propiedad	Baja concentración (1e7 cfu/ml)	Alta concentración (1e9 cfu/ml)*	Elección (cfu/ml)
SS	Cohesión		X	Alta (1e9cfu/m)
	Fricción	X	(X)	
CS	Cohesión	X		Baja (1e7cfu/m)
	Fricción	(X)	X	
M1	Cohesión		X	Alta (1e9cfu/m)
	Fricción	(X)	X	
M2	Cohesión		X	Alta (1e9cfu/m)
	Fricción		X	

Tabla C1 17: Selección de la concentración de la adición bacteriana en función de la propiedad a mejorar.

*La alta concentración de bacterias es 3,3e8 cfu/ml para los parámetros de cohesión y ángulo de fricción interno.

Si ambas casillas (baja y alta concentración) están marcadas, X, la diferencia entre la elección de una y otra es irrelevante.

Si ambas casillas (baja y alta concentración) están marcadas pero una tiene el símbolo (X), ésta será la de menor preferencia detrás de la marcada con X aunque ambas soluciones se consideran adecuadas.

Última columna: elección generalmente favorable para cada tipo de suelo.

Anexo C. MICP en probeta cúbica de suelo para la determinación de su resistencia a corte directo

Anexo D. Precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP) en probeta de suelo con el objetivo de determinar su capacidad portante

D.1. Introducción.

El objetivo de este ensayo fue validar la tecnología de bioconsolidación desarrollada en un molde de mayores dimensiones que los anteriores: 30cm x 55cm x 43cm (alto x largo x ancho). Para validar la tecnología se llevaron a cabo dos pruebas de comparación sobre dos terrenos distintos.

En primer lugar, se definieron los volúmenes y tipos de suelo a estudiar, así como las características de éstos. En segundo lugar, se realizaron los cálculos de cantidades de bacterias necesarias y riegos enriquecidos. También la distribución en el tiempo de estos últimos con el fin de conocer los volúmenes totales. A continuación, se definió el procedimiento de bioestabilización propiamente dicho, determinando paso a paso las actividades a llevar a cabo. Posteriormente, se ejecutó la bioestabilización y se procedió con la implementación del control del proceso de secado mediante ultrasonidos. Una vez curados los demostradores, se procedió a realizar una prueba asimilable a la placa de carga para determinar la capacidad portante de las diferentes probetas. Finalmente se presentaron los resultados obtenidos.

El presente anexo contiene tres apartados generales en los que se explican los materiales que se utilizaron para realizar el ensayo, el procedimiento de producción/ensayo y los resultados que se obtuvieron mediante los ensayos de placa de carga.

D.2. Materiales.

A continuación se enumeran y describen los materiales y los productos (y sus especificaciones) utilizados en los experimentos detallados en el presente anexo.

D.2.1. Suelos a estabilizar.

Los suelos a estabilizar se eligieron en base a los resultados obtenidos en el anexo B2 para las probetas cilíndricas compactadas. Aquellos que mostraron los mejores resultados en el ensayo de compresión (tabla B2 15) fueron los seleccionados: arena fina (SS) y mezcla 2 (45 % de arena fina, 15 % de arena gruesa, y 40 % de arcilla + limo). Su distribución granulométrica puede observarse en la Figura D1. 1.

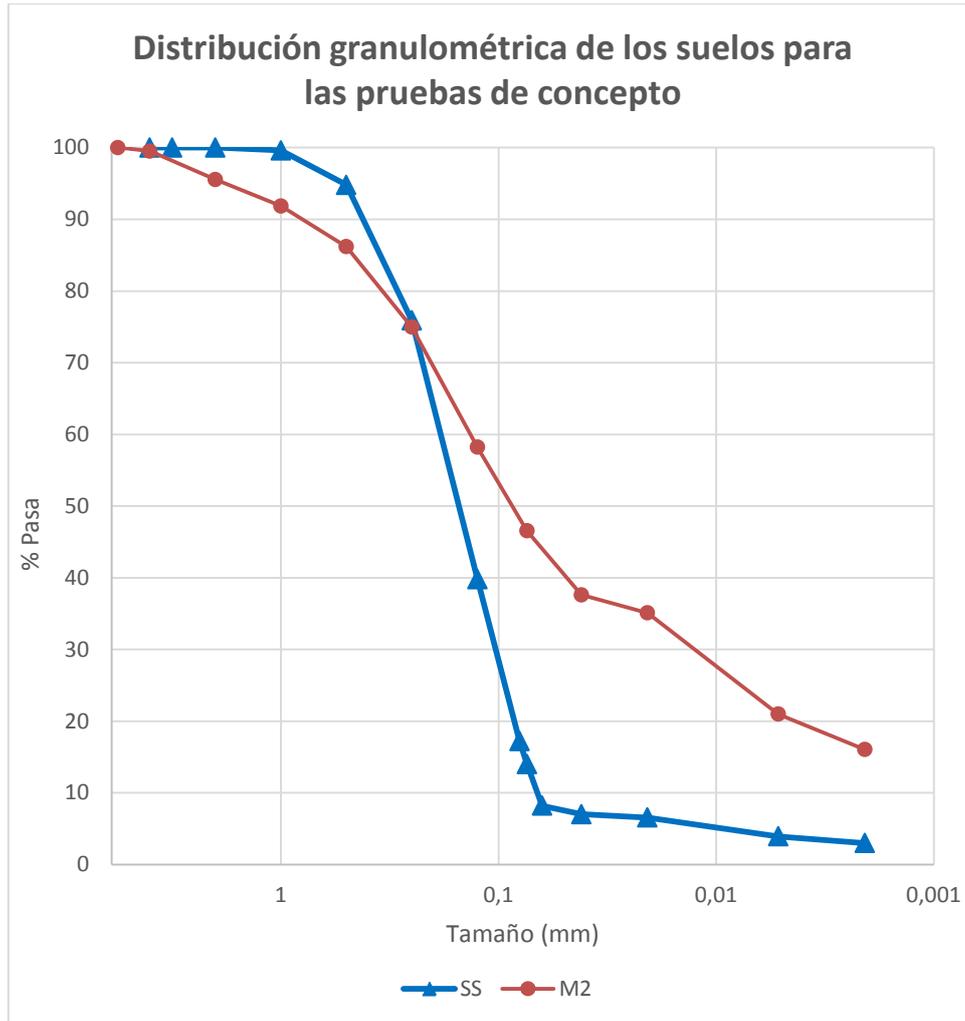


Figura D1. 1: Distribución granulométrica de los suelos empleados en este ensayo.

D.2.2. Materiales para preparar la solución de cementación.

Los materiales necesarios para preparar la solución de cementación están descritos en Anexo A, apartados A.2.1.: A.2.1.1. (Urea) y A.2.1.2. (Cloruro de calcio di-hidrato).

D.2.3. Materiales para preparar medio Bang.

Los materiales necesarios para preparar el medio Bang están descritos en Anexo A, apartados A1.2.2.: A1.2.2.1. (Tryptona); A1.2.2.2. (Extracto de levadura); A1.2.2.3. (Tricina); A1.2.2.4. (Sulfato de amonio) y A1.2.2.5. (Ácido l-glutámico).

D.2.4. Preparación de suspensión de *Sporosarcina pasteurii*.

El procedimiento de preparación de la suspensión de *Sporosarcina Pasteurii* está descrito en Anexo A, apartado A.3.1.1. (Preparación de suspensiones de *Sporosarcina pasteurii*).

D.3. Procedimiento experimental.

D.3.1. Metodología y producción de las probetas.

Las probetas se prepararon en moldes de 30cm x 55cm x 43cm (alto x largo x ancho) y se llenaron hasta 25 cm de profundidad. Esto correspondía a un volumen de 59,125dm³. Para controlar el volumen de relleno se puso una marca de profundidad a alcanzar en los moldes. En la Figura D1. 2 pueden verse los moldes a utilizar, así como el sistema para al control del volumen de llenado.



Figura D1. 2a: Sistema del control del volumen de relleno; D1. 2b: Moldes utilizados en este ensayo.

Se prepararon 4 moldes en total con 2 probetas de cada tipo de suelo (M2 y SS). Para cada tipo de suelo se elaboraron una primera probeta compactada y con el tratamiento y una segunda probeta de control simplemente compactada para poder comparar.

Cada uno de los moldes se numeró por trazabilidad y se pesó antes del llenado con suelo.

Las dimensiones del demostrador permitirían realizar un ensayo asimilable al de placa de carga aplicando presión (posteriormente se explica el proceso de forma detallada) sobre el terreno mediante una placa metálica de 20cm de arista.

Los moldes se llenaron con los suelos siete días antes de iniciar el proceso de estabilización y/o compactación a fin de mantener constante el contenido de humedad del terreno antes de proceder con su tratamiento.

Las probetas de control se dispusieron al lado de las bioestabilizadas y se ejecutaron simultáneamente (ver Figura D1. 3) para que las condiciones ambientales fueran idénticas.



Figura D1. 3a: Probetas de SS; D1. 3b: Probetas de M2.

D.3.2. Determinación del volumen de inoculación.

Al igual que el ensayo realizado en el anexo B2. (MICP en probeta cilíndrica compactada) el correspondiente volumen de bacterias o agua corriente fue calculado mediante la ecuación B2. 3.

Para determinar la humedad real del suelo, W_o , el día anterior a la inoculación de bacterias se recogió una muestra de 150 g del suelo a tratar y se secó en el horno durante 24h a 105°C. La humedad real del suelo se calculó conforme la ecuación utilizada en el anexo B2.: B2. 1.

A partir del volumen a incorporar, se definió la concentración bacteriana a emplear a partir de la limitación de suministro de 1L de suspensión de *Sporosarcina Pasteurii* con una concentración esperada de 1×10^9 cfu/ml. Es decir, 1L de suspensión *Sporosarcina Pasteurii* se diluyó en medio Bang hasta alcanzar el volumen óptimo para cada suelo ($V_{opt}^{M2} = 16,42\%$ y $V_{opt}^{SS} = 9,26\%$):

$$V_{opt}^{M2} = 1L + V_{Bang}^{M2} \text{ y } V_{opt}^{SS} = 1L + V_{Bang}^{SS} \quad (\text{Ec. D1. 1})$$

La suspensión de bacterias para M2 llegó en 2 envases de 500 ml con concentraciones $9,5E+0,8$ cfu/ml el primero y $7,2E+0,8$ cfu/ml el segundo. Después de aplicar la ecuación D1. 1, la concentración de la suspensión bacteriana que se incorporó en el suelo resultó de $1,3E+0,8$ cfu/ml.

La suspensión de bacterias para SS llegó en 2 envases de 500 ml con concentraciones $5,8E+0,8$ cfu/ml el primero y $6,5E+0,8$ cfu/ml el segundo. Después de aplicar la ecuación D1. 1, la concentración de la suspensión bacteriana que se incorporó en el suelo resultó de $1,9E+0,8$ cfu/ml.

Anexo D. MICP en probeta de suelo con el objetivo de determinar su capacidad portante

La concentración de bacterias calculada se añadió a las probetas a estabilizar y posteriormente, se compactaron las probetas de control.

Pasadas 4h de la inoculación de las bacterias se realizó una aportación de medio Bang de 473 ml por probeta para favorecer el crecimiento y estabilización de las bacterias.

Transcurridas 24h de la primera inoculación de bacterias se realizó una segunda aportación de 1 L con una concentración teórica de 1×10^9 cfu/ml.

D.3.3. Determinación de los riegos enriquecidos.

El tratamiento completo para las probetas se eligió en base a los resultados obtenidos en el ensayo realizado en el anexo B1: (MICP en probetas cilíndricas de suelo sin compactación). Para cada tipo de suelo se eligieron los parámetros que mostraban una mayor influencia (Tabla D1 1).

Suelo	Concentración de bacterias	Ritmo de tratamiento	Concentración de calcio	Segunda inoculación de bacterias
SS	Alta	Rápido	Baja	Beneficioso
M2	Alta	Rápido	Indiferente	Indiferente

Tabla D1 1: Tratamiento óptimo para cada tipo de suelo.

Los riegos enriquecidos se realizaban con urea (20 g/l) y cloruro de calcio (3,675 g/l) diluidos en medio Bang durante 5 días de 10 a 18h en intervalos de 2 horas. Tabla D1 2 muestra las horas a las que se realizaron los riegos enriquecidos:

Tipo de suelo	Condiciones		Intervalos de tratamiento/Volumen a añadir, ml					Volumen, ml	
	[CaCl ₂] g/L	[Urea] g/L	10.00 h	12.00h	14.00h	16.00h	18.00h	1 día	5 días
SS	3.675	20	473	473	473	473	473	2365	11825
M2	3.675	20	473	473	473	473	473	2365	11825

Tabla D1 2: Condiciones e intervalos de tratamiento para cada tipo de suelo.

Tras la finalización de los riegos enriquecidos se procedió a pesar diariamente las probetas para controlar la evolución de su masa hasta alcanzar la humedad óptima. El método de pesar los moldes puede verse en la Figura D1. 4



Figura D1. 4: Método de pesar los moldes.

D.3.4. Compactación de las probetas.

Las cuatro probetas fueron compactadas con la energía indicada en el método Proctor Modificado (B2.3.1. Ensayos previos. Determinación de la humedad óptima de compactación) antes o después de los riegos enriquecidos.

En las muestras de arena fina, la compactación se realizó dividiendo la superficie superior de la probeta en 6 regiones (con un área de compactación por región de 20cm x 20cm). El mecanismo utilizado se puede observar en la Figura D1. 5a. La compactación se realizó mediante 11 impactos consecutivos en cada una de las 6 regiones siguiendo un patrón circular y en dos tandas, con un total de 22 impactos por región y 132 por probeta. El pistón utilizado constaba de una masa de 752.1 g y era liberado desde una altura de 90 cm.

Para el suelo de M2, en lugar de dividir la superficie en diferentes regiones, se optó por compactar con 132 impactos (mismo número que en el caso anterior) del mismo pistón desde una altura de 90 cm en el centro (algunos de los impactos se realizaron en los laterales de la placa para mantener su equilibrio) de una placa de acero de 42cm x 53cm x 6cm. Estos valores se calcularon a partir de la ecuación utilizada en Anexo B2: ecuación B2. 2.

El procedimiento de producción de cada tipo de probeta se describe a continuación.



Figura D1. 5a: Sistema para la compactación de los suelos de arena; 5b: Sistema para la compactación de los suelos de mezcla 2.

D.3.4.1. Probeta de M2 bioestabilizada.

Al inicio del proceso se pesó el molde vacío; esto permitiría calcular la humedad que contenía la probeta durante el proceso de secado y saber el momento apropiado para compactarla. A continuación se preparó la mezcla del suelo M2 y se relleno el molde hasta la marca de profundidad colocada a tal efecto. Posteriormente se determinó la humedad real del suelo y se pesó el conjunto formado por el molde y el suelo, lo que permitiría saber la masa a estabilizar de éste último. Se añadió la suspensión bacteriana, diluida en el medio Bang con la cantidad calculada anteriormente de 13,10 L (Figura D1. 6a) conforme la ecuación B2.3. El suelo se mezcló manualmente hasta conseguir una distribución uniforme y posteriormente se niveló (Figura D1. 6b).



Figura D1. 6a: Suspensión bacteriana diluida en medio Bang y el posterior riego en 4 horas; 6b: El suelo de M2 mezclado con la suspensión bacteriana diluida en medio Bang.

Anexo D. MICP en probeta de suelo con el objetivo de determinar su capacidad portante

Posteriormente se retiró una muestra de 150 g para determinar la humedad (B2.3.1. paso 3). Pasadas 4 horas se añadió el medio Bang a la superficie sin mezclar. Pasadas otras 24 horas se realizó una segunda aportación de bacterias. Tras 72h de la inoculación inicial, se inició el tratamiento (de 5 días de duración) aportando urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang (Tabla D1 2).

Una vez finalizado el tratamiento, se dejó secar el suelo pesándolo diariamente para controlar la evolución de su masa hasta alcanzar la humedad óptima de compactación. En ese momento se recogió otra pequeña muestra de 150 g para verificar experimentalmente la humedad a la que se procedió con la compactación. Tras aproximadamente 4 días la humedad que contenía la probeta alcanzaba la humedad óptima de compactación y por tanto se procedió a compactarla conforme a los valores calculados a partir de la ecuación B2. 2. La probeta se compactó mediante una placa de acero de 42cm x 53cm x 6cm. Entre la placa de compactación y el suelo se colocó otra placa con dimensiones 20x20x1,5 cm (Figura D1. 7a). El motivo de colocar la segunda placa respondía a dos objetivos: en primer lugar evitaría que la superficie del suelo fuera no uniforme (debido a los agujeros que tiene la placa de mayores dimensiones). En segundo lugar facilitaría la realización de los ensayos posteriores.

Con el objetivo de avanzar el proceso de secado se calentó la parte superior de la probeta con un foco de 500W durante un día (Figura D1. 7b). Transcurridos dos días de descanso, se colocó de nuevo la misma fuente de calor durante un día. Finalmente, se dejó secar la muestra realizando mediciones de velocidad de transmisión con ultrasonidos para determinar cuándo se alcanzaba el equilibrio higrométrico, lo que supondría el final del proceso de bioestabilización.



Figura D1. 7a: Placa de compactación de los suelos M2; 7b: Foco halógeno de 500W instalado.

D.3.4.2. Probeta de M2 de control.

De forma análoga al caso anterior, en primer lugar se pesó el molde vacío. Se preparó la mezcla del suelo M2 y se rellenó el molde hasta la marca de profundidad. Posteriormente se determinó la humedad real del suelo y se pesó el conjunto formado por el molde y el suelo. Se

añadió agua corriente con la cantidad calculada anteriormente de 13,26 L conforme la ecuación B2.3. El suelo también se mezcló manualmente hasta conseguir una distribución uniforme y posteriormente se niveló. Se retiró una muestra de 150 g para determinar la humedad (B2.3.1. paso 3). La probeta se compactó igual que la de M2 bioestabilizada. En la Figura D1. 8 se puede observar la placa de compactación colocada encima del suelo antes de la compactación. Con el objetivo de avanzar el proceso de secado se colocó el mismo foco por encima de la probeta durante un día. Finalmente, se realizó el control de evolución de la humedad con ultrasonidos.



Figura D1. 8: Placa de compactación colocada encima de M2 de control antes de la compactación.

D.3.4.3. Probeta de SS bioestabilizada.

Igual que en los casos anteriores, en primer lugar se pesó el molde vacío y se rellenó el molde hasta la marca de profundidad. Se determinó la humedad real del suelo (mediante una muestra de 150 gramos) y se pesaron el molde y el suelo. Posteriormente, se añadió la suspensión bacteriana, diluida en medio Bang con la cantidad calculada anteriormente de 7,41 L conforme la ecuación B2.3. El suelo se mezcló manualmente y se retiró una segunda muestra de 150 g. En la Figura D1. 9 puede verse una instantánea durante el proceso de mezclado del suelo con la suspensión bacteriana.

Pasadas 4 horas se añadió el medio Bang en la superficie sin mezclar. 24 horas después se realizó una segunda aportación de bacterias y tras 72h de la inoculación inicial, se inició el tratamiento aportando urea y cloruro cálcico diluidos en medio Bang (Tabla D1 2).

Una vez finalizado el tratamiento, se pesó diariamente el suelo para controlar la evolución de su masa hasta alcanzar la humedad óptima de compactación. En ese momento se recogió otra pequeña muestra de 150 g para contrastar experimentalmente la humedad a la que se procedió con la compactación y se calculó la masa correspondiente a la humedad óptima de compactación.

El suelo se compactó dividiendo la superficie en 6 regiones consecutivas con una placa con dimensiones 20x20x1,5 cm. Con el objetivo de avanzar el proceso de secado se colocó un foco por encima de la probeta durante un día. Posteriormente se dejó descansar el suelo durante

dos días y se volvió a colocar de nuevo durante un día. Finalmente, se realizó el control de la evolución de la humedad con ultrasonidos.



Figura D1. 9: Instantánea durante el proceso de mezclado de arena fina bioestabilizada.

D.3.4.4. Probeta de SS de control.

El procedimiento de preparación de la probeta de control de SS fue análogo al de la M2.

En este caso, se añadieron 7,58 L de agua corriente, calculada previamente conforme a la ecuación B2. 3.

La probeta se compactó de igual modo que la probeta de SS bioestabilizada. Finalmente, se realizó el control de evolución de la humedad con ultrasonidos.

La humedad real de compactación de las probetas de M2 y SS bioestabilizadas y su comparativa con la humedad óptima de compactación puede verse en la Tabla D1 3.

	M2	SS
Humedad real (%)	17,47	11
Humedad óptima (%)	16,42	9,26

Tabla D1 3: Humedades real y óptima de compactación de las probetas bioestabilizadas.

D.3.5. Control de la evolución de la humedad mediante ultrasonidos.

El control de evolución de la humedad se realizó mediante ultrasonidos mientras se aceleraba el proceso de secado instalando un foco halógeno de 500W durante dos períodos de 24h separados dos días entre ellos.

La primera lectura de la probeta M2 bioestabilizada se realizó después del primer secado, resultando un tiempo de transmisión de 238,1 μ s, que ascendió a 253,3 μ s antes de proceder al segundo secado, después del cual en la siguiente lectura de ultrasonidos se obtuvo un tiempo de transmisión de 260,3 μ s que subió a 267,9 μ s el día del ensayo.

La probeta M2 de control se dejó secar un día antes de poder realizar cualquier medición satisfactoria mediante ultrasonidos. La evolución del tiempo de transmisión puede verse en la Figura D1. 10, con variaciones inferiores al 1% en el tramo final, cuando se dio por finalizado el proceso de equilibrio higrométrico, que no requirió de ningún secado adicional.

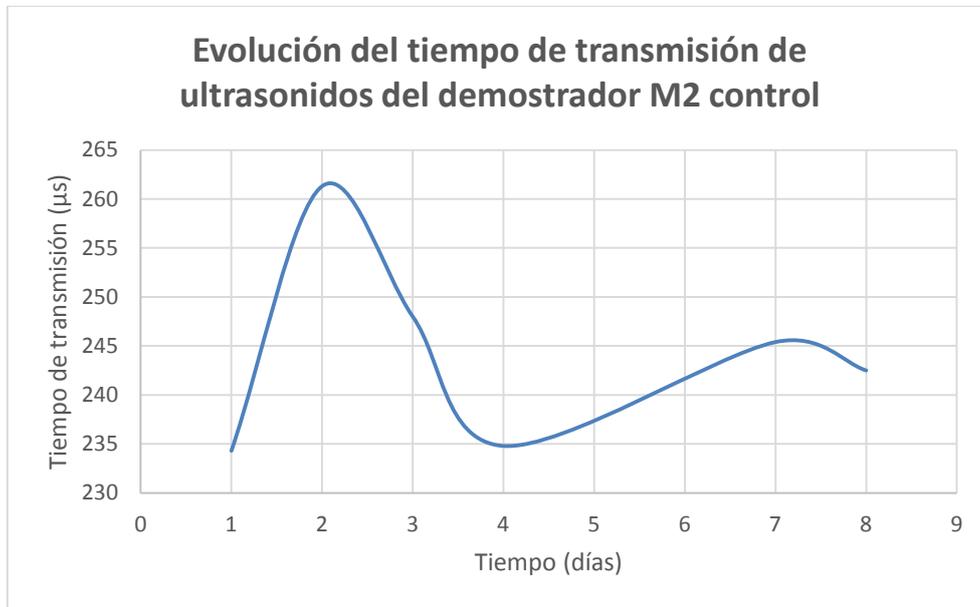


Figura D1. 10: Evolución de la velocidad de trasmisión para el demostrador M2 de control.

La probeta SS bioestabilizada se dejó secar (4 días) antes de realizar cualquier medición del tiempo de transmisión de ultrasonidos. El tiempo de transmisión después del primer secado fue de 265,8 μ s, tras un segundo proceso de secado de (2 días) el tiempo ascendió a 292,6 μ s hasta alcanzar los 242,7 μ s el día del ensayo.

A la probeta SS de control no se le aplicó ningún proceso de secado forzoso más allá del secado en condiciones ambientales interiores. El hecho de que el tiempo de transmisión aumentara durante un episodio de lluvia indicó claramente que el suelo había alcanzado el equilibrio higrométrico (Figura D1. 11).

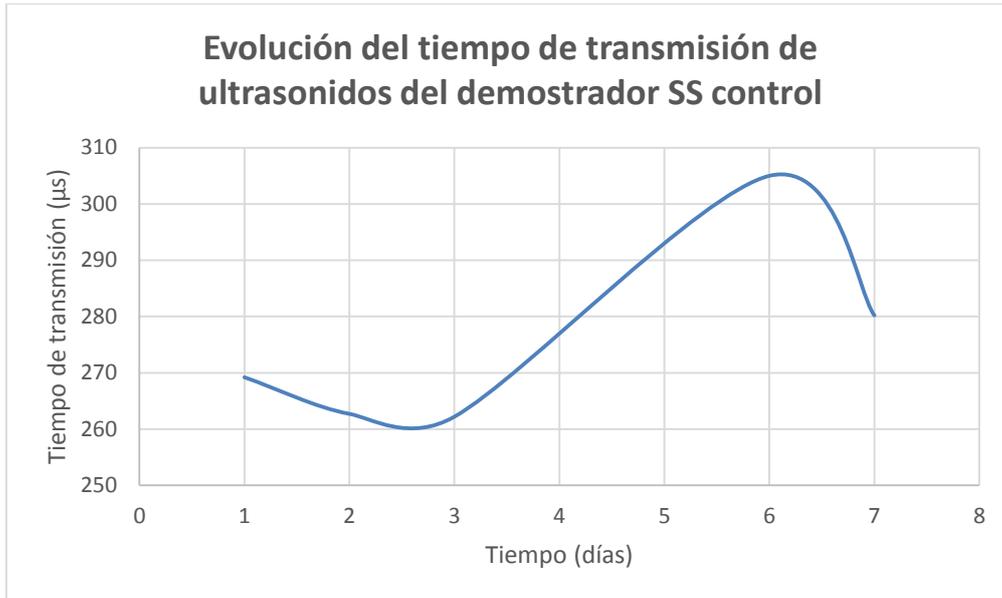


Figura D1. 11: Evolución de la velocidad de trasmisión para el demostrador SS de control.

D.3.6. Pruebas de carga.

El ensayo que se utilizó para determinar la capacidad resistente de las diferentes probetas de forma comparativa fue un ensayo de compresión-desplazamiento basado en el ensayo de placa de carga.

La configuración del ensayo consistió en disponer un gato hidráulico manual entre una viga de reacción y la placa de aplicación de la carga de 200mm x 200mm de superficie, centrada en la superficie de la probeta. Entre el gato y la viga de reacción se instaló una célula de carga de 10 kN que permitió registrar de forma continuada, la fuerza aplicada. Del mismo modo, se instalaron dos LVDTs soportados externamente al sistema de ensayo y conectados al sistema de adquisición para la lectura continua (5Hz) de la deflexión de la placa en dos puntos opuestos. El sistema del ensayo puede verse en la Figura D1. 12.

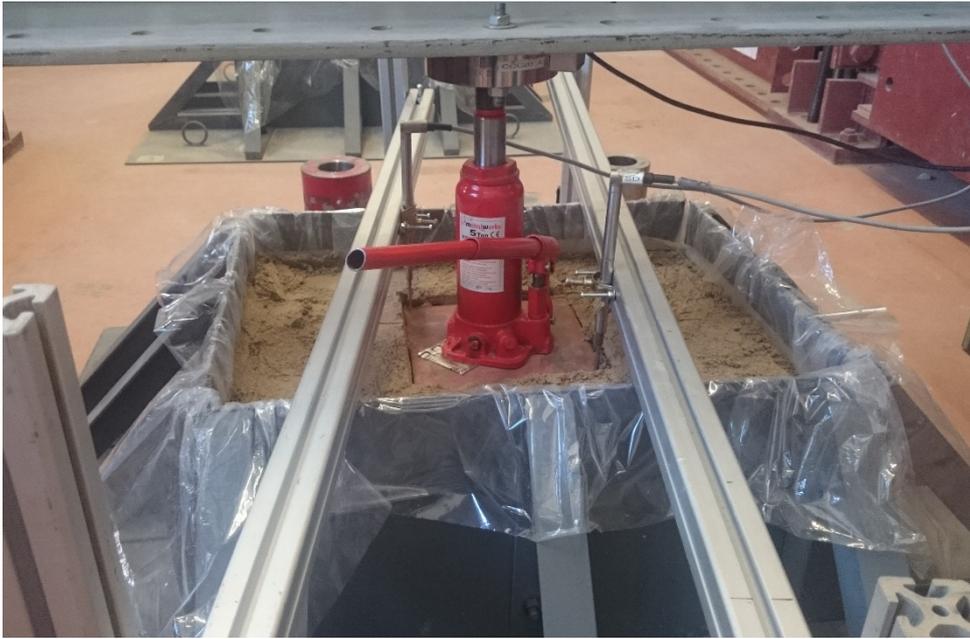


Figura D1. 12: Sistema del ensayo.

Para realizar el ensayo se procedió siguiendo los siguientes 4 pasos de forma consecutiva:

- En primer lugar se aplicó una carga de 7 kPa (que equivale a una fuerza de 280 N para la placa usada) con el objetivo de producir el asentamiento inicial, que se descartó el procesado de datos una vez estabilizadas las lecturas de desplazamiento.
- Posteriormente, sin descargar la carga de asiento, se aplicó presión mediante escalones uniformes de 50kPa (equivalentes a incrementos de carga de 2kN). Después de cada escalón y antes del siguiente, se dejaron estabilizar las lecturas de desplazamiento hasta una ratio inferior a 0,25mm/min durante tres minutos consecutivos.
- La carga máxima aplicada fue la correspondiente a la capacidad del gato hidráulico (50kN) o la que produjera una deformación de 25mm (el rango de los LVDTs era de 25mm y en caso de no alcanzar la carga máxima se buscó agotar el rango de los sensores de desplazamiento). Una vez conseguida la carga máxima, permaneció aplicada hasta que el ratio de deformación estuvo por debajo de 0,025mm/min durante tres minutos consecutivos.
- A continuación, se descargó el sistema hasta los 7kPa iniciales y se mantuvo aplicada la fuerza hasta que el ratio de deformación estuviera por debajo de 0,025mm/min durante tres minutos consecutivos.

Al finalizar cada ensayo, se tomaron dos muestras de cada tipo de suelo para comprobar la humedad existente durante el ensayo en la zona de apoyo de la placa.

D.4. Resultados obtenidos.

A continuación se presentan los gráficos tensión – desplazamiento obtenidos del ensayo de placa de carga para las 4 probetas.

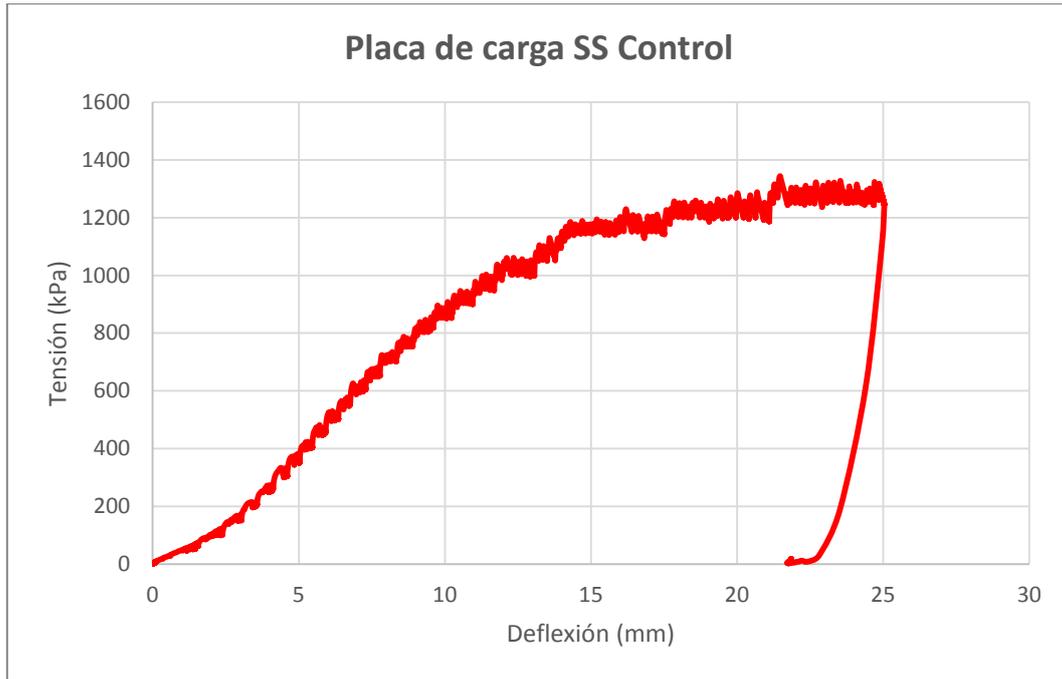


Figura D1. 13: Gráfico de tensión-deflexión obtenido en el ensayo de palca de carga sobre un suelo tipo SS control.

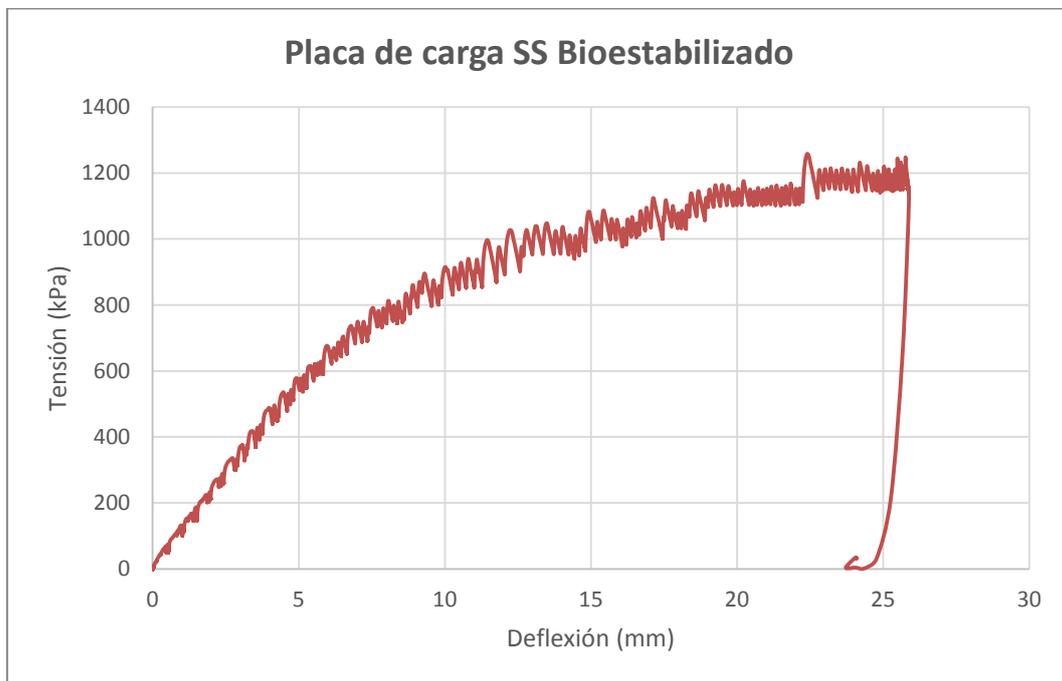


Figura D1. 14: Gráfico de tensión-deflexión obtenido en el ensayo de palca de carga sobre un suelo tipo SS Bioestabilizado.

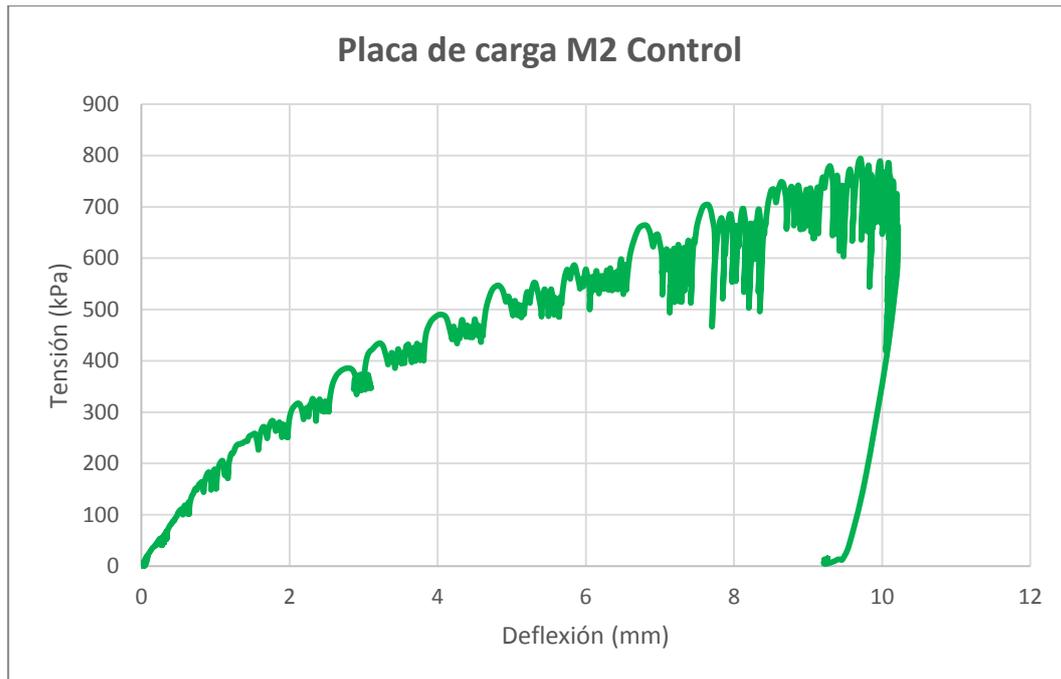


Figura D1. 15: Gráfico de tensión-deflexión obtenido en el ensayo de palca de carga sobre un suelo tipo M2 control.

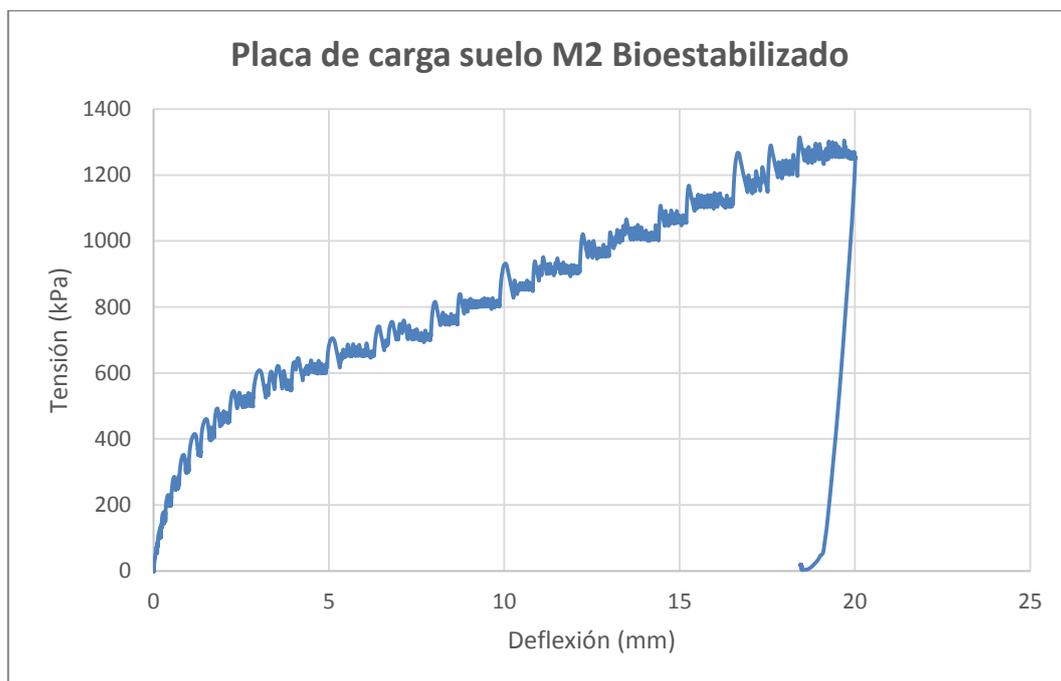


Figura D1. 16: Gráfico de tensión-deflexión obtenido en el ensayo de palca de carga sobre un suelo tipo M2 bioestabilizado.

En la Tabla D1 4 puede verse cuantificado el efecto de rigidización del suelo SS durante el inicio del ensayo de placa de carga a través del valor del módulo de balasto.

Anexo D. MICP en probeta de suelo con el objetivo de determinar su capacidad portante

Suelo	Coefficiente de balasto (kPa/mm) para diferentes rangos de deflexión				
	<i>0-5 mm</i>	<i>5-10 mm</i>	<i>10-15 mm</i>	<i>15-20 mm</i>	<i>20-25 mm</i>
<i>M2</i>	99,5	54,1	---	---	---
<i>M2 bioestabilizado</i>	138,9	52,4	25,1	36,0	---
<i>SS</i>	73,1	101,8	57,5	24,7	4,9
<i>SS bioestabilizado</i>	110,8	72,3	28,7	14,7	4,8

Tabla D1 4: Evolución del coeficiente de balasto a lo largo del ensayo de placa de carga.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias (MICP)

E.1. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas cilíndricas compactadas y tratadas con MICP.

E.1.1 Introducción.

El objetivo de este ensayo fue estudiar cómo los diferentes tipos de compactación (antes o después de los riegos enriquecidos realizados) influyen a la permeabilidad de los 4 tipos de suelo (SS, CS, M1 y M2).

Para conseguir este objetivo, en primer lugar se realizaron unos ensayos previos para la determinación de la humedad óptima de compactación de los suelos sin bioestabilizar.

Posteriormente se implementaron probetas bioestabilizadas, a las que se incorporó el proceso de compactación antes o después de los riegos enriquecidos.

Por último se analizaron la permeabilidad y porosidad de las probetas compactadas que validarían el efecto de los diferentes tipos de compactación sobre la resistencia a compresión.

El presente anexo contiene tres apartados generales en los que se explican los materiales que se utilizaron para realizar el ensayo, el procedimiento de producción/ensayo y los resultados que se obtuvieron mediante las pruebas de permeabilidad y porosidad de las probetas compactadas.

E.1.2 Materiales.

En este ensayo se utilizaron los materiales ya descritos en el anexo B, apartado B1.2. (Materiales).

E.1.3 Procedimiento experimental.

Las probetas cilíndricas se crearon utilizando el mismo procedimiento que en el Anexo B2. Dicho proceso, de forma resumida consistía en:

(B2.3.1.) Ensayos previos. Determinación de la humedad óptima de compactación.

En éste ensayo se obtuvo la humedad óptima de compactación para cada tipo de suelo siguiendo las normas del ensayo Proctor Modificado (UNE 103-501-94).

(B2.3.2.) Metodología y producción de las probetas.

Al igual que en el ensayo realizado en el anexo B2, en este también se fabricaron tres tipos de probetas para cada tipo de suelo (SS, CS, M1 y M2):

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

- Probetas de control compactadas (C_XX_Y).
- Probetas compactadas antes de iniciar los riegos enriquecidos (B_XX_Y).
- Probetas compactadas después de realizar los riegos enriquecidos (A_XX_Y).

Aclaración: A/B/C_XX_Y

A/B/C: A = Después. B = Antes. C = Control.

XX: Tipo de suelo (SS, CS, M1 o M2).

Y = Número de probetas (1 o 2).

Para cada tipo de suelo (4 diferentes) se implementaron dos probetas de cada uno de los 3 tipos anteriores (con un total de 24 probetas). El listado completo de las probetas fabricadas se puede ver en la Tabla E1 1.

Suelo	Tipo de probeta	Repetición	Nombre de la probeta
SS	Control	1	C_SS_1
		2	C_SS_2
	Compactada antes de los riegos enriquecidos	1	B_SS_1
		2	B_SS_2
	Compactada después de los riegos enriquecidos	1	A_SS_1
		2	A_SS_2
CS	Control	1	C_CS_1
		2	C_CS_2
	Compactada antes de los riegos enriquecidos	1	B_CS_1
		2	B_CS_2
	Compactada después de los riegos enriquecidos	1	A_CS_1
		2	A_CS_2
M1	Control	1	C_M1_1
		2	C_M1_2
	Compactada antes de los riegos enriquecidos	1	B_M1_1
		2	B_M1_2
	Compactada después de los riegos enriquecidos	1	A_M1_1
		2	A_M1_2
M2	Control	1	C_M2_1
		2	C_M2_2
	Compactada antes de los riegos enriquecidos	1	B_M2_1
		2	B_M2_2
	Compactada después de los riegos enriquecidos	1	A_M2_1
		2	A_M2_2

Tabla E1 1: Listado de las probetas fabricadas en este ensayo.

(B2.3.3.) Determinación del volumen de inoculación.

La humedad real del suelo se calculó un día antes del inicio de los ensayos, recogiendo y secando una muestra de 150 g (B2.3.1. paso 3). A continuación se calculó la cantidad de bacterias que se debía aportar para cada tipo de suelo (ecuación B2. 3.) y posteriormente, se añadió con la concentración correspondiente (tabla B2 3).

(B2.3.4.) Determinación de los riegos enriquecidos.

Los riegos enriquecidos se realizaron con urea (20 g/L) y cloruro de calcio (3,675g/L o 36,75g/L en función del tipo de suelo) diluidos en medio Bang. El tratamiento duró 5 días de 10 a 18h con periodos entre tratamientos de 2 o 4 horas (tabla B2 4).

(B2.3.5.) Compactación de las probetas.

Todas las probetas fueron compactadas conforme el método Proctor Modificado antes o después de realizar los riegos enriquecidos. El procedimiento de producción de cada tipo de probeta está descrito en el Anexo B2, apartado B2.3.5.: B2.3.5.1. (Probetas de control); B2.3.5.2. (Probetas compactadas antes de iniciar los riegos enriquecidos) y B2.3.5.3. (Probetas compactadas después de iniciar los riego enriquecidos). Después del tratamiento, los cilindros se dejaron secar durante una semana.

E.1.3.1. Determinación de la porosidad y la permeabilidad de las probetas cilíndricas.

Éste ensayo busca aplicar la ley de Darcy, que describe el flujo de fluidos en estado estacionario y en medios porosos. Para medir la porosidad de las probetas cilíndricas de suelo, se utilizó un permeámetro de carga constante modificado. En el extremo superior de la probeta se colocó un cilindro vacío que se rellenó con agua. Posteriormente, el agua se hizo circular a lo largo del suelo dentro de la probeta cilíndrica. Durante la prueba se grabó el tiempo que transcurría desde el inicio del fluido hasta alcanzar el fondo del suelo. Finalmente, se calculó la porosidad del suelo mediante la Ec. E1. 1 y se determinó su permeabilidad en función del tiempo transcurrido.

E.1.3.1.1. Permeámetro de carga constante modificado.

El permeámetro de carga constante modificado se elaboró mediante un cilindro vacío que se unió en el extremo superior de la probeta de suelo. Ambos cilindros se acoplaron de forma que se impidiese la salida del agua a través de la unión. Con el objetivo de poder medir la columna y ver la trayectoria del agua en diferentes puntos, se añadió una escala de 15 cm a cada cilindro (puesto que todos los cilindros tenían la misma altura). El permeámetro modificado se puede observar en la Figura E1. 1.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP



Figura E1. 1: Permeámetro modificado.

E.1.3.1.2. Procedimiento del ensayo.

- En primer lugar, el permeámetro modificado se colocó en un soporte vertical.
- A continuación se colocó un nivel encima de los cilindros con el objetivo de garantizar la verticalidad de éstos y dotar de exactitud a las medidas (Figura E1. 2).



Figura E1. 2: El permeámetro modificado en el soporte vertical.

Posteriormente, se diluyó un tinte de color azul en el agua para hacerla visible. El cilindro vacío se rellenó con 100ml de la mezcla y se dejó circular a lo largo del suelo. Una vez iniciada la absorción de agua en del suelo, se filmó el proceso en las dos probetas. También se registraba el tiempo recorrido entre cada cm de la escala (de h_1 a h_2 ; de h_2 a h_3 ; etc.) hasta que el fluido llegara al fondo de la probeta (Figura E1. 3). El ensayo se daba por terminado cuando el agua empezaba a salir por la malla de inferior.

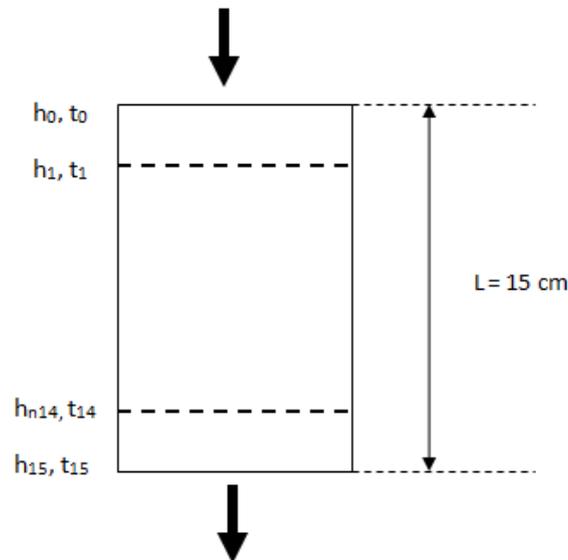


Figura E1. 3: Altura de la probeta (L), dividida en 1 cm.

E.1.4 Cálculo de los resultados obtenidos.

A partir de los resultados obtenidos se determinaron la permeabilidad y la porosidad de cada tipo de suelo (SS, CS, M1 y M2).

- La permeabilidad del suelo se determinó en función de la trayectoria del fluido desplazado en el suelo, del tiempo y en el decremento de altura del nivel del agua en el cilindro superior.
- Finalmente, la porosidad del suelo se determinó conforme la ecuación:

$$P = \frac{V_{A.D.}}{V_S} \quad (\text{Ec. E1. 1})$$

Donde:

P = porosidad.

$V_{A.D.}$ = volumen del agua desplazada en el suelo (cm^3). Éste volumen se calculó a partir de la diferencia en la altura del nivel del agua en el primer cilindro:

$$V_{a.d.} = \pi * r^2 * (h_{inicial} - h_{final}) \quad (\text{Ec. E1. 2})$$

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

V_s = volumen total del suelo (cm^3):

$$V_s = \pi * r^2 * h_{\text{probeta de suelo}} \quad (\text{Ec. E1. 3})$$

E.1.4.1. Permeabilidad de los 4 tipos de suelo.

A continuación se presentan los resultados para la permeabilidad de cada tipo de suelo, obtenidos a partir de la trayectoria del fluido desplazado. Éste método fue aplicado para la arena fina y la arena gruesa debido a que los cambios en su humedad eran visibles. En los casos de la M1 y M2 los cambios en su humedad no eran visibles, por lo que su permeabilidad fue determinada a partir del decrecimiento de la altura del nivel del fluido en el cilindro superior.

Arena fina (SS):

- La mayoría de las probetas requirieron menos de 5 minutos para completar la prueba tal y como se muestra en la siguiente tabla:
 - Trayectoria del fluido (SS):

<i>H (cm)</i>	<i>Tiempo (s)</i>					
	<i>C_SS_1</i>	<i>C_SS_2</i>	<i>B_SS_1</i>	<i>B_SS_2</i>	<i>A_SS_1</i>	<i>A_SS_2</i>
0	0	0	0	0	0	0
1	20	15	4	4	6	3
2	35	24	8	9	11	8
3	50	33	16	13	20	16
4	60	53	23	20	38	28
5	90	83	35	34	63	44
6	140	105	57	50	96	63
7	180	113	80	79	125	86
8	210	130	116	111	158	108
9	240	158	149	144	186	132
10	320	190	177	163	243	160
11	340	118	209	190	258	188
12	400	240	250	232	296	214
13	480	300	282	248	323	234
14	540	360	313	334	345	263
15	610	420	318	378	368	295

Tabla E1 2: Trayectoria del fluido desplazado en el suelo, SS.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

- Decrecimiento de la altura del nivel del agua en el cilindro superior (SS):

	Altura del nivel del agua (cm)					
Tiempo (s)	C_SS_1	C_SS_2	B_SS_1	B_SS_2	A_SS_1	A_SS_2
0	6,0	6,0	6,0	6,0	5,0	5,0
30	5,6	5,4	5,1	5,5	4,0	3,9
60	5,3	4,5	4,7	4,7	3,7	3,5
90	4,9	4,3	4,4	4,3	3,3	3,0
120	4,5	4,1	4,2	4,0	3,1	2,7
150	4,3	3,9	3,8	3,7	2,8	2,3
180	4,2	3,6	3,6	3,5	2,5	2,0
210	4,1	3,5	3,4	3,2	2,3	1,6
240	4,0	3,4	3,2	3,1	2,0	1,3
270	3,8	3,2	3,0	2,9	1,9	1,1
300	3,7	3,1	2,9	2,7	1,7	0,8
330	3,5		2,7	2,5	1,5	
360	3,3		2,5	2,4	1,4	
390	3,2		2,4	2,3	1,3	
420	3,1		2,3	2,2		
450	2,9		2,2			

Tabla E1 3: Altura del nivel del agua en el cilindro superior, SS.

Arena gruesa (CS):

- Las probetas de arena gruesa requirieron menos de 3 minutos para completar la prueba, debido al mayor tamaño de las partículas comparadas con las de la arena fina.
 - Trayectoria de fluido (CS):

	Tiempo (s)					
H (cm)	C_CS_1	C_CS_2	B_CS_1	B_CS_2	A_CS_1	A_CS_2
0	0	0	0	0	0	0
1	16	5	2	2	3	1
2	27	13	3	3	4	3
3	35	25	7	5	5	6
4	47	33	11	8	9	13
5	57	47	15	12	17	20
6	65	65	21	17	26	28
7	73	74	30	23	35	40
8	81	82	39	32	44	52
9	90	90	52	42	53	63
10	104	103	61	50	62	75
11	120	120	72	63	74	89
12	134	135	85	70	86	101
13	150	150	101	83	99	112
14	165	162	119	98	112	128
15	180	178	137	114	125	135

Tabla E1 4: Trayectoria del fluido desplazado en el suelo, CS.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

- Decrecimiento de la altura del nivel del agua en el cilindro superior (CS):

	Altura del nivel del agua (cm)					
Tiempo (s)	C_CS_1	C_CS_2	B_CS_1	B_CS_2	A_CS_1	A_CS_2
0	6,0	6,0	6,0	6,0	5,0	5,0
30	5,0	5,7	4,5	4,30	3,6	3,6
60	4,5	5,3	3,7	3,45	1,8	2,7
90	4,1	4,9	3,2	2,90	1,7	2,1
120	3,1	4,5	2,7	2,30	0,6	1,5
150	3,4	4,1	2,4	1,80		1,0
180			2,1	1,50		
210			1,7	1,0		
240			1,4	0,6		
270			1,1			
300			0,7			

Tabla E1 5: Altura del nivel del agua en el cilindro superior, CS.

Mezcla 1 (M1):

- El ensayo de decrecimiento de la altura del nivel del agua en la mezcla 1 no se pudo realizar por completo. Después de un largo período de tiempo, el suelo se sobresaturó y el agua no alcanzó el fondo de la probeta. Por ésta razón, el tiempo máximo de la prueba se limitó a 210 minutos.
- Decrecimiento de la altura del nivel del agua en el cilindro superior (M1):

	Altura del nivel del agua (cm) / Test					
Tiempo (min)	C_M1_1	C_M1_2	B_M1_1	B_M1_2	A_M1_1	A_M1_2
0	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3
10	6,3	6,3	6,2	6,2	4,5	4,6
20	6,1	6,2	6,2	6,2	4,5	4,6
30	6	6,1	6,1	6,2	4,4	4,5
40	6	6,1	6,1	6,1	4,4	4,5
50	6	6,1	6	6,1	4,4	4,4
60	6	6	6	6	4,3	4,4
70	6	6	6	6	4,3	4,3
80	5,9	6	6	5,9	4,3	4,3
90	5,8	5,9	5,9	5,9	4,2	4,2
120	5,7	5,8	5,9	5,9	4,2	4,2
150	5,6	5,7	5,9	5,8	4,1	4,1
180	5,5	5,6	5,8	5,7	4	4,1
210	5,5	5,5	5,8	5,6	3,9	4

Tabla E1 6: Altura del nivel del agua en el cilindro superior, M1.

Mezcla 2 (M2):

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

- La prueba de altura del nivel del agua en la M2 tampoco se pudo realizar por completo, debido a la sobresaturación del suelo. Por ésta razón, el tiempo máximo de la prueba también se limitó a 210 minutos.
 - Decrecimiento de la altura del nivel del agua en el cilindro superior (M2):

<i>Altura del nivel del agua (cm) / Test</i>						
<i>Tiempo (min)</i>	<i>C_M2_1</i>	<i>C_M2_2</i>	<i>B_M2_1</i>	<i>B_M2_2</i>	<i>A_M2_1</i>	<i>A_M2_2</i>
0	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3
10	6,2	6,2	4,6	5,1	6,1	6
20	6,2	6,2	4,4	4,9	5,9	5,9
30	6,2	6,2	4,3	4,4	5,8	5,8
40	6,2	6,2	4,3	4,3	5,7	5,8
50	6,2	6,2	4,2	4,3	5,7	5,7
60	6,1	6,2	4,2	4,2	5,6	5,7
70	6,1	6,1	4,2	4,2	5,6	5,6
80	6,1	6,1	4,1	4,2	5,6	5,6
90	6,1	6,1	4,1	4,2	5,5	5,5
120	6,1	6,1	4	4,1	5,5	5,5
150	6	6,1	4	4	5,4	5,5
180	6	6	3,9	4	5,4	5,4
210	6	6	3,9	3,9	5,3	5,4

Tabla E1 7: Altura del nivel del agua en el cilindro superior, M2.

E.1.4.2. Porosidad de los cuatro tipos de suelo.

A continuación se presentan las tablas de los resultados obtenidos para la porosidad de cada tipo de suelo a partir del volumen del fluido desplazado.

Arena fina (SS):

<i>Test</i>	<i>Altura del suelo, L</i>	<i>∅ cilindro, m</i>	<i>INICIO H del agua, m</i>	<i>FINAL H del agua, m</i>	<i>V_{a.d.}, m³</i>	<i>V_s, m³</i>	<i>Porosidad</i>
C_SS_1	0,15	0,05	0,06	0,029	4,93E-05	2,39E-04	0,21
C_SS_2	0,15	0,05	0,06	0,031	4,61E-05	2,39E-04	0,19
B_SS_1	0,15	0,05	0,06	0,024	5,81E-05	2,39E-04	0,24
B_SS_2	0,15	0,05	0,06	0,023	5,96E-05	2,39E-04	0,25
A_SS_1	0,13	0,05	0,05	0,016	5,41E-05	2,07E-04	0,26
A_SS_2	0,14	0,05	0,05	0,011	6,28E-05	2,23E-04	0,28

Tabla E1 8: Porosidad de la arena fina.

Arena gruesa (CS):

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

			INICIO	FINAL			
Test	Altura del suelo, L	\varnothing cilindro, m	H del agua, m	H del agua, m	$V_{a.d.}, m^3$	V_s, m^3	Porosidad
C_CS_1	0,15	0,05	0,06	0,03	4,29E-05	2,39E-04	0,11
C_CS_2	0,15	0,05	0,06	0,02	4,93E-05	2,39E-04	0,14
B_CS_1	0,15	0,05	0,06	0,03	5,57E-05	2,39E-04	0,23
B_CS_2	0,15	0,05	0,06	0,02	6,04E-05	2,39E-04	0,25
A_CS_1	0,14	0,05	0,05	0,01	6,20E-05	2,23E-04	0,28
A_CS_2	0,14	0,05	0,05	0,01	6,04E-05	2,23E-04	0,27

Tabla E1 9: Porosidad de la arena gruesa.

Mezcla 1 (M1):

			INICIO	FINAL			
Test	Altura del suelo, L	\varnothing cilindro, m	H del agua, m	H del agua, m	$V_{a.d.}, m^3$	V_s, m^3	Porosidad
C_M1_1	0,15	0,05	0,06	0,04	5,70E-05	3,56E-04	0,16
C_M1_2	0,13	0,05	0,06	0,04	4,28E-05	3,09E-04	0,14
B_M1_1	0,15	0,05	0,06	0,03	4,61E-05	2,39E-04	0,19
B_M1_2	0,15	0,05	0,06	0,03	6,77E-05	3,56E-04	0,19
A_M1_1	0,15	0,05	0,06	0,03	7,84E-05	3,56E-04	0,22
A_M1_2	0,15	0,05	0,06	0,03	4,93E-05	2,39E-04	0,20

Tabla E1 10: Porosidad de la mezcla 1.

Mezcla 2 (M2):

			INICIO	FINAL			
Test	Altura del suelo, L	\varnothing cilindro, m	H del agua, m	H del agua, m	$V_{a.d.}, m^3$	V_s, m^3	Porosidad
C_M2_1	0,15	0,05	0,06	0,03	4,29E-05	2,39E-04	0,18
C_M2_2	0,14	0,05	0,06	0,03	3,50E-05	2,23E-04	0,16
B_M2_1	0,15	0,05	0,06	0,04	3,66E-05	2,39E-04	0,15
B_M2_2	0,15	0,05	0,06	0,03	3,66E-05	2,39E-04	0,15
A_M2_1	0,14	0,05	0,06	0,03	3,18E-05	2,23E-04	0,14
A_M2_2	0,14	0,05	0,06	0,04	3,18E-05	2,23E-04	0,14

Tabla E1 11: Porosidad de la mezcla 2.

E.2. Determinación de la permeabilidad de las probetas de suelo compactadas y tratadas con MICP.

E.2.1 Introducción.

Los objetivos de éste ensayo fueron estudiar la influencia del proceso de compactación sobre la permeabilidad de suelos de arena fina y suelos de arcilla con arena en corte transversal y caracterizar la distribución del carbonato de calcio generado durante el tratamiento. Para conseguir estos objetivos, sobre la parte superior de la probeta y cerca de las caras se eligieron 10 puntos, en los que se situó un gotero. Finalmente, la evolución de la penetración del líquido aplicado (agua con tinte azul) fue registrada mediante fotos y videos.

El presente anexo contiene tres apartados generales en los que se explican los materiales que se utilizaron para realizar el ensayo, el procedimiento de producción/ensayo y los resultados que se obtuvieron mediante las pruebas de permeabilidad en sección transversal de las probetas compactadas.

E.2.2 Materiales.

En el presente anexo se utilizaron los materiales ya descritos en el Anexo D, apartado D.2. (Materiales).

E.2.3 Procedimiento experimental.

En este ensayo se utilizaron las mismas 4 probetas que en el anexo D. Éstas probetas se produjeron en moldes con mayores dimensiones de 30cm x 55cm x 43cm (alto x largo x ancho) y se llenaron hasta 25 cm. Su proceso de producción, en forma resumida consistía en:

1. (D.3.1.) Metodología y producción de las probetas.

Se prepararon 2 probetas de cada tipo (M2 y SS): Una probeta de cada tipo de suelo se creó con el objetivo de aplicarle el tratamiento mientras que las otras se crearon como muestras de control.

2. (D.3.2.) Determinación del volumen de inoculación.

La humedad real del suelo se calculó un día antes del inicio de los ensayos, recogiendo y secando una muestra de 150 g (B2.3.1. paso 3). A continuación se calculó la cantidad de bacterias que se debía aportar para cada tipo de suelo (ecuación B2. 3.) y se definió la concentración bacteriana a emplear conforme la ecuación D1. 1. La concentración de bacterias calculada se añadió a las probetas a estabilizar y finalmente, se compactaron las probetas de control.

3. (D.3.3.) Determinación de los riegos enriquecidos.

Para cada tipo de suelo se eligieron los parámetros que mostraban una mayor influencia (tabla D1. 1). Los riegos enriquecidos se realizaban con un volumen de 473 ml de urea (20 g/l) y cloruro de calcio (3,675 g/l) diluidos en medio Bang durante 5 días de 10 a 18h en intervalos de 2 horas (tabla D1. 2). Tras la finalización de los riegos enriquecidos se procedió a pesar diariamente las probetas para controlar la evolución de su masa hasta alcanzar la humedad óptima.

4. (D.3.4.) Compactación de las probetas.

Las cuatro probetas fueron compactadas con la energía indicada en el método Proctor Modificado (B2.3.1. Ensayos previos. Determinación de la humedad óptima de compactación) antes o después de los riegos enriquecidos (la probeta de SS bioestabilizada se compactó antes y la probeta M2 bioestabilizada se compactó después de los riegos enriquecidos). El procedimiento de producción de cada tipo de probeta está descrito en el Anexo D, apartado D.3.4.: D.3.4.1. (Probeta de M2 bioestabilizada); D.3.4.2. (Probeta de M2 de control); D.3.4.3. (Probeta de SS bioestabilizada) y D.3.4.4. (Probeta de SS de control).

5. (D.3.5.) Control de la evolución de la humedad mediante ultrasonidos.

El control de evolución de la humedad se realizó mediante ultrasonidos mientras se aceleraba el proceso de secado mediante el calor proveniente de un foco halógeno de 500W durante dos períodos de 24h intercalando 48h de reposo. El proceso completo del control de la evolución de la humedad mediante ultrasonidos está descrito en el Anexo D, apartado D.3.5.

6. (D.3.6.) Pruebas de carga.

Este ensayo se utilizó para determinar la capacidad resistente de las diferentes probetas de forma comparativa. La configuración del ensayo consistió en disponer un gato hidráulico manual entre una viga de reacción y la placa de aplicación de la carga de 200mm x 200mm de superficie, centrada en la superficie de la probeta. Entre el gato y la viga de reacción se instaló una célula de carga de 10 kN que permitió registrar de forma continuada, la fuerza aplicada. El procedimiento completo de la realización del ensayo placa de carga está descrito en el Anexo D, apartado D.3.6. Los resultados obtenidos del ensayo están mostrados en el apartado D.4. (Resultados obtenidos).

E.2.3.1. Determinación de la permeabilidad de las probetas de suelo.

El ensayo buscó analizar la influencia del proceso de compactación sobre la permeabilidad de las probetas de suelo (bioestabilizadas y realizadas sin tratamiento biológico) y caracterizar la distribución del carbonato de calcio generado durante el tratamiento. Realizar el ensayo en corte transversal permitiría ver el libre flujo del líquido dentro del suelo y posteriormente, se podrían calcular la velocidad, el avance y la intensidad del flujo. Consecuentemente, el resultado mostraría la distribución del carbonato cálcico generado durante el tratamiento, teniendo en cuenta la densidad obtenida durante la compactación.

E.2.3.1.1. Configuración del ensayo.

Para realizar este ensayo se utilizaron dos goteros de 20 gotas por ml, con tubo de plástico de 150 cm y llave reguladora. Los goteros se acoplaron a un recipiente de 12 L de capacidad donde se depositó el agua. Para que el flujo del líquido fuera visible, en el agua se diluyó un tinte de color azul. Posteriormente, el molde se desmontó y se separó de la probeta. El proceso se puede observar en la Figura E2 1.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP



Figura E2 1: El cubo con el agua, los goteros y la probeta desmoldada.

En éste experimento, para realizar las mediciones se utilizaron las caras laterales de las probetas, sin tener en cuenta las caras superior e inferior. Las superficies de mayor área se llamaron caras *A* y *C* y las de menor superficie: *B* y *D*. Sobre la parte superior de la probeta y cerca de las caras se eligieron 10 puntos (en las caras *A* y *C* se eligieron tres puntos por lado y a las caras *B* y *D*, se eligieron dos) donde se situaría el gotero. Ésta posición permitiría ver la dirección (axial y radial) y la profundidad del líquido en el suelo por los laterales. Los dos goteros se situaron en puntos opuestos (Figura E2 2). Posteriormente, se ajustó su flujo a una gota cada 4 segundos. Finalmente, la evolución de la penetración del líquido aplicado y el tiempo recorrido se registraron mediante fotos y videos.



Figura E2 2: Posición de los goteros en la probeta.

Para cada probeta se implementaron los 10 puntos, que se situaron a una distancia de 10 cm a partir de las esquinas y en las caras *A* y *C* (las de mayor superficie) se situó también una aproximadamente en el centro. Como consecuencia del ensayo de placa de carga, las 4 probetas tenían grietas y no fue posible posicionar todos los puntos en los lugares designados.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

El listado completo de las situación de los puntos y las distancias la las respectivas esquinas se pueden ver en la Tabla E2 1.

Suelo	Cara	Puntos	Distancia (cm)
M2 bioestabilizada	A	A1	7
		A2	23,5
		A3	13,5
	B	B1	10
		B2	23
	C	C1	10
		C2	25
		C3	15
	D	D1	10
		D2	23
M2 de control	A	A1	20
		A2	32,5
		A3	45
	B	B1	10
		B2	23
	C	C1	10
		C2	27,5
		C3	45
	D	D1	10
		D2	23
SS bioestabilizada	A	A1	10
		A2	27,5
		A3	45
	B	B1	10
		B2	23
	C	C1	10
		C2	27,5
		C3	45
	D	D1	10
		D2	23
SS de control	A	A1	10
		A2	27,5
		A3	36,5
	B	B1	18
		B2	23
	C	C1	10
		C2	27,5
		C3	45
	D	D1	10
		D2	23

Tabla E2 1: Tabla de los puntos seleccionados en las 4 probetas.

E.2.3.1.2. Probeta de M2 bioestabilizada.

El ensayo de la probeta de M2 bioestabilizada empezó 113 días tras la realización del ensayo de placa de carga. Después del desmoldado, las dimensiones de la probeta eran: 20cm x 55cm x 43cm (alto x largo x ancho). En la Figura E2 3 se puede observar la probeta y la ubicación de los puntos en la cara superior.



Figura E2 3: Probeta M2 bioestabilizada y posición de los puntos.

E.2.3.1.3. Probeta de M2 de control.

El ensayo de la probeta de M2 de control empezó 133 días tras la realización del ensayo de placa de carga. Después del desmoldado, las dimensiones de la probeta eran: 19cm x 55cm x 43cm (alto x largo x ancho). En la Figura E2 4 se puede observar la probeta y la ubicación de los puntos en la cara superior.



Figura E2 4: Probeta M2 control y posición de los puntos.

E.2.3.1.4. Probeta de SS bioestabilizada.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

El ensayo de la probeta de SS bioestabilizada empezó 137 días después de la realización del ensayo de placa de carga. Después del desmoldado, las dimensiones de la probeta eran: 20cm x 55cm x 43cm (alto x largo x ancho). En la Figura E2 5 se puede observar la probeta y la ubicación de los puntos en la cara superior.



Figura E2 5: Probeta SS bioestabilizada y posición de los puntos.

E.2.3.1.5. Probeta de M2 de control.

El ensayo de la probeta de SS de control empezó 140 días tras la realización del ensayo de placa de carga. Después del desmoldado, las dimensiones de la probeta eran: 20cm x 55cm x 43cm (alto x largo x ancho). En la Figura E2 6 se puede observar la probeta y la ubicación de los puntos en la cara superior.



Figura E2 6: Probeta SS control y posición de los puntos.

E.2.4 Resultados obtenidos.

A continuación se presentan de forma tabulada los resultados obtenidos mediante las pruebas y las mediciones realizadas. Los resultados se dividen en tres apartados diferenciados:

- Trayectoria del fluido en direcciones axial y radial.
- Avance del fluido.
- Intensidad del avance del fluido.

E2.4.1. Trayectoria del fluido en direcciones axial y radial.

La trayectoria del fluido se midió en las direcciones axial (en paralelo de la fuerza de compresión) y radial (perpendicular a la fuerza de compresión), mediante procesamiento con software de tratamiento de imagen. Medir las componentes axial y radial permitió conocer las velocidades del flujo en las dos direcciones, identificar la distribución del tratamiento y valorar el efecto del proceso de compactación. A continuación se presentan en tablas los resultados obtenidos para la permeabilidad de las cuatro probetas en los puntos seleccionados. También en la Figura E2 7 y Figura E2 8 se muestra un ejemplo del método de medición de la distancia:



Figura E2 7: La distancia en dirección axial y radial de la probeta M2 de control en el punto A1.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP



Figura E2 8: La distancia en dirección axial y radial tras 20 minutos en el mismo punto.

M2 bioestabilizada:

A1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
30	1,5	7
60	3	7,2
90	5,5	7,2
120	7,5	7,2
150	8,5	7,2
180	9,5	7,2
210	10	7,2

Tabla E2 2: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto A1.

A2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
30	1	4,5
60	1,5	4,7
90	2	5
120	2,5	5,3
150	3	5,5
180	3,5	5,7
210	4	6

Tabla E2 3: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto A2.

A3

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
30	5,5	5,5
60	6,8	7,5
90	7,8	8,8
120	8,4	9,7
150	8,6	10,5
180	8,9	10,7
210	9,3	10,7

Tabla E2 4: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto A3.

B1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
30	3	5,5
60	3,5	6
90	6,5	6,7
120	7	7
150	7,5	7,2
180	8	8
210	8,5	8,5

Tabla E2 5: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto B1.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

B2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
30	0	4
60	0	4,7
90	0,8	5
120	1,2	6
150	2,5	6,5
180	4,3	7,5
210	6	7,7

Tabla E2 6: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto B2.

C1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
30	1,3	5,2
60	2,5	5,5
90	2,5	5,7
120	3	6,1
150	3,5	6,3
180	3,8	6,5
210	4,5	6,7

Tabla E2 7: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto C1.

C2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
30	2	6
60	2,5	6,2
90	4	6,5
120	5,5	6,7
150	7	7
180	8	7,5
210	8	8

Tabla E2 8: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto C2.

C3

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
30	1,5	6,7
60	3,5	7,5
90	4,5	8
120	5	9
150	5,5	9,5
180	6	10
210	6,5	10,2

Tabla E2 9: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto C3.

D1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
30	0,5	9
60	0,8	10,5
90	1,5	12
120	2,5	13
150	2,8	14,2
180	3	15
210	3,5	15,7

Tabla E2 10: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto D1.

D2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
30	0	5
60	1,2	7
90	1,6	8
120	2,2	8,2
150	2,7	8,5
180	3,4	8,7
210	5,5	9

Tabla E2 11: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 bioestabilizada en el punto C3.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

M2 control:

A1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	1	3
30	2	4,5
45	4	5,5
60	6,1	5,9
75	6,4	6,2
90	7,3	7
105	8,2	7,2

Tabla E2 12: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto A1.

A2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	3	4,2
30	5	4,9
45	6,8	5,7
60	7,6	6,4
75	8,6	6,7
90	9,2	7
105	10	7,3

Tabla E2 13: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto A2.

A3

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	0	4,5
30	0	6
45	3,8	6,6
60	5	6,9
75	5,4	7,2
90	6,3	7,5
105	7,8	7,7

Tabla E2 14: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto A3.

B1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	0	4
30	2	5
45	3,7	5,6
60	5,5	6,9
75	7,2	7,1
90	9	7,3
105	9,8	7,7

Tabla E2 15: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto B1.

B2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	1	4
30	5	6,2
45	6,5	6,7
60	7	7,3
75	7,5	7,5
90	9	8,1
105	9,2	8,2

Tabla E2 16: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto B2.

C1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	0	3,1
30	1	4,5
45	2	5,1
60	3,2	5,6
75	4	6
90	5,1	6,5
105	6,3	7,1

Tabla E2 17: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto C1.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

C2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	0	3,6
30	2,5	5,3
45	4,2	5,8
60	6,5	6,6
75	8	7
90	9	7,3
105	10	7,6

Tabla E2 18: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto C2.

C3

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	0	5
30	0,5	6,7
45	2,4	7,5
60	4,2	8,3
75	4,9	8,4
90	5,8	8,6
105	6,6	8,7

Tabla E2 19: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto C3.

D1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	0	4
30	2,3	5,2
45	3,7	6,5
60	6,3	7,2
75	7,2	7,3
90	8,3	7,6
105	9,2	7,8

Tabla E2 20: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto D1.

D2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	0	4,6
30	3,2	6
45	4,8	6,5
60	6,2	7
75	7,5	7,2
90	9,3	7,5
105	10	8

Tabla E2 21: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta M2 control en el punto D2.

SS bioestabilizada:

A1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	2	1,9
30	3,6	4
45	4,2	4,4
60	5,3	5,6
75	6,2	6
90	6,4	6,2
105	7	6,7

Tabla E2 22: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto A1.

A2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	4,3	4
30	5	4,4
45	5,5	5
60	6	5,4
75	6,9	5,6
90	8,5	6
105	9,4	6,2

Tabla E2 23: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto A2.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

A3

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	3	3,5
30	5	4,4
45	6,7	5
60	7	5,5
75	7,2	6
90	7,4	6,5
105	8	6,7

Tabla E2 24: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto A3.

B1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	2,2	2,1
30	3,1	3,1
45	4	3,5
60	5	3,9
75	6,1	4,5
90	6,8	4,9
105	7,4	5,2

Tabla E2 25: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto B1.

B2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	4,4	3,5
30	5,5	4,7
45	6,5	5,9
60	7,5	6,9
75	8,4	7,3
90	8,7	7,7
105	9,8	8,3

Tabla E2 26: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto B2.

C1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	1,5	3
30	4,2	4,2
45	4,7	5,2
60	5,5	5,6
75	6,1	6,1
90	7,3	7,5
105	8,5	7,9

Tabla E2 27: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto C1.

C2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	0	1,9
30	0	3,2
45	2,5	3,7
60	3,4	4
75	4,5	4,5
90	5,5	4,7
105	7	5

Tabla E2 28: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto C2.

C3

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	0	1,2
30	2,5	2,2
45	4,7	3,2
60	5,6	3,8
75	6,3	4,5
90	7,5	5
105	8,7	5,4

Tabla E2 29: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto C3.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

D1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	2,2	3
30	5	4,1
45	6	5,7
60	6,8	6
75	7,2	6,4
90	7,9	6,8
105	8,6	8,3

Tabla E2 30: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto D1.

D2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	3,5	2,2
30	4	2,5
45	4,5	3
60	6	4,5
75	6,3	4,7
90	6,5	5,1
105	7	5,5

Tabla E2 31: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS bioestabilizada en el punto D2.

SS control:

A1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	2,4	3,2
30	4	5,2
45	5	6
60	5,6	6,6
75	6,3	7
90	6,9	7,3
105	7,4	7,8

Tabla E2 32: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto A1.

A2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	2	4,5
30	3,3	6
45	4	6,7
60	4,8	7,2
75	5,3	7,6
90	5,8	8,1
105	6,7	8,4

Tabla E2 33: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto A2.

A3

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	1,5	2,6
30	3,5	4,4
45	4,7	5,1
60	5,4	6,1
75	6	6,2
90	6,5	6,5
105	6,8	6,7

Tabla E2 34: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto A3.

B1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	2	4
30	3,5	4,6
45	4,7	5,6
60	6	6
75	6,3	6,4
90	6,6	6,6
105	6,8	6,8

Tabla E2 35: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto B1.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

B2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	1,2	3,5
30	3,5	4,7
45	4,5	5,5
60	5,2	6
75	5,7	6,2
90	6,1	6,4
105	6,7	6,5

Tabla E2 36: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto B2.

C1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	1,6	3,8
30	3	5,6
45	3,8	6,3
60	4,5	6,5
75	4,9	6,7
90	5,4	6,9
105	6	7,1

Tabla E2 37: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto C1.

C2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	2,5	3,6
30	4,2	5
45	5,2	5,7
60	6,1	6,1
75	6,5	7,1
90	7,2	7,3
105	8	7,5

Tabla E2 38: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto C2.

C3

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	1	3,5
30	3	4,1
45	4,3	4,9
60	5	5,2
75	6	6,2
90	7	6,4
105	8,1	6,6

Tabla E2 39: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto C3.

D1

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	3	4
30	4,1	6
45	5,4	7
60	6,5	8
75	7	8,5
90	7,5	8,8
105	8	9,1

Tabla E2 40: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto D1.

D2

Tiempo (min)	Dirección axial (cm)	Dirección radial (cm)
15	1	3,5
30	3	4,5
45	4,6	5,5
60	5,5	6,1
75	6	6,5
90	6,7	6,7
105	7,1	6,9

Tabla E2 41: Permeabilidad en las direcciones axial y radial de la probeta SS control en el punto D2.

E.2.4.2. Avance e intensidad del fluido.

En función del tiempo se generaron varias superficies de penetración visibles y diferenciables. Estas superficies permitieron identificar los diferentes puntos del contorno. Calcular los vectores de estos puntos y sus componentes axial y radial para las diferentes superficies de penetración a lo largo del tiempo permitió identificar las pautas de absorción del líquido pudiendo diferenciar en que instantes la absorción es principalmente axial o radial. Las ecuaciones utilizadas para estos cálculos son:

- **Avance del fluido (Figura E2 9).**

$$V = \frac{|X_I|}{|Y_I|} \quad (\text{Ec. E2. 1})$$

Donde:

V = vector.

Y_I = componente radial del punto.

X_I = componente axial del punto.

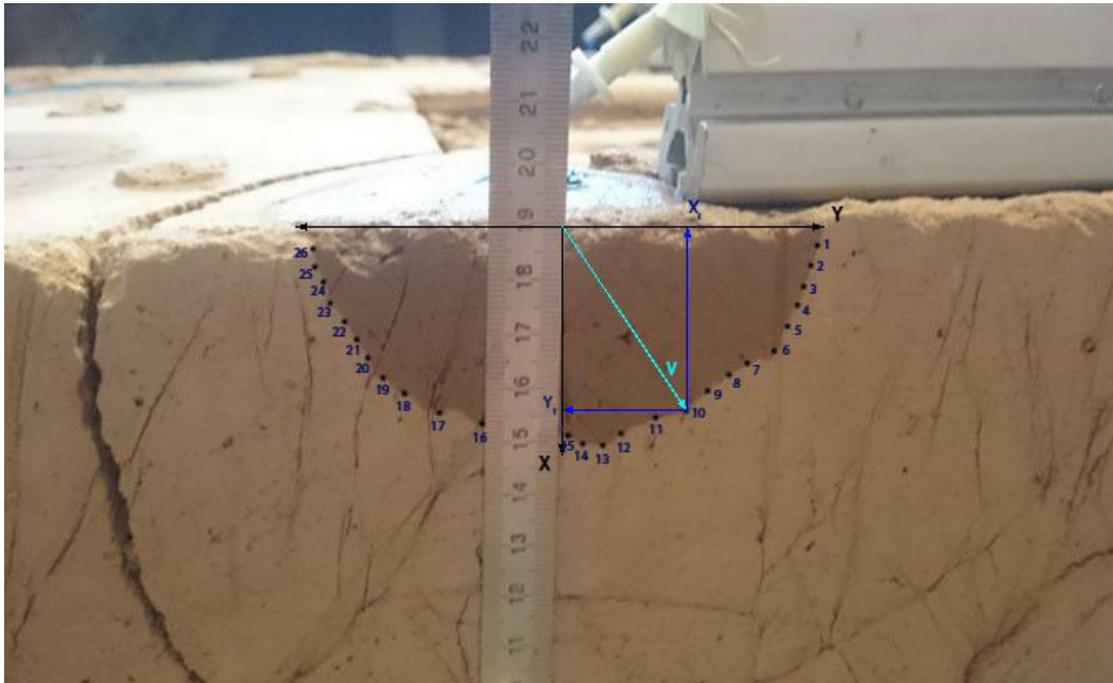


Figura E2 9: Puntos de contorno y medición de las componentes axial y radial de los puntos de contorno.

- **Intensidad del avance del fluido (Figura E2 10).**

$$I_A = \sqrt{X^2 + Y^2} \quad (\text{Ec. E2. 2})$$

Donde:

I_A = Intensidad del avance del fluido.

X = componente axial del punto.

Y = componente radial del punto.

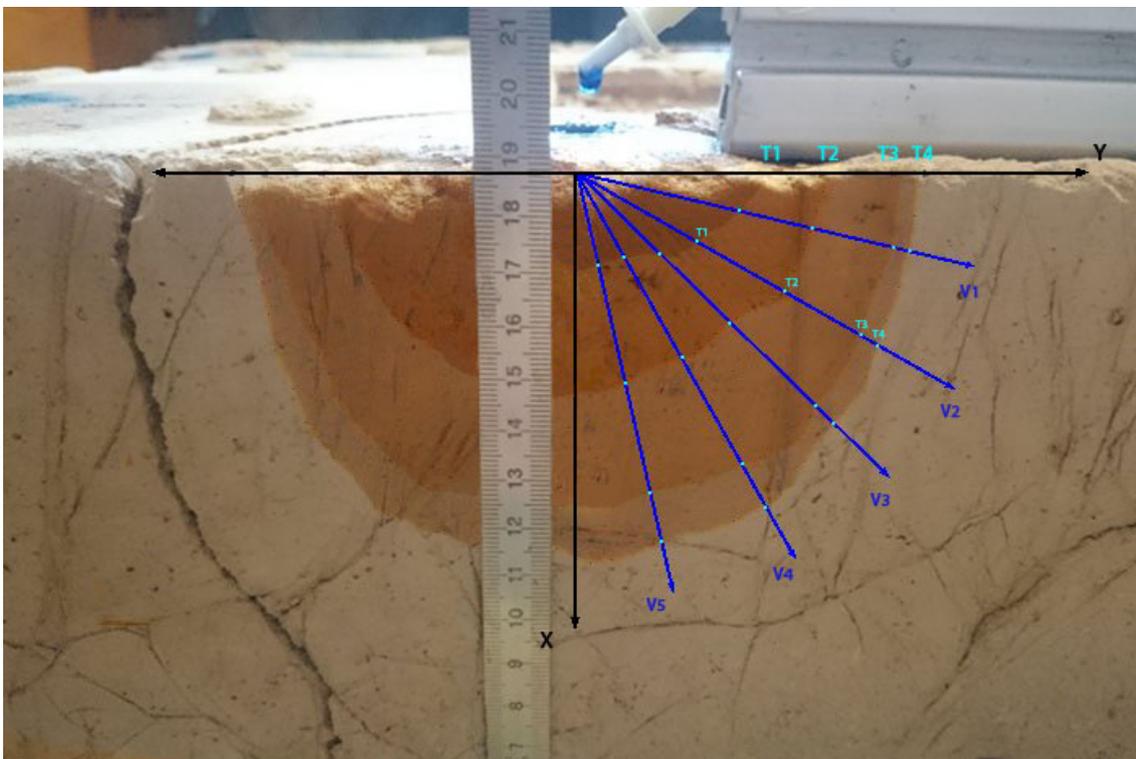


Figura E2 10: Posición de los vectores y colocación de los puntos en función del tiempo.

Avance del fluido

En las siguientes tablas, el avance del fluido está representado a través de las longitudes de las componentes radial y axial de los puntos seleccionados (Figura E2 9). En las últimas columnas de las tablas se puede diferenciar en que instantes la absorción es principalmente axial o radial (cuando $|X_i|/|Y_i| < 1$ la componente radial del fluido es mayor que la axial; cuando $|X_i|/|Y_i| > 1$ la componente axial del fluido es mayor que la radial).

M2 bioestabilizada:

T₁ (15 min):

Punto	X_i (cm) ↑	Y_i (cm) →	X_i / Y_i
1	-0,34	5,81	0,06
2	-0,57	5,35	0,11
3	-0,76	4,92	0,15
4	-1,05	4,32	0,24
5	-1,42	3,83	0,37
6	-1,74	3,15	0,55
7	-2,09	2,58	0,81
8	-3,09	2,45	1,26
9	-3,87	1,75	2,21
10	-3,95	0,81	4,86
11	-3,80	0,81	4,67
12	-2,93	0,28	10,48
13	-2,55	0,18	14,48
14	-2,50	-0,56	4,46
15	-1,92	-1,26	1,52
16	-1,59	-1,73	0,92
17	-1,21	-2,45	0,49
18	-1,02	-2,90	0,35
19	-0,57	-3,51	0,16

Tabla E2 42: Avance del flujo en 15 minutos de la probeta M2 bioestabilizada.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

T₂ (60 min):

Punto	X_i (cm) ↑	Y_i (cm) →	X_i / Y_i
1	-0,38	7,39	0,05
2	-0,98	6,89	0,14
3	-1,49	6,21	0,24
4	-2,12	5,23	0,41
5	-2,49	4,45	0,56
6	-3,27	3,96	0,83
7	-4,25	3,49	1,22
8	-4,87	2,66	1,83
9	-5,48	1,77	3,09
10	-5,98	0,98	6,09
11	-6,43	-0,96	6,72
12	-6,54	-2,19	2,99
13	-6,77	-3,10	2,18
14	-6,25	-4,03	1,55
15	-5,58	-3,92	1,42
16	-5,02	-3,48	1,44
17	-3,68	-3,59	1,03
18	-3,28	-4,61	0,71
19	-2,21	-6,02	0,37
20	-1,46	-6,53	0,22
21	-0,73	-7,15	0,10

Tabla E2 43: Avance del flujo en 1 hora de la probeta M2 bioestabilizada.

T₃ (120 min):

Punto	X_i (cm) ↑	Y_i (cm) →	X_i / Y_i
1	-1,19	8,41	0,14
2	-1,66	7,70	0,21
3	-2,37	6,68	0,35
4	-3,03	5,20	0,58
5	-3,62	5,20	0,70
6	-4,11	4,58	0,90
7	-4,74	4,07	1,17
8	-5,49	3,29	1,67
9	-6,09	2,60	2,34
10	-6,82	1,60	4,25
11	-7,23	0,40	18,25
12	-7,87	-1,14	6,88
13	-8,35	-2,29	3,65
14	-8,23	-4,31	1,91
15	-8,02	-4,85	1,66
16	-6,90	-5,87	1,18
17	-6,00	-5,96	1,01
18	-5,48	-5,81	0,94
19	-4,30	-5,84	0,74
20	-3,54	-7,40	0,48
21	-2,44	-8,25	0,30
22	-1,22	-9,25	0,13

Tabla E2 44: Avance del flujo en 2 horas de la probeta M2 bioestabilizada.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

T₄ (180 min):

<i>Punto</i>	<i>Xi (cm) ↑</i>	<i>Yi (cm) →</i>	<i> Xi / Yi </i>
1	-1,06	9,21	0,12
2	-1,81	8,04	0,22
3	-2,57	7,13	0,36
4	-3,40	6,42	0,53
5	-4,01	5,87	0,68
6	-4,37	5,34	0,82
7	-4,89	4,60	1,06
8	-5,57	4,07	1,37
9	-6,52	3,28	1,99
10	-7,21	2,02	3,56
11	-7,75	1,12	6,91
12	-8,02	0,43	18,70
13	-8,32	-0,53	15,78
14	-8,87	-1,56	5,68
15	-8,76	-2,54	3,45
16	-8,38	-4,22	1,99
17	-8,44	-5,10	1,66
18	-7,80	-5,67	1,38
19	-7,00	-6,26	1,12
20	-6,04	-6,59	0,92
21	-5,27	-6,31	0,84
22	-4,69	-6,85	0,69
23	-4,09	-7,58	0,54
24	-3,54	-8,30	0,43
25	-2,97	-8,89	0,33
26	-2,42	-9,44	0,26
27	-1,56	-10,04	0,16

Tabla E2 45: Avance del flujo en 3 horas de la probeta M2 bioestabilizada.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

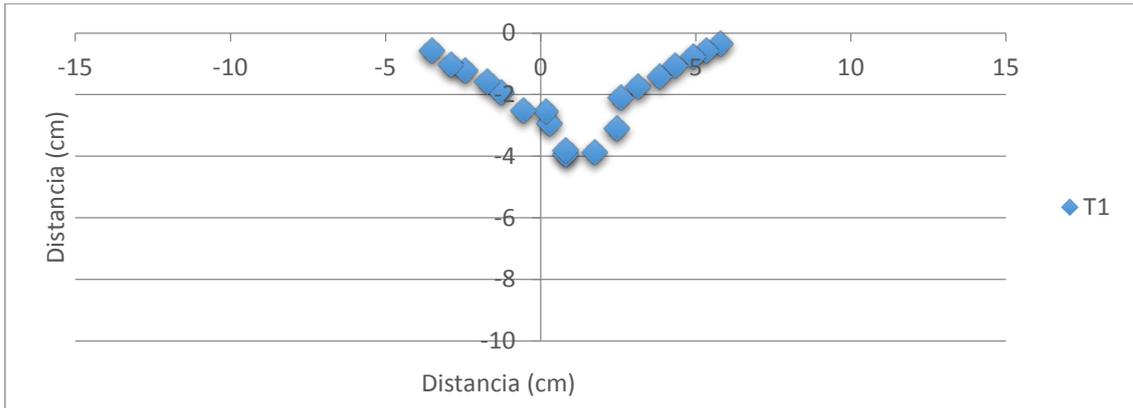


Figura E2 11: Avance del flujo en T1 de la probeta M2 bioestabilizada.

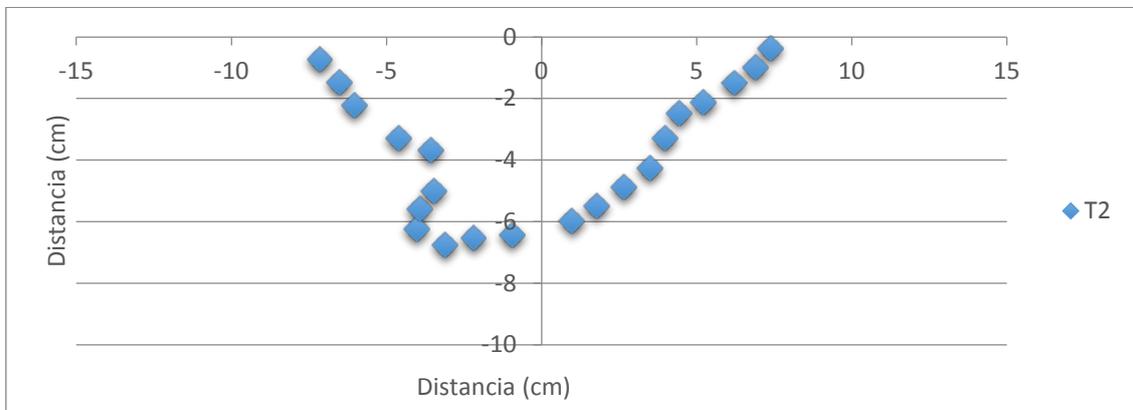


Figura E2 12: Avance del flujo en T2 de la probeta M2 bioestabilizada.

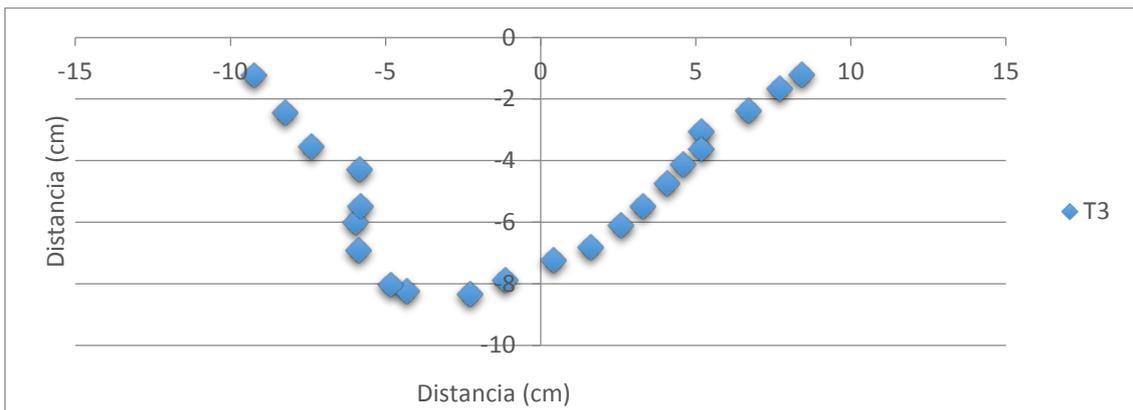


Figura E2 13: Avance del flujo en T3 de la probeta M2 bioestabilizada.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

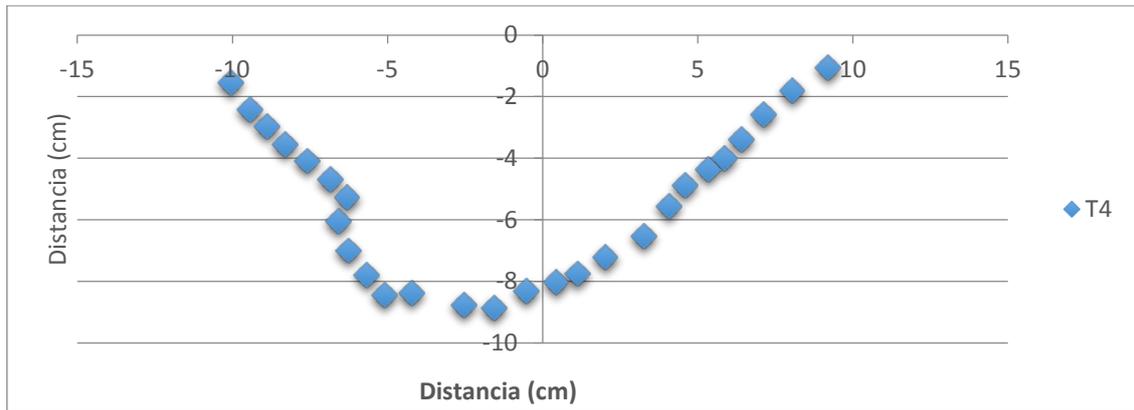


Figura E2 14: Avance del flujo en T4 de la probeta M2 bioestabilizada.

M2 control:

T₁ (20 min):

Punto	X_i (cm) ↑	Y_i (cm) →	X_i / Y_i
1	-0,25	2,97	0,08
2	-0,46	2,78	0,17
3	-0,71	2,59	0,27
4	-0,93	2,37	0,39
5	-1,10	2,18	0,50
6	-1,23	1,86	0,66
7	-1,48	1,64	0,90
8	-1,62	1,40	1,16
9	-1,61	1,12	1,44
10	-1,56	0,85	1,84
11	-1,66	0,55	3,04
12	-1,67	0,31	5,48
13	-1,75	0,09	20,38
14	-1,81	-0,20	9,00
15	-1,75	-0,36	4,92
16	-1,81	-0,53	3,44
17	-0,83	-2,09	0,40
18	-0,58	-2,49	0,23
19	-0,36	-2,82	0,13
20	-0,14	-2,96	0,05

Tabla E2 46: Avance del flujo en 20 minutos de la probeta M2 de control.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

T₂ (40 min):

Punto	X_i (cm) ↑	Y_i (cm) →	X_i / Y_i
1	-0,32	4,44	0,07
2	-0,67	4,32	0,15
3	-1,04	4,21	0,25
4	-1,36	4,09	0,33
5	-1,74	3,91	0,44
6	-2,17	3,68	0,59
7	-2,38	3,22	0,74
8	-2,59	2,90	0,89
9	-2,87	2,52	1,14
10	-3,22	2,15	1,50
11	-3,33	1,62	2,05
12	-3,62	1,01	3,57
13	-3,83	0,70	5,50
14	-3,80	0,36	10,70
15	-3,65	0,09	39,70
16	-3,46	-1,40	2,47
17	-3,25	-2,15	1,51
18	-2,93	-2,75	1,06
19	-2,64	-3,13	0,84
20	-2,30	-3,39	0,68
21	-1,96	-3,59	0,55
22	-1,65	-3,80	0,44
23	-1,33	-4,05	0,33
24	-0,96	-4,17	0,23
25	-0,70	-4,31	0,16
26	-0,38	-4,34	0,09

Tabla E2 47: Avance del flujo en 40 minutos de la probeta M2 de control.

T₃ (75 min):

<i>Punto</i>	<i>Xi (cm) ↑</i>	<i>Yi (cm) →</i>	<i> Xi / Yi </i>
1	-0,45	5,87	0,08
2	-1,16	5,78	0,20
3	-1,87	5,58	0,34
4	-2,61	5,29	0,49
5	-3,33	4,98	0,67
6	-3,97	4,57	0,87
7	-4,72	4,15	1,14
8	-5,22	3,35	1,56
9	-5,46	2,79	1,96
10	-5,67	2,13	2,67
11	-5,78	1,51	3,82
12	-6,12	0,68	8,97
13	-5,93	-0,68	8,70
14	-5,57	-1,31	4,27
15	-5,67	-2,05	2,77
16	-5,70	-2,85	2,00
17	-5,26	-3,41	1,54
18	-4,72	-3,86	1,22
19	-4,07	-4,41	0,92
20	-3,29	-4,69	0,70
21	-2,67	-5,04	0,53
22	-2,02	-5,26	0,39
23	-1,48	-5,49	0,27
24	-0,95	-5,72	0,17
25	-0,50	-5,88	0,09

Tabla E2 48: Avance del flujo en 1:15 h de la probeta M2 de control.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

T₄ (90 min):

Punto	X_i (cm) ↑	Y_i (cm) →	X_i / Y_i
1	-0,78	6,27	0,13
2	-1,43	6,11	0,23
3	-2,11	6,01	0,35
4	-2,74	5,76	0,48
5	-3,82	5,40	0,71
6	-4,45	4,94	0,90
7	-5,36	4,24	1,26
8	-6,13	3,79	1,62
9	-6,49	2,92	2,22
10	-6,84	1,72	3,97
11	-7,20	0,66	10,86
12	-7,27	0,27	27,43
13	-6,99	-0,37	18,70
14	-6,92	-0,82	8,44
15	-6,69	-2,57	2,61
16	-6,35	-3,50	1,82
17	-5,98	-4,00	1,49
18	-5,31	-4,50	1,18
19	-4,64	-5,02	0,93
20	-4,00	-5,25	0,76
21	-3,27	-5,58	0,59
22	-2,60	-5,69	0,46
23	-2,03	-5,84	0,35
24	-1,23	-6,02	0,20
25	-0,62	-6,26	0,10

Tabla E2 49: Avance del flujo en 1:30 h de la probeta M2 de control.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

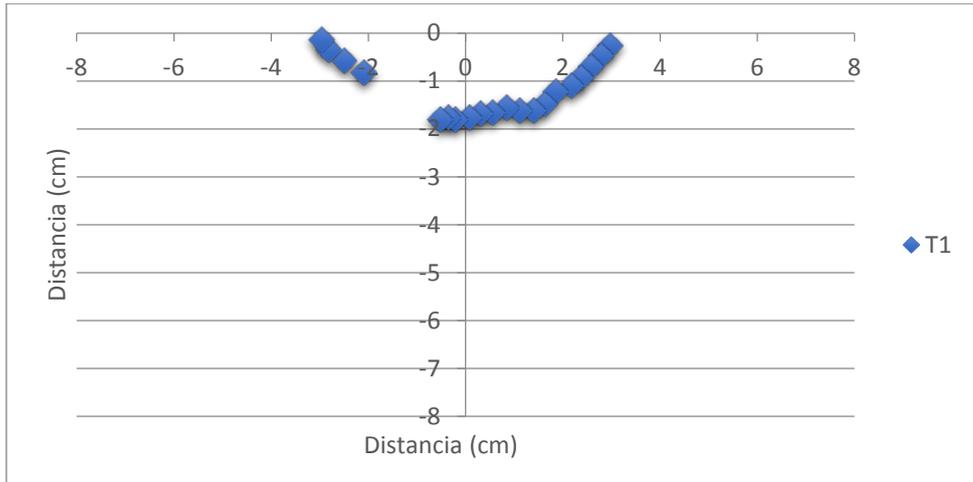


Figura E2 15: Avance del flujo en T1 de la probeta M2 control.

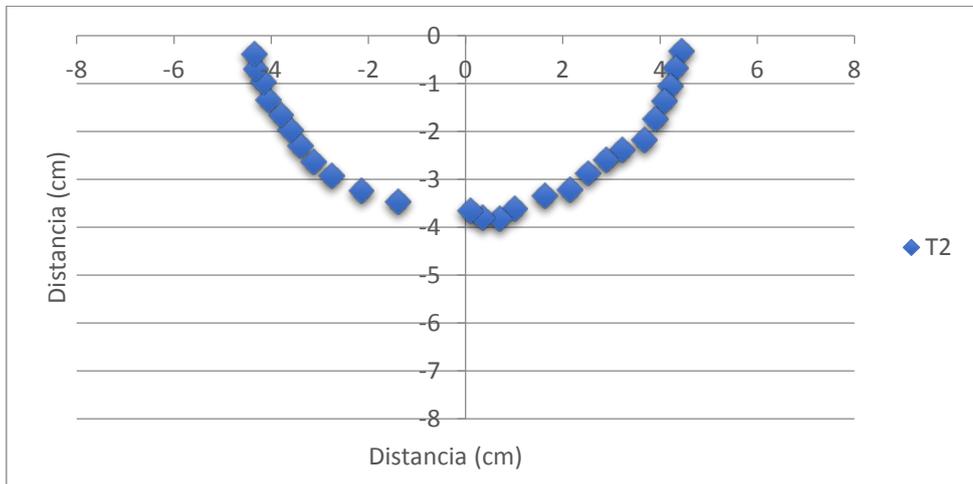


Figura E2 16: Avance del flujo en T2 de la probeta M2 control.

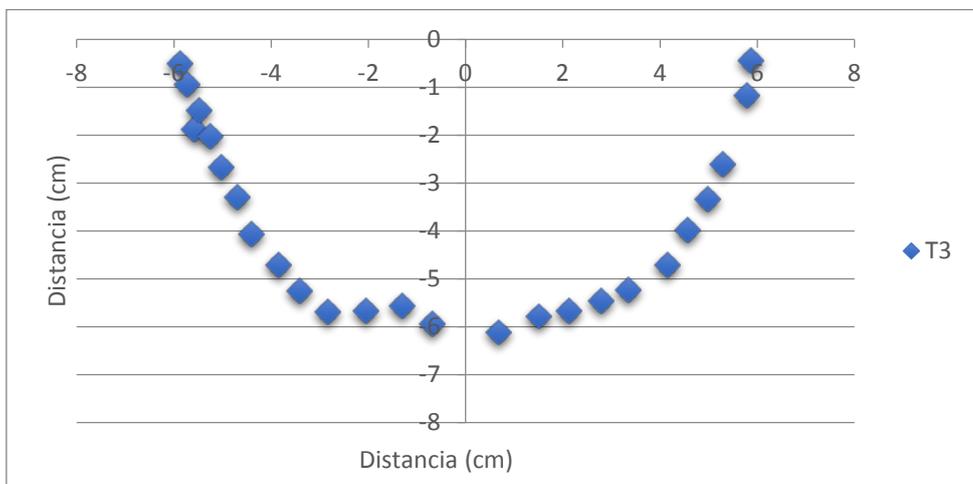


Figura E2 17: Avance del flujo en T3 de la probeta M2 control.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

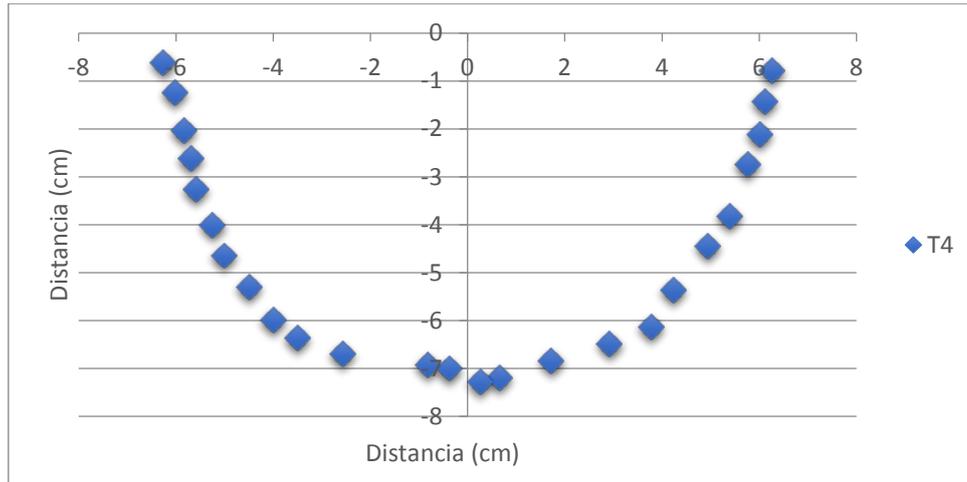


Figura E2 18: Avance del flujo en T4 de la probeta M2 control.

SS bioestabilizada:

T₁ (20 min):

Punto	X_i (cm) ↑	Y_i (cm) →	X_i / Y_i
1	-0,78	3,84	0,20
2	-1,44	3,59	0,40
3	-2,03	3,53	0,57
4	-2,81	3,44	0,82
5	-3,57	3,22	1,11
6	-3,92	2,50	1,57
7	-4,04	1,75	2,31
8	-4,31	1,20	3,59
9	-4,26	0,54	7,82
10	-3,95	0,17	22,98
11	-3,88	-0,56	6,91
12	-3,58	-1,59	2,26
13	-3,42	-2,35	1,46
14	-2,79	-3,37	0,83
15	-1,80	-3,71	0,49
16	-0,76	-3,83	0,20

Tabla E2 50: Avance del flujo en 20 minutos de la probeta SS bioestabilizada.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

T₂ (40 min):

Punto	X_i (cm) ↑	Y_i (cm) →	X_i / Y_i
1	-0,82	3,45	0,24
2	-1,62	4,05	0,40
3	-2,21	5,20	0,43
4	-2,99	5,22	0,57
5	-3,80	4,96	0,76
6	-4,76	4,07	1,17
7	-5,63	3,26	1,73
8	-6,28	2,34	2,68
9	-6,52	1,21	5,41
10	-6,52	0,46	14,29
11	-6,08	-0,86	7,05
12	-5,81	-2,27	2,56
13	-5,28	-3,30	1,60
14	-4,78	-3,98	1,20
15	-3,33	-4,92	0,68
16	-2,36	-5,21	0,45
17	-1,52	-5,20	0,29
18	-1,22	-4,04	0,30
19	-0,67	-3,33	0,20

Tabla E2 51: Avance del flujo en 40 minutos de la probeta SS bioestabilizada.

T₃ (90 min):

Punto	X_i (cm) ↑	Y_i (cm) →	X_i / Y_i
1	-0,84	3,87	0,22
2	-1,61	4,17	0,39
3	-2,08	5,09	0,41
4	-2,44	5,90	0,41
5	-2,96	6,61	0,45
6	-3,96	6,58	0,60
7	-4,95	5,64	0,88
8	-5,55	4,92	1,13
9	-6,48	4,05	1,60
10	-6,86	2,84	2,41
11	-7,27	1,72	4,22
12	-7,38	0,58	12,80
13	-7,27	-1,03	7,07
14	-6,94	-2,01	3,45
15	-6,22	-3,62	1,72
16	-5,00	-4,55	1,10
17	-3,54	-5,21	0,68
18	-2,29	-5,88	0,39
19	-1,35	-5,48	0,25
20	-0,71	-4,39	0,16

Tabla E2 52: Avance del flujo en 1:30 h de la probeta SS bioestabilizada.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

T₄ (150 min):

Punto	<i>X_i</i> (cm) ↑	<i>Y_i</i> (cm) →	<i> X_i / Y_i </i>
1	-0,86	4,75	0,18
2	-2,01	4,91	0,41
3	-2,23	6,02	0,37
4	-2,43	7,01	0,35
5	-3,08	7,37	0,42
6	-3,84	8,01	0,48
7	-4,80	7,63	0,63
8	-5,20	7,01	0,74
9	-5,62	6,27	0,90
10	-6,59	5,81	1,14
11	-7,48	5,14	1,46
12	-7,78	3,87	2,01
13	-8,06	2,83	2,85
14	-8,59	2,02	4,25
15	-8,55	0,59	14,59
16	-8,35	-0,35	23,71
17	-8,03	-2,11	3,80
18	-7,72	-3,41	2,27
19	-7,15	-4,36	1,64
20	-5,77	-5,32	1,08
21	-5,09	-6,03	0,84
22	-3,87	-6,47	0,60
23	-2,53	-6,15	0,41
24	-1,43	-5,66	0,25
25	-0,75	-4,32	0,17

Tabla E2 53: Avance del flujo en 2:30 h de la probeta SS bioestabilizada.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

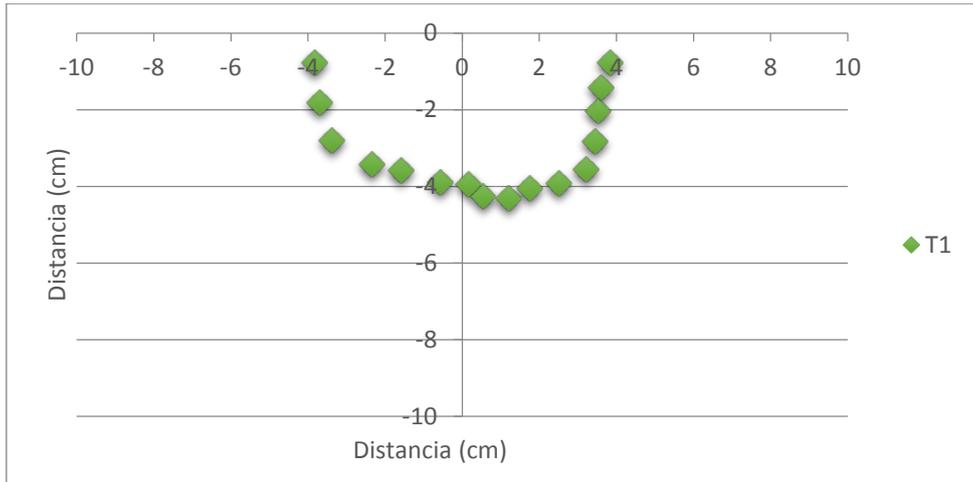


Figura E2 19: Avance del flujo en T1 de la probeta SS bioestabilizada.

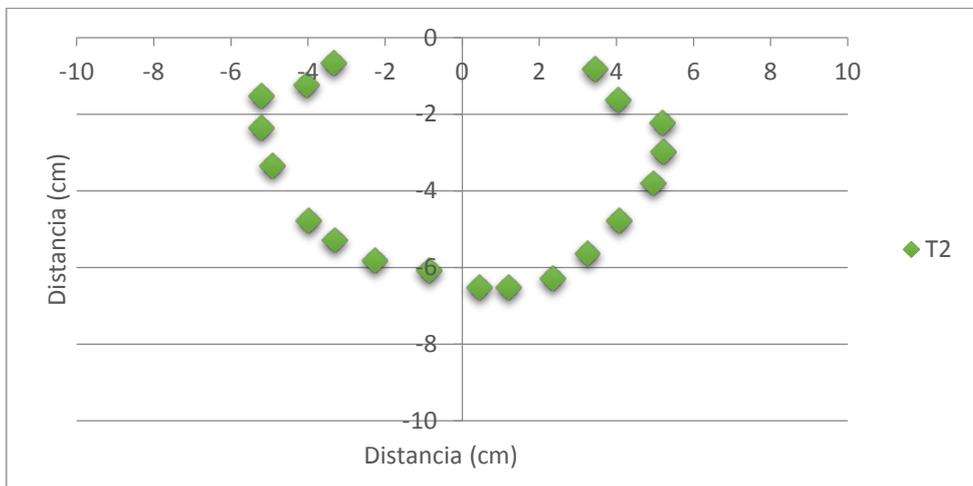


Figura E2 20: Avance del flujo en T2 de la probeta SS bioestabilizada.

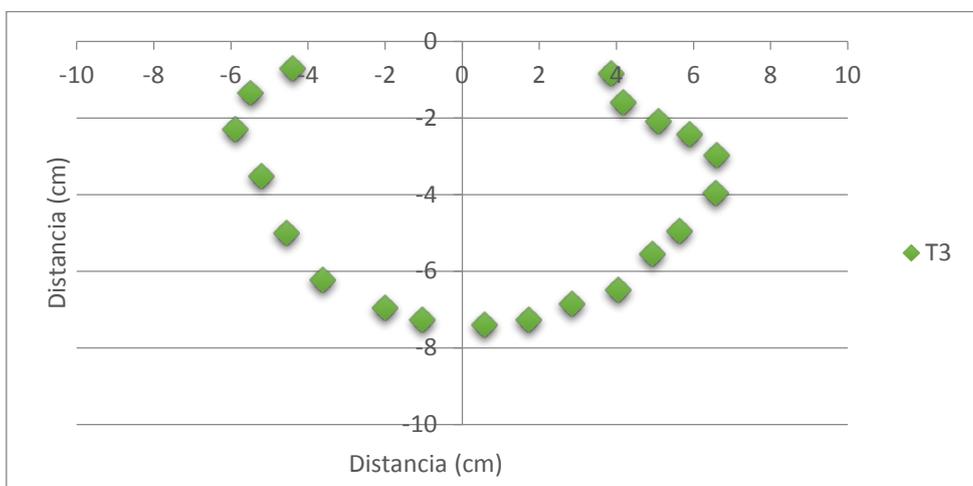


Figura E2 21: Avance del flujo en T3 de la probeta SS bioestabilizada.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

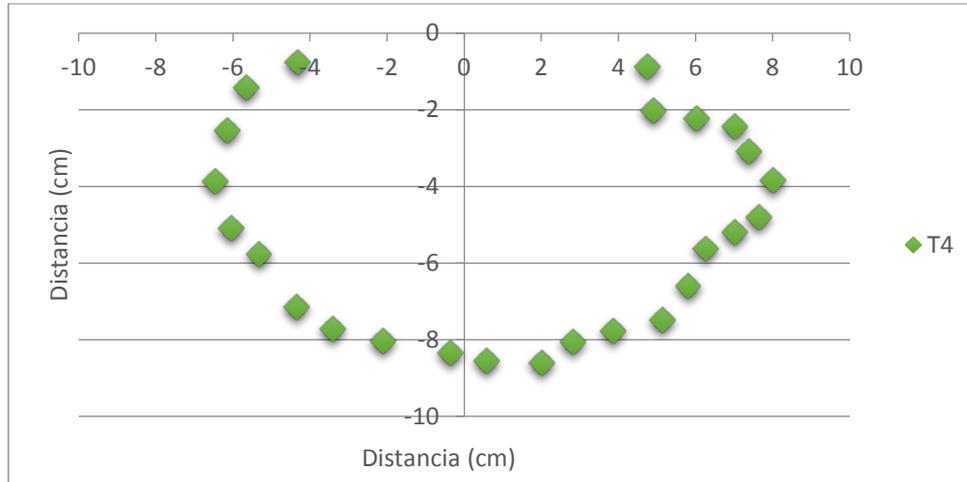


Figura E2 22: Avance del flujo en T4 de la probeta SS bioestabilizada.

SS control:

T₁ (15 min):

Punto	X_i (cm) ↑	Y_i (cm) →	X_i / Y_i
1	-0,37	2,86	0,13
2	-0,75	2,53	0,29
3	-1,22	2,23	0,54
4	-1,56	1,90	0,82
5	-1,78	1,38	1,29
6	-1,84	0,86	2,14
7	-1,92	0,47	4,07
8	-1,91	0,12	16,22
9	-1,89	-0,14	13,38
10	-1,88	-1,54	1,22
11	-1,73	-1,96	0,89
12	-1,46	-2,29	0,64
13	-1,13	-2,59	0,44
14	-0,82	-2,85	0,29
15	-0,56	-3,16	0,18

Tabla E2 54: Avance del flujo en 15 minutos de la probeta SS control.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

T₂ (50 min):

Punto	X_i (cm) ↑	Y_i (cm) →	X_i / Y_i
1	-0,74	6,22	0,12
2	-1,33	5,38	0,25
3	-1,52	4,44	0,34
4	-1,80	3,77	0,48
5	-2,10	3,11	0,67
6	-2,56	2,52	1,01
7	-3,04	2,25	1,35
8	-3,44	1,83	1,89
9	-3,77	2,25	1,68
10	-3,96	0,64	6,17
11	-4,06	-0,28	14,34
12	-4,21	-0,85	4,98
13	-4,14	-1,52	2,72
14	-4,01	-2,20	1,82
15	-3,47	-4,39	0,79
16	-3,11	-5,21	0,60
17	-2,90	-5,94	0,49
18	-2,60	-6,62	0,39
19	-2,06	-7,12	0,29
20	-1,31	-7,05	0,19
21	-0,86	-6,27	0,14

Tabla E2 55: Avance del flujo en 50 minutos de la probeta SS control.

T₃ (75 min):

Punto	X_i (cm) ↑	Y_i (cm) →	X_i / Y_i
1	-0,62	7,56	0,08
2	-1,48	7,29	0,20
3	-1,58	6,30	0,25
4	-1,79	5,56	0,32
5	-1,67	4,67	0,36
6	-2,18	4,48	0,49
7	-2,53	3,67	0,69
8	-3,13	3,92	0,80
9	-3,74	3,14	1,19
10	-4,38	-2,30	1,90
11	-4,72	-1,26	3,76
12	-5,04	-0,37	13,81
13	-5,26	-1,03	5,10
14	-4,97	-3,14	1,58
15	-4,70	-4,16	1,13
16	-4,15	-5,28	0,79
17	-3,64	-6,28	0,58
18	-3,01	-7,56	0,40
19	-2,24	-8,27	0,27
20	-1,25	-8,59	0,15
21	-0,87	-9,15	0,10
22	-0,47	-9,86	0,05

Tabla E2 56: Avance del flujo en 1:15 h de la probeta SS control.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

T₄ (100 min):

Punto	X_i (cm) ↑	Y_i (cm) →	X_i / Y_i
1	-0,83	8,93	0,09
2	-1,61	8,48	0,19
3	-2,25	7,71	0,29
4	-2,46	6,80	0,36
5	-3,08	6,62	0,47
6	-3,85	6,09	0,63
7	-4,28	5,25	0,81
8	-4,75	4,46	1,06
9	-5,19	3,44	1,51
10	-5,63	2,38	2,36
11	-6,00	1,57	3,82
12	-6,36	0,71	9,02
13	-6,46	-0,80	8,12
14	-6,55	-1,74	3,76
15	-6,37	-3,23	1,97
16	-6,25	-4,13	1,51
17	-5,85	-5,04	1,16
18	-5,47	-5,64	0,97
19	-5,20	-6,53	0,80
20	-4,71	-7,10	0,66
21	-4,41	-7,94	0,56
22	-3,98	-8,62	0,46
23	-3,53	-9,14	0,39
24	-3,13	-9,35	0,34
25	-2,74	-9,49	0,29
26	-2,19	-9,99	0,22
27	-1,61	-10,38	0,15
28	-0,88	-10,38	0,08

Tabla E2 57: Avance del flujo en 1:40 h de la probeta SS control.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

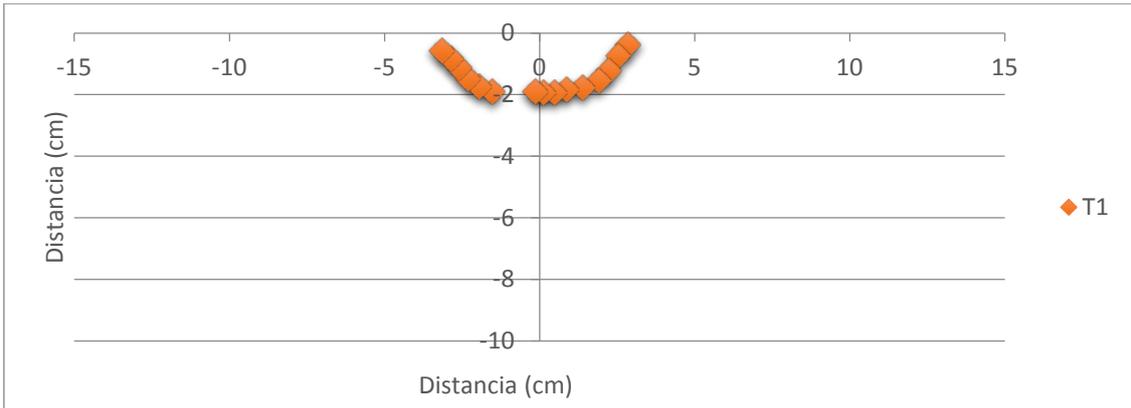


Figura E2 23: Avance del flujo en T1 de la probeta SS control.

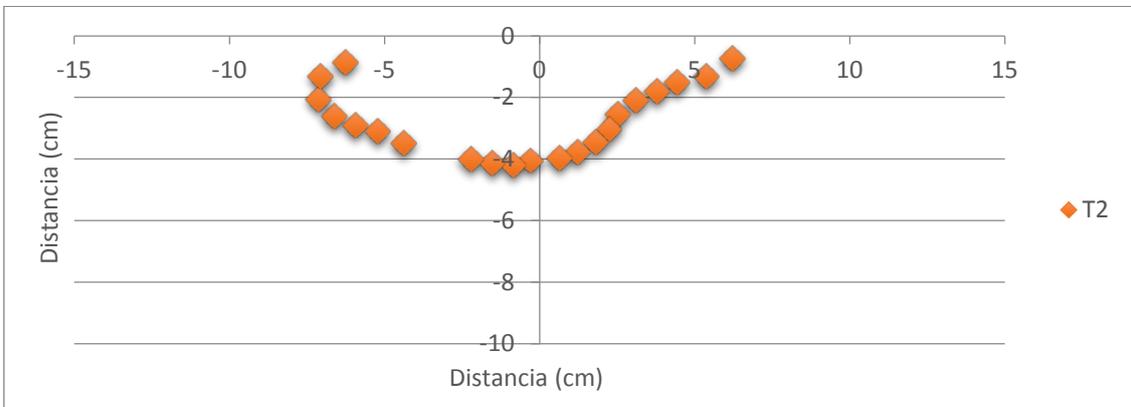


Figura E2 24: Avance del flujo en T2 de la probeta SS control.

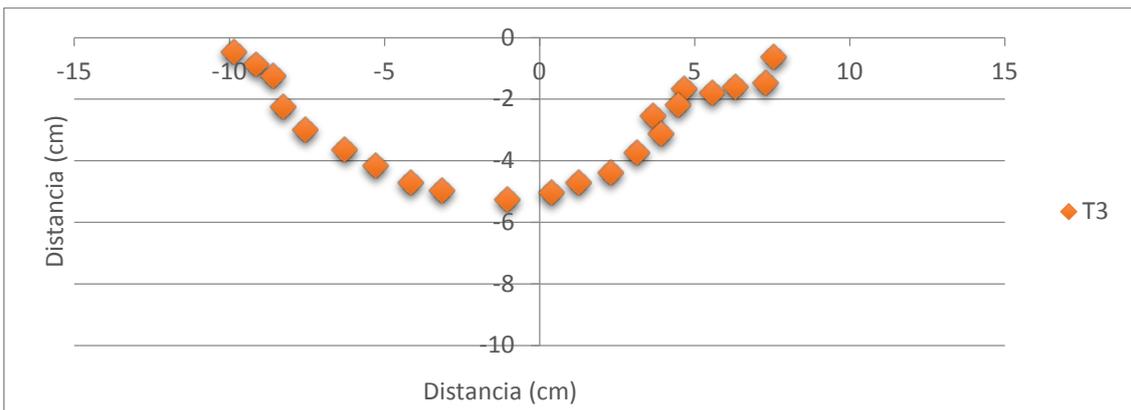


Figura E2 25: Avance del flujo en T3 de la probeta SS control.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

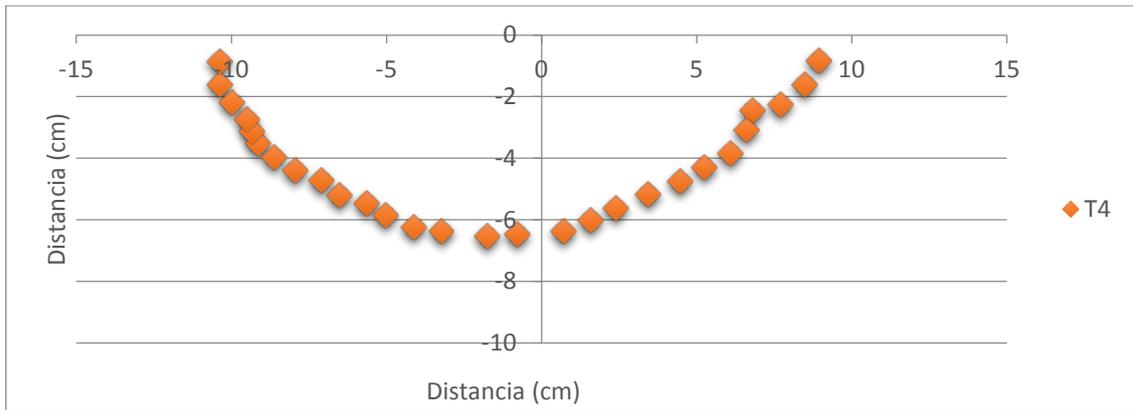


Figura E2 26: Avance del flujo en T4 de la probeta SS control.

Intensidad del avance del fluido.

La intensidad del avance del fluido está representada a través de 5 vectores. En cada vector están seleccionados 4 puntos en diferentes instantes del tiempo (T_i ; Figura E2 10). El momento del cambio en la tendencia de la función se puede diferenciar en las últimas columnas de las tablas (Intensidad del avance). El suceso de éste cambio indica la terminación de la intensidad del tratamiento.

M2 bioestabilizada:

Vector 1

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
15	0,99	4,18	4,29
60	1,41	5,89	6,05
120	1,64	6,93	7,12
180	1,85	7,78	8

Tabla E2 58: Intensidad del avance del fluido en vector 1, M2 bioestabilizada.

Vector 2

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
15	1,6	2,96	3,36
60	2,32	4,37	4,94
120	2,96	5,58	6,32
180	3,38	6,45	7,28

Tabla E2 59: Intensidad del avance del fluido en vector 2, M2 bioestabilizada.

Vector 3

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
15	2,16	2,31	3,16
60	3,36	3,57	4,91
120	4	4,3	5,87
180	4,46	4,75	6,51

Tabla E2 60: Intensidad del avance del fluido en vector 3,

M2 bioestabilizada.

Vector 4

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
15	3,45	2,02	3,99
60	4,5	2,62	5,21
120	5,35	3,15	6,21
180	5,92	3,49	6,87

Tabla E2 61: Intensidad del avance del fluido en vector 4, M2 bioestabilizada.

Vector 5

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
15	3,8	1,03	3,93
60	5,49	1,44	5,67
120	6,34	1,68	6,56
180	7,07	1,87	7,32

Tabla E2 62: Intensidad del avance del fluido en vector 5, M2 bioestabilizada.

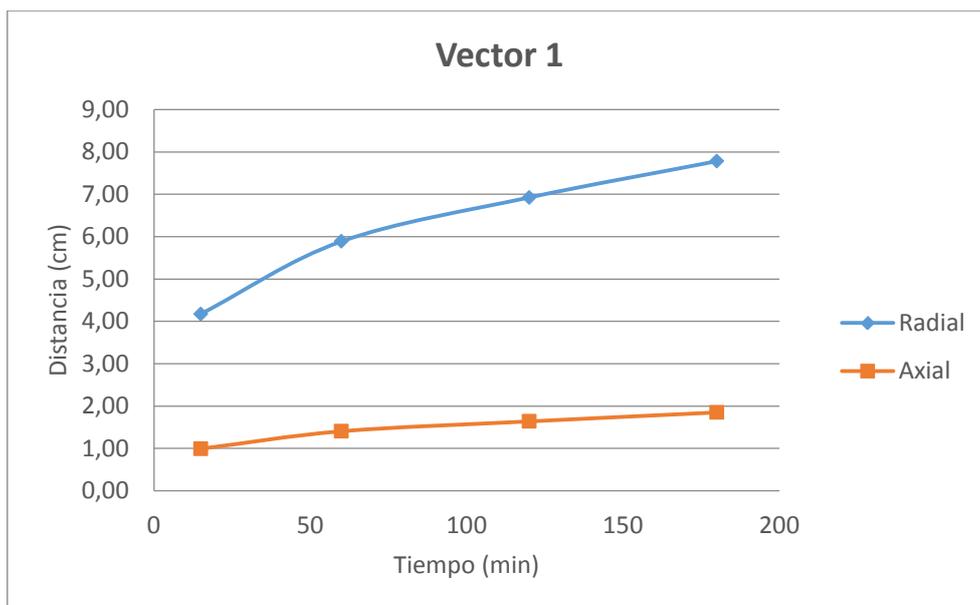


Figura E2 27: Intensidad del avance del fluido en vector 1, M2 bioestabilizada.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

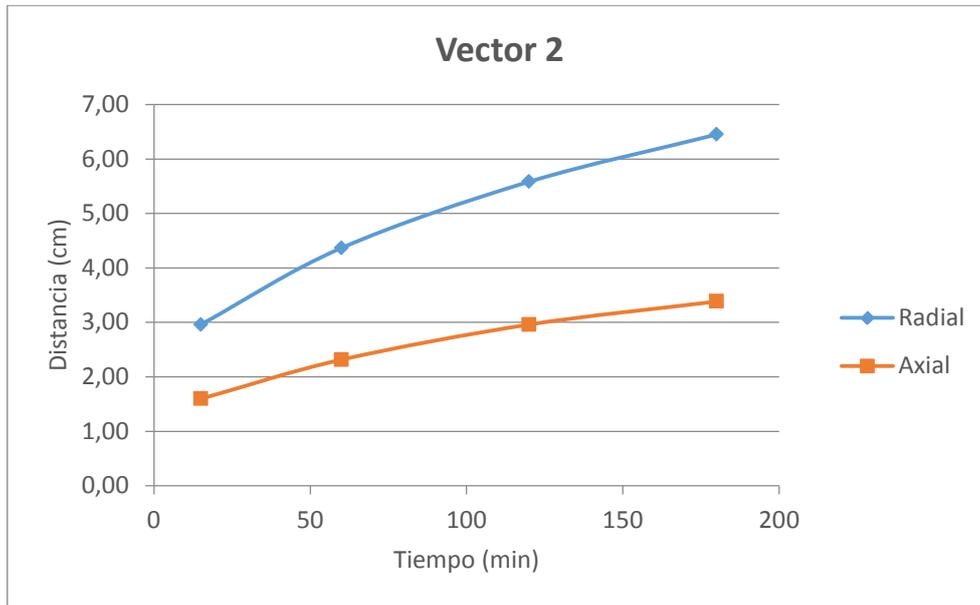


Figura E2 28: Intensidad del avance del fluido en vector 2, M2 bioestabilizada.

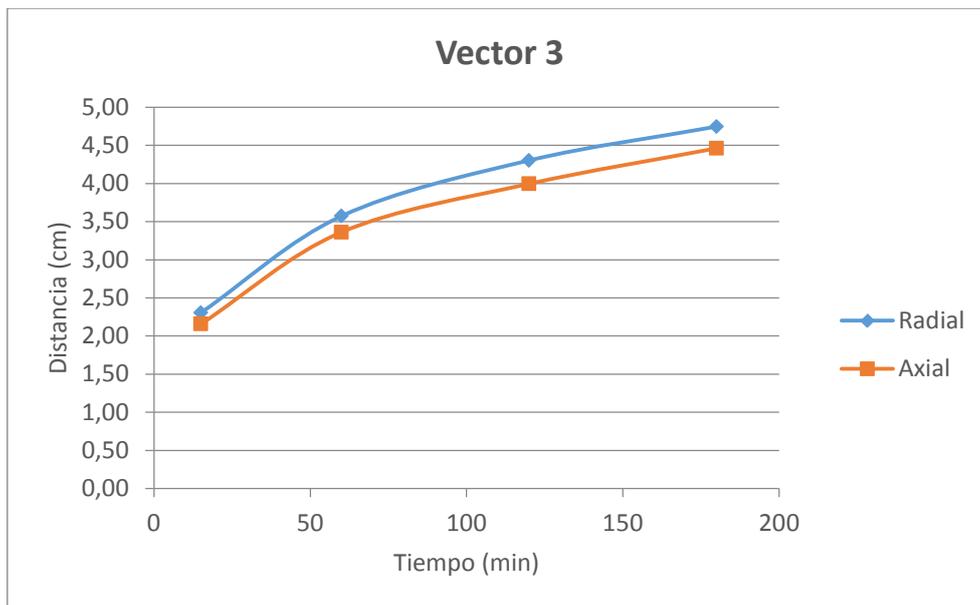


Figura E2 29: Intensidad del avance del fluido en vector 3, M2 bioestabilizada.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

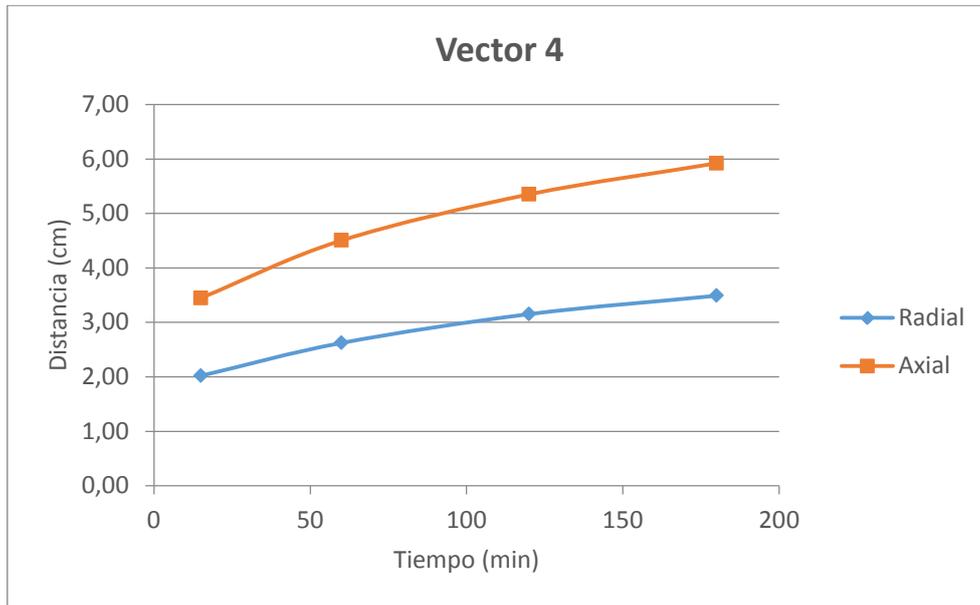


Figura E2 30: Intensidad del avance del fluido en vector 4, M2 bioestabilizada.

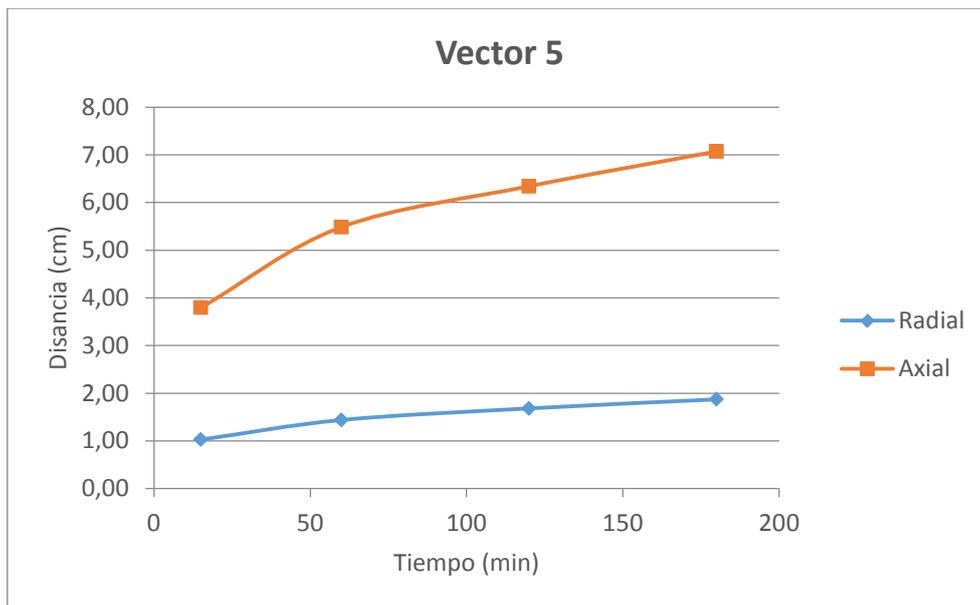


Figura E2 31: Intensidad del avance del fluido en vector 5, M2 bioestabilizada.

M2 control:

Vector 1

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
20	0,82	3,67	3,76
40	1,22	5,32	5,46
75	1,66	7,1	7,29
90	1,11	7,49	7,57

Tabla E2 63: Intensidad del avance del fluido en vector 1, M2 control.

Vector 2

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
20	1,5	2,72	3,1
40	2,64	4,66	5,35
75	3,62	6,38	7,33
90	3,88	6,75	7,79

Tabla E2 64: Intensidad del avance del fluido en vector 2, M2 control.

Vector 3

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
20	1,79	1,86	2,58
40	3,36	3,44	4,81
75	5,21	5,37	7,48
90	5,61	5,78	8,06

Tabla E2 65: Intensidad del avance del fluido en vector 3, M2 control.

Vector 4

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
20	1,87	1,07	2,15
40	4,15	2,36	4,77
75	6,52	3,73	7,51
90	7,52	4,24	8,63

Tabla E2 66: Intensidad del avance del fluido en vector 4, M2 control.

Vector 5

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
20	2,05	0,51	2,11
40	4,73	1,12	4,86
75	7,19	1,66	7,38
90	8,28	1,92	8,5

Tabla E2 67: Intensidad del avance del fluido en vector 5, M2 control.

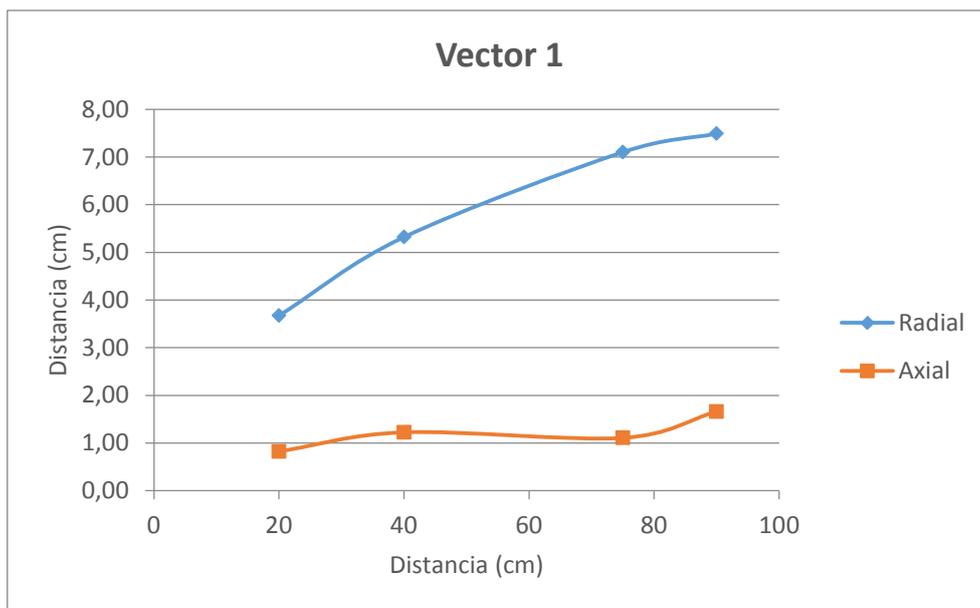


Figura E2 32: Intensidad del avance del fluido en vector 1, de M2 control.

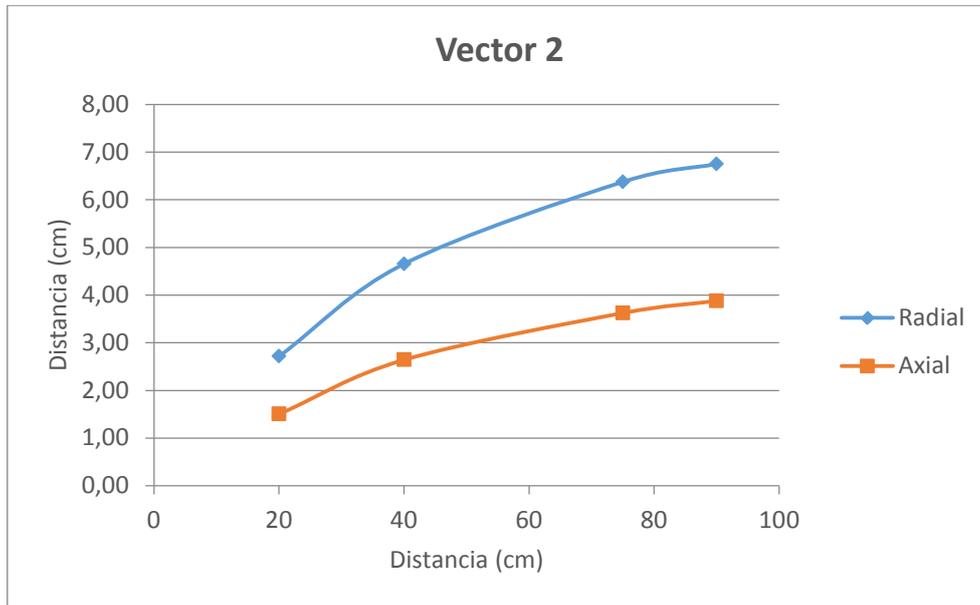


Figura E2 33: Intensidad del avance del fluido en vector 2, de M2 control.

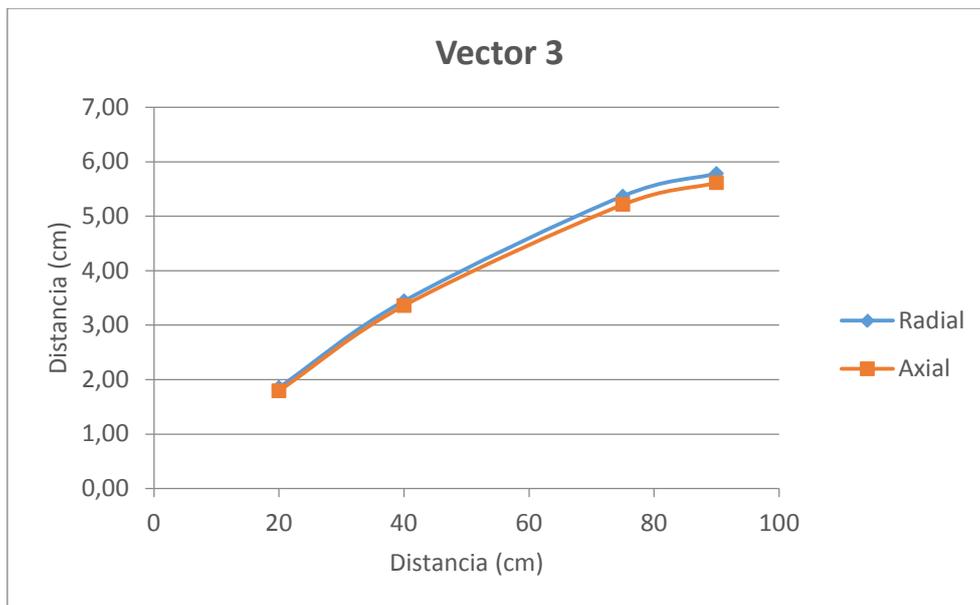


Figura E2 34: Intensidad del avance del fluido en vector 3, de M2 control.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

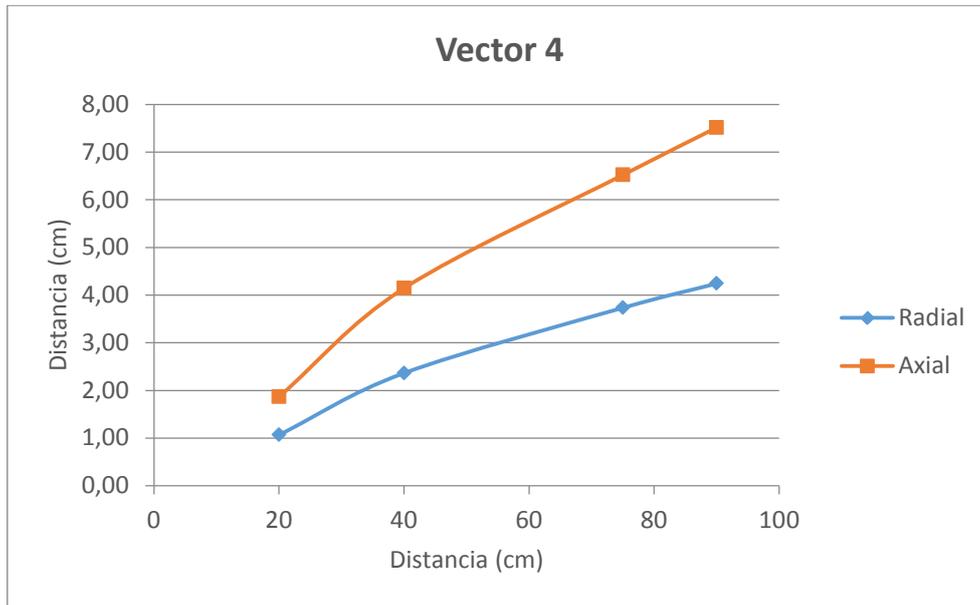


Figura E2 35: Intensidad del avance del fluido en vector 4, de M2 control.

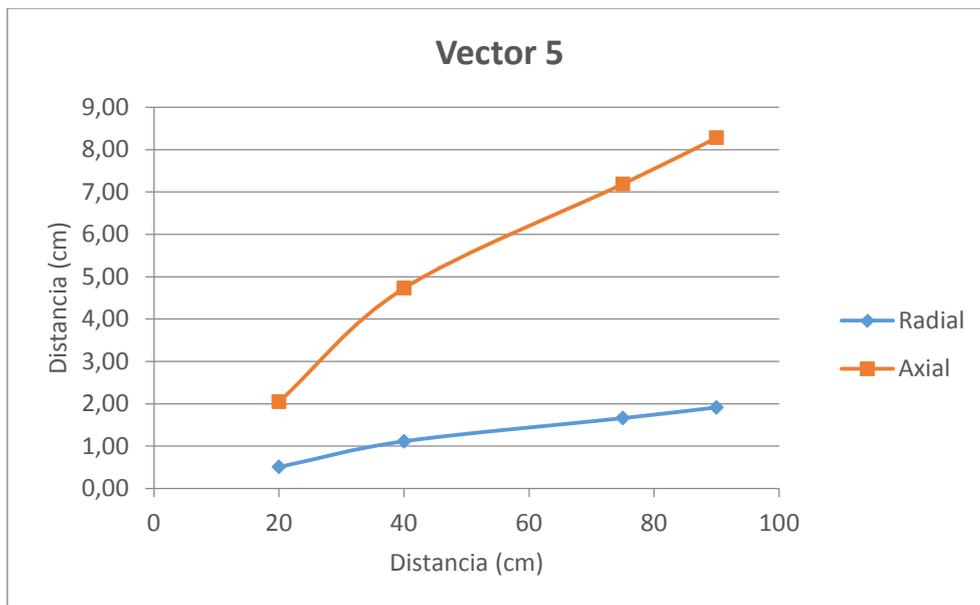


Figura E2 36: Intensidad del avance del fluido en vector 5, de M2 control.

SS bioestabilizada:

Vector 1

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
20	0,94	4,06	4,17
40	1,02	4,43	4,54
90	1,05	4,58	4,7
150	1,26	5,5	5,64

Tabla E2 68: Intensidad del avance del fluido en vector 1, SS bioestabilizada.

Vector 2

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
20	2,07	4,03	4,53
40	2,88	5,68	6,37
90	4,03	7,92	8,89
150	4,61	9,06	10,16

Tabla E2 69: Intensidad del avance del fluido en vector 2, SS bioestabilizada.

Vector 3

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
20	3,21	3,51	4,75
40	4,41	4,83	6,54
90	5,79	6,32	8,57
150	6,52	7,15	9,67

Tabla E2 70: Intensidad del avance del fluido en vector 3, SS bioestabilizada.

Vector 4

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
20	3,97	2,49	4,68
40	5,96	3,73	7,03
90	7,49	4,67	8,83
150	8,9	5,6	10,52

Tabla E2 71: Intensidad del avance del fluido en vector 4, SS bioestabilizada.

Vector 5

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
20	4,33	1,14	4,48
40	6,94	1,81	7,17
90	8,38	2,16	8,65
150	9,7	2,53	10,02

Tabla E2 72: Intensidad del avance del fluido en vector 5, SS bioestabilizada.

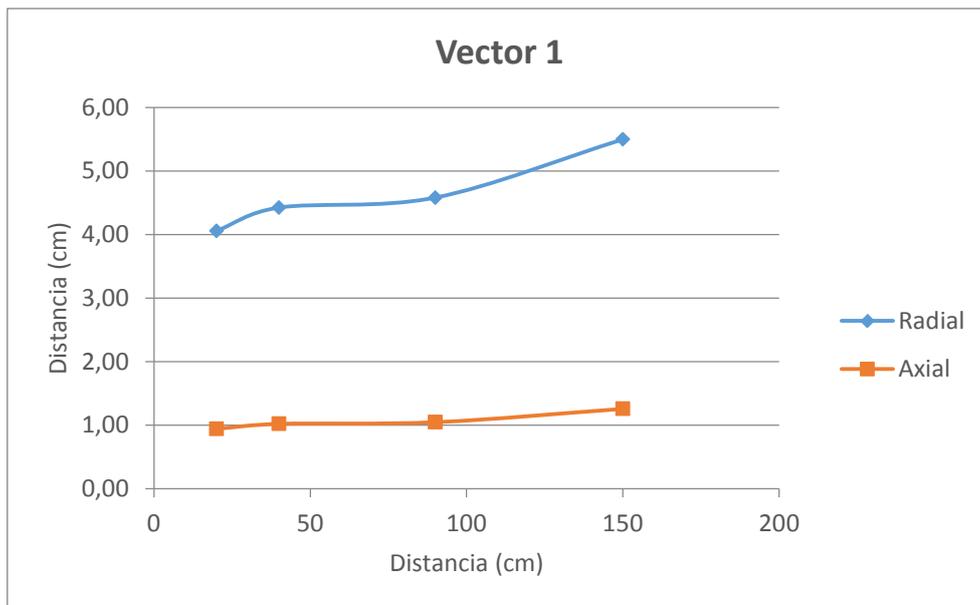


Figura E2 37: Intensidad del avance del fluido en vector 1, de SS bioestabilizada.

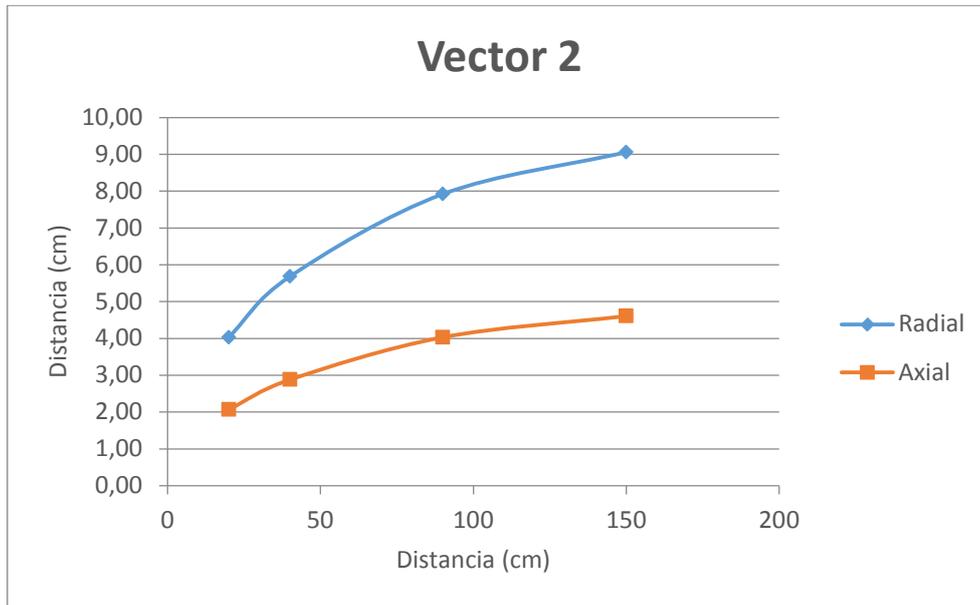


Figura E2 38: Intensidad del avance del fluido en vector 2, de SS bioestabilizada.

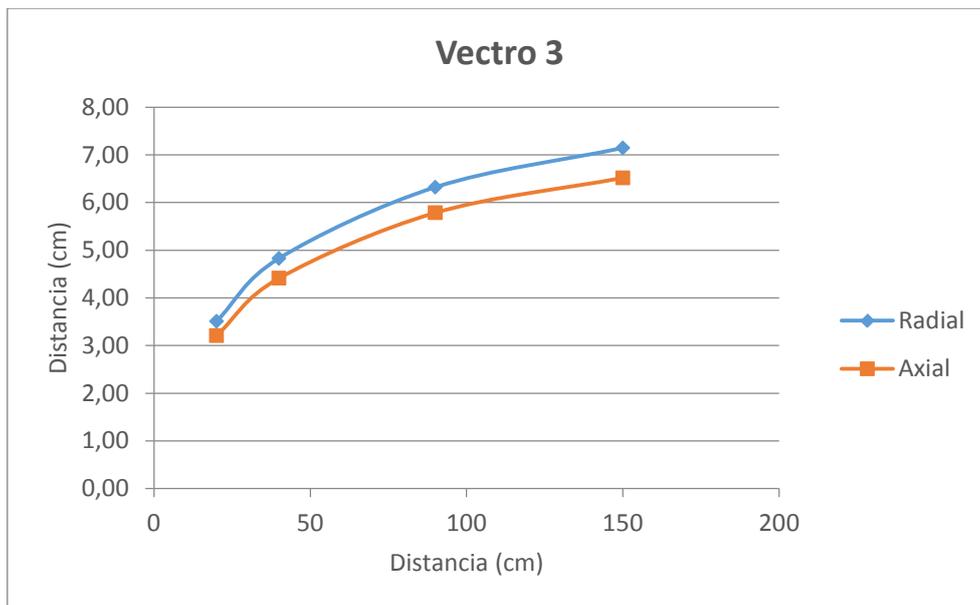


Figura E2 39: Intensidad del avance del fluido en vector 3, de SS bioestabilizada.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

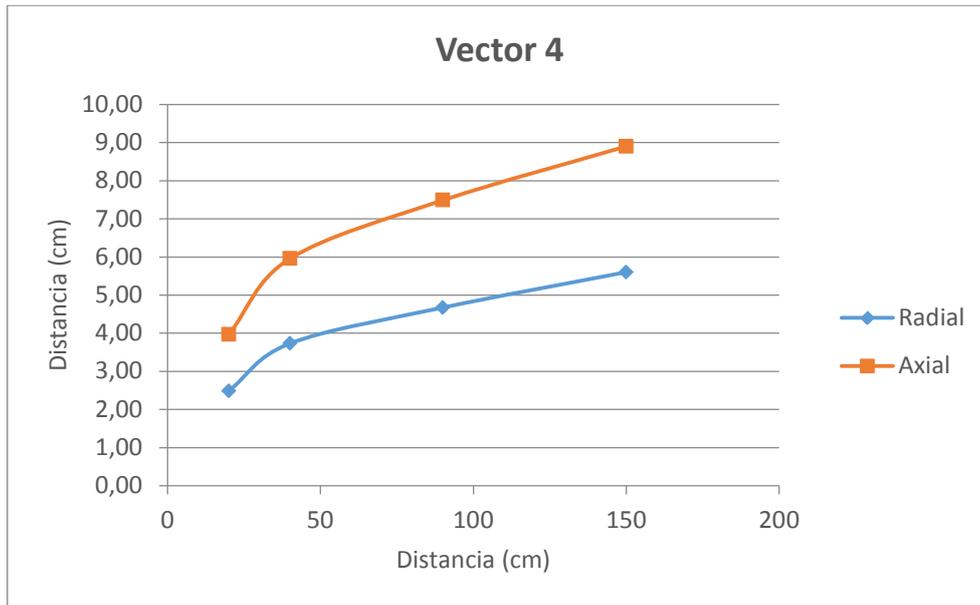


Figura E2 40: Intensidad del avance del fluido en vector 5, de SS bioestabilizada.

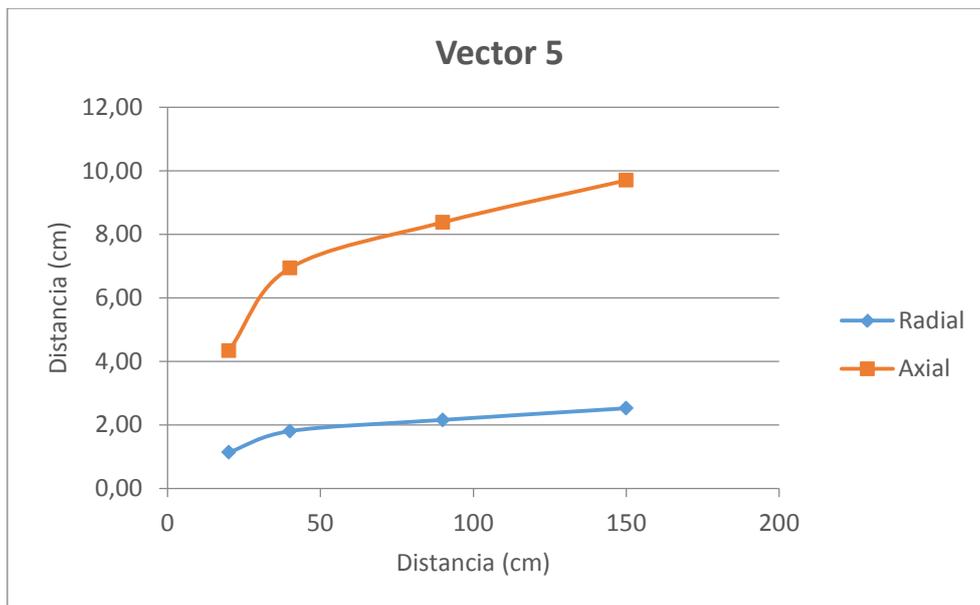


Figura E2 41: Intensidad del avance del fluido en vector 5, de SS bioestabilizada.

SS control:

Vector 1

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
15	0,69	3,35	3,42
50	1,19	5,79	5,91
75	1,56	7,67	7,82
100	1,61	7,98	8,14

Tabla E2 73: Intensidad del avance del fluido en vector 1, SS control.

Vector 2

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
15	1,28	2,94	3,21
50	1,78	4,06	4,43
75	2,06	4,68	5,11
100	2,78	6,36	6,94

Tabla E2 74: Intensidad del avance del fluido en vector 2, SS control.

Vector 3

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
15	1,83	2,38	3
50	2,21	2,85	3,6
75	3,17	4,14	5,22
100	4,08	5,3	6,69

Tabla E2 75: Intensidad del avance del fluido en vector 3, SS control.

Vector 4

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
15	2,26	1,71	2,84
50	3,05	2,32	3,83
75	4,12	3,13	5,18
100	4,86	3,69	6,1

Tabla E2 76: Intensidad del avance del fluido en vector 4, SS control.

Vector 5

T_i (min)	X (cm) ↑	Y (cm) ←	Intensidad del avance (cm/min)
15	2,29	0,74	2,4
50	3,85	1,24	4,05
75	4,88	1,58	5,13
100	5,59	1,81	5,88

Tabla E2 77: Intensidad del avance del fluido en vector 5, SS control.

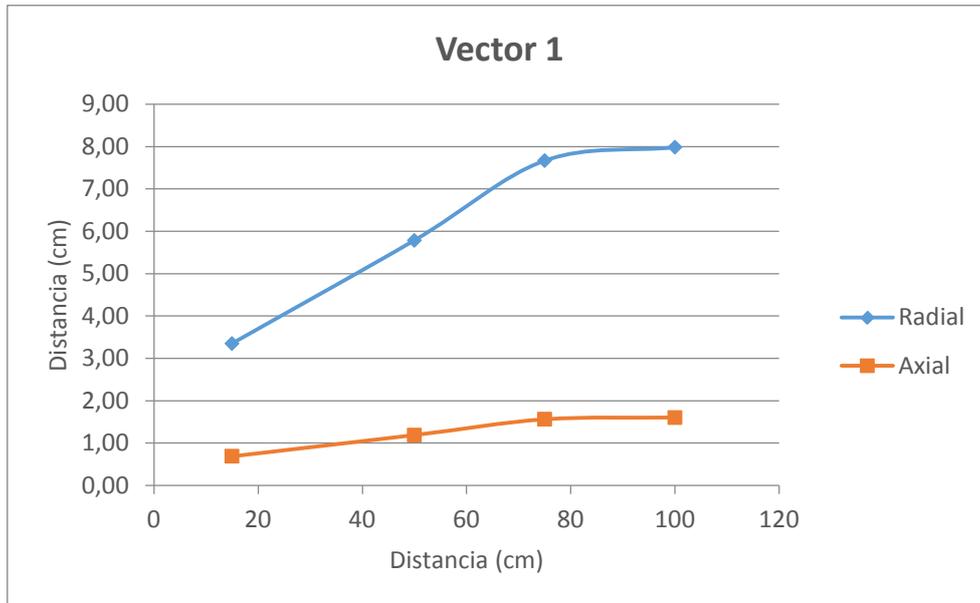


Figura E2 42: Intensidad del avance del fluido en vector 1, de SS control.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

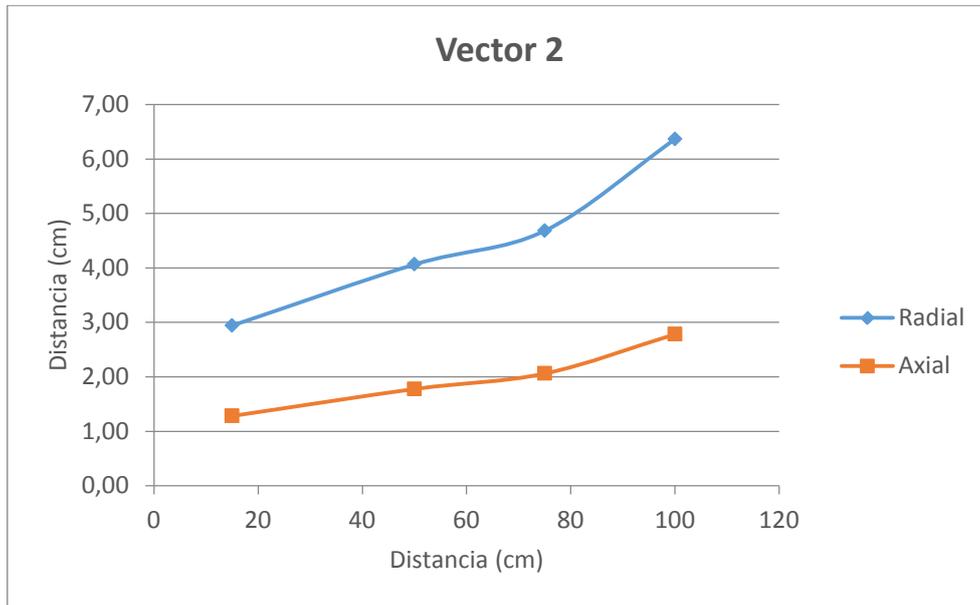


Figura E2 43: Intensidad del avance del fluido en vector 2, de SS control.

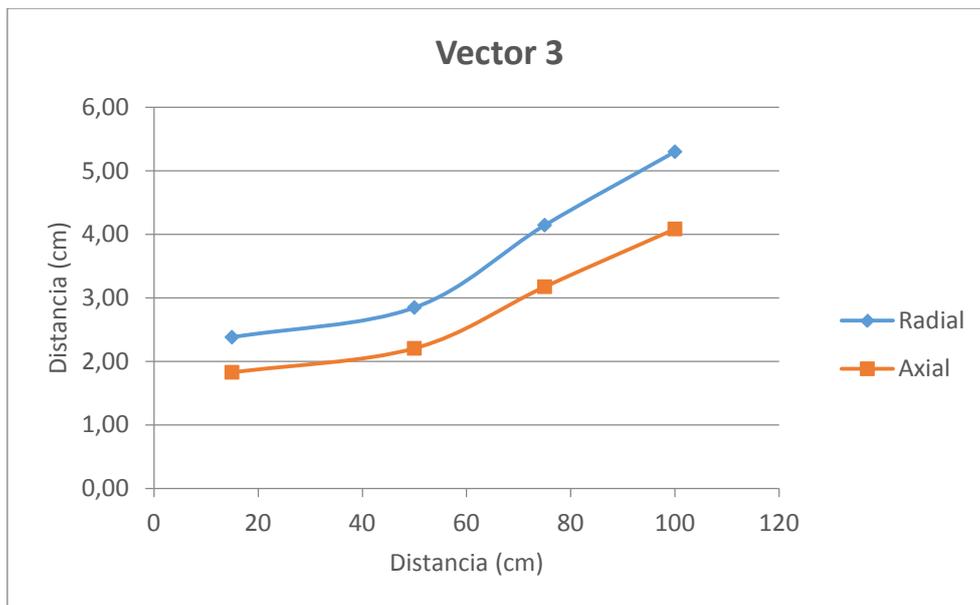


Figura E2 44: Intensidad del avance del fluido en vector 3, de SS control.

Anexo E. Determinación de la porosidad y permeabilidad de las probetas compactadas y tratadas con MICP

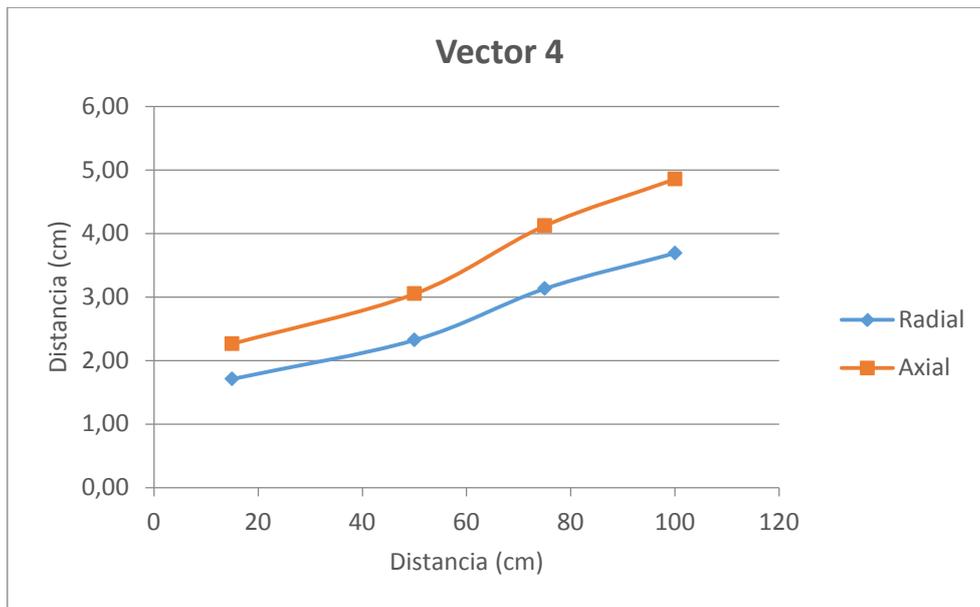


Figura E2 45: Intensidad del avance del fluido en vector 4, de SS control.

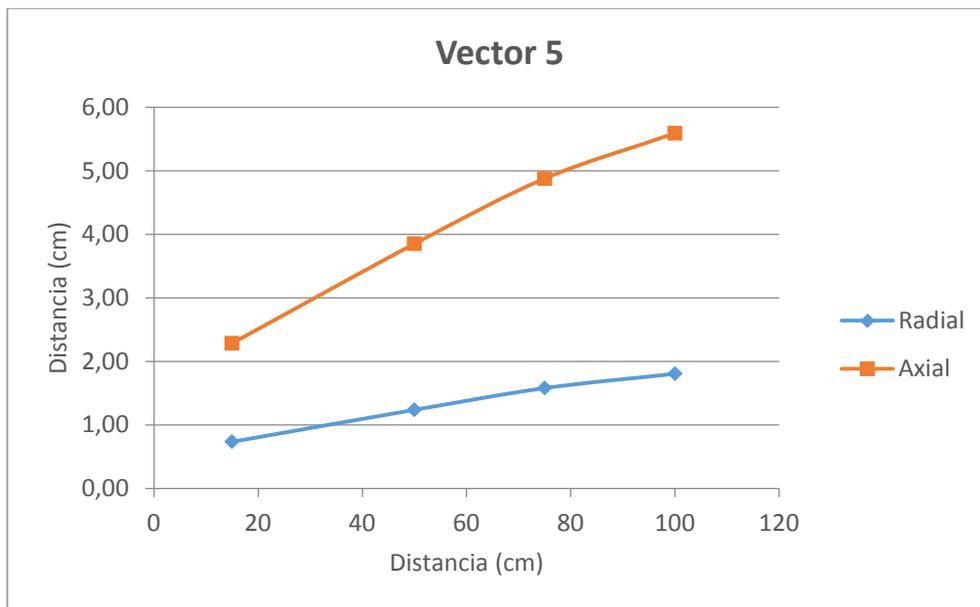


Figura E2 46: Intensidad del avance del fluido en vector 5, de SS control.