

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 993**

51 Int. Cl.:

C04B 28/02 (2006.01)

C04B 24/14 (2006.01)

C04B 28/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2016 PCT/EP2016/074956**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017 WO17076635**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2016 E 16782245 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 3371126**

54 Título: **Composición a base de cemento híbrido manipulada con mayor resistencia a la humectación**

30 Prioridad:

06.11.2015 EP 15193477

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.05.2020

73 Titular/es:

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN (100.0%)
Arcisstrasse 21
80333 München, DE**

72 Inventor/es:

**LIELEG, OLIVER;
MINEV, DIONIS y
GROSSE, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 762 993 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición a base de cemento híbrido manipulada con mayor resistencia a la humectación

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición de material hidrófoba a base de cemento que comprende el uso de una biopelícula bacteriana, o al menos un componente de transporte de hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana, o componente, por lo tanto, para reducir la capacidad de humectación de un material a base de cemento preparado de este modo.

Antecedentes de la invención

10 Los materiales a base de cemento (CBM) tal como el mortero y el hormigón son los materiales usados con mayor frecuencia por la industria de la construcción. Cada año se produce una cantidad de 10 mil millones de toneladas de hormigón, lo cual pone de relieve la importancia económica de los CBM. En Alemania se van a gastar hasta 28 mil millones de euros en trabajos de reparación y mantenimiento de puentes de ferrocarril, sobre todo en el reemplazo de estructuras de hormigón corroídas o dañadas. Una causa principal del daño a los CBM es la penetración del agua que se considera un problema perpetuo en la ingeniería civil. Los CBM típicamente sufren de la invasión de agua que corroe los elementos de soporte de carga que están integrados en el volumen del material. Las microgrietas, por ej., debido a los ciclos de congelación-descongelación, y la propiedad del material poroso hacen que el material cementoso sea más vulnerable al ingreso de agua y exponen a las estructuras edilicias a grandes cantidades de entrada de agua con el tiempo. Además, el agua absorbida promueve la corrosión en las estructuras de acero incrustado (Bentur *et al.*, Steel Corrosion in Concrete: Fundamentals and civil engineering practice, Spon, 1997).

20 Las estrategias existentes para hacer que los materiales a base de cemento sean más resistentes al agua a menudo requieren un tratamiento de superficie del material después del procedimiento de colado y el uso de disolventes orgánicos para lograr una modificación mayor de los CBM con agentes hidrófobos. En particular, se usan aditivos a base de silano, tal como resinas de alcoxilano, alcoxilosilano, siliconato alcalino o silicón para posteriormente hidrofobizar los CBM, como se desvela, por ejemplo, en el documento WO 2007/051833 o EP 0177824. Se supone que dicha modificación después del procedimiento de colado reduce la entrada de agua. Sin embargo, para que sea eficaz, la modificación de la superficie del material tiene que ser completa y sin huecos. Por lo tanto, es costosa y necesita mucho tiempo. Además, los agentes hidrófobos a base de silano a menudo requieren el uso de disolventes orgánicos que se pueden evaporar de los materiales durante un periodo prolongado de tiempo y por lo tanto pueden constituir un peligro potencial para la salud.

30 El documento WO 2014/176061 A1 (HALLIBURTON ENERGY SERV INC [EE.UU.]) del 30 de octubre de 2014, se refiere a procedimientos para el tratamiento de una formación subterránea con una composición que incluye un compuesto fabricado por un microorganismo o un microorganismo con el que se puede fabricar el compuesto.

35 El documento WO 2014/093421 A1 (DOW GLOBAL TECHNOLOGIES LLC [EE.UU.]) del 30 de octubre de 2014, desvela composiciones libres de ligante hidráulico que comprenden un agente de retención de agua derivado de polisacárido soluble en agua para su uso en la preparación de formulaciones de mortero seco, en particular, adhesivos de azulejos a base de cemento, adhesivos, revestimiento a base de ETICS o formulaciones adhesivas y/o lechadas.

El documento DE 695 06 797 T2 (RHONE POULENC CHIMIE [FR]) del 1 de julio de 1999, desvela cementos de fosfomagnesio, que comprenden polisacáridos y proteínas vegetales, y procedimientos para su preparación.

40 Por lo tanto, existe una necesidad de un enfoque alternativo para proporcionar materiales a base de cemento con aumento de la resistencia a la humectación que no requieran un procesamiento posterior laborioso ni que puedan conducir a problemas de salud o ambientales durante un largo periodo de tiempo. El procedimiento para proporcionar dicho material a base de cemento debe ser económico, seguro y adecuado para preparar grandes partidas de material adecuado para una variedad de aplicaciones.

Objetos y sumario de la invención

45 La presente invención aborda esta necesidad y proporciona el uso de una biopelícula bacteriana, o al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana para la preparación de una composición de material hidrófoba a base de cemento. De manera sorprendente, los inventores han descubierto que la adición de un componente biológico que comprende una biopelícula bacteriana o sus componentes a una composición de material a base de cemento, por ej., mortero u hormigón, genera una estructura de superficie específica con una rugosidad micro y nanoscópica aumentada que reduce drásticamente la capacidad de humectación del material y, por lo tanto, hace que sea hidrófobo. En contraste con los enfoques de la técnica anterior mencionados con anterioridad, el enfoque de la presente invención se basa en una modificación del material a base de cemento como tal y, por lo tanto, no requiere un tratamiento suplementario o adicional de la superficie del material para lograr el efecto de transporte de la hidrofobicidad *per se*.

50

55

La biopelícula bacteriana como se usa de acuerdo con la presente invención o el componente de transporte de la hidrofobicidad de la misma se puede proporcionar en la forma de un aditivo que se mezcla con el material a base de cemento.

5 En una realización preferente de la invención, la biopelícula bacteriana como se usa de acuerdo con la presente invención o el aditivo se complementa con la composición de material a base de cemento en una cantidad de aproximadamente 0,5% en peso a aproximadamente 20% en peso del peso seco de la composición final. Se prefiere más que la biopelícula se complemente con la composición de material a base de cemento en una cantidad de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 10% en peso del peso seco de la composición final. En particular, se prefiere que la biopelícula se complemente con la composición de material a base de cemento en una cantidad de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 5% en peso del peso seco de la composición final. En una realización aún más preferente, el aditivo se suplementa a la composición de material a base de cemento en una cantidad de aproximadamente 2% en peso del peso seco de la composición final. En otra realización preferente, el aditivo se suplementa a la composición de material a base de cemento en una cantidad de aproximadamente 5% en peso del peso seco de la composición final.

15 La presente invención se refiere al uso de una biopelícula bacteriana, o de al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana para la preparación de una composición de material hidrófoba a base de cemento.

Un aspecto adicional de la invención se dirige al uso de una biopelícula bacteriana, o de al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana para reducir la capacidad de humectación de una composición de material a base de cemento.

20 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al procedimiento para hacer hidrófoba una composición de material a base de cemento, que comprende la adición de una cantidad eficaz de una biopelícula bacteriana, o de al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana a la composición de material a base de cemento.

25 En una realización específica del uso o el procedimiento de la presente invención como se define con anterioridad en la presente memoria, la cantidad de biopelícula bacteriana (contenido de biopelícula; bc) en la composición de material a base de cemento es de aproximadamente 0,5% en peso a aproximadamente 20% en peso del peso seco de la composición final. Se prefiere que la cantidad de biopelícula bacteriana en la composición de material a base de cemento sea de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 15% en peso. Se prefiere más que la cantidad de biopelícula bacteriana en la composición de material a base de cemento sea de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 10% en peso. En particular, se prefiere que la cantidad de biopelícula bacteriana en la composición de material a base de cemento sea de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 5% en peso. En una realización aún más preferente, la cantidad de biopelícula bacteriana en la composición de material a base de cemento es de aproximadamente 2% en peso del peso seco de la composición final. En otra realización preferente, la cantidad de biopelícula bacteriana en la composición de material a base de cemento es de aproximadamente 5% en peso del peso seco de la composición final.

35 En una realización preferente del uso o el procedimiento de la presente invención como se ha mencionado con anterioridad, la biopelícula bacteriana es una biopelícula que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en bacterias de la especie *Bacillus subtilis* y/o del género *Pseudomonas*. En realizaciones más preferentes, dichas bacterias son bacterias de *Bacillus subtilis* 3610, *Bacillus subtilis natto*, *Pseudomonas fluorescens* y/o *Pseudomonas putida*. En particular, se prefieren las bacterias de *Bacillus subtilis* 3610.

40 En una realización preferente adicional de la presente invención, dichas bacterias son bacterias de tipo salvaje. En aún otra realización preferente, dichas bacterias son bacterias modificadas genéticamente. La modificación genética puede conducir a una alteración, preferentemente un aumento, en la producción de biopelícula; una alteración, preferentemente un aumento, en la expresión de componentes de la biopelícula extracelulares hidrófobos y/o una mejora de la maleabilidad de la biopelícula o de los componentes de la biopelícula.

45 En otra realización preferente de la presente invención, la biopelícula bacteriana como se ha mencionado con anterioridad en la presente memoria se obtiene por el cultivo de bacterias en un medio de cultivo líquido, o sobre superficies sólidas. En particular, se prefiere que dichas bacterias se cultiven en placas de agar. Incluso se prefiere más que dichas bacterias se cultiven en placas de LB-agar o placas de agar LB^{plus}. Una biopelícula bacteriana obtenida de acuerdo con la presente invención puede, en una realización específica adicional, estar liofilizada.

50 En aún otra realización preferente del uso o el procedimiento de acuerdo con la presente invención como se ha descrito con anterioridad, dicha composición de material hidrófoba a base de cemento muestra un aumento de la rugosidad de la superficie en comparación con una composición de material a base de cemento que no comprende una biopelícula bacteriana, o en comparación con una composición de material a base de cemento que no comprende al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana.

55 En una realización preferente adicional del uso o el procedimiento de acuerdo con la presente invención como se ha descrito con anterioridad, dicha composición de material hidrófoba a base de cemento presenta un aumento de la

densidad de las estructuras alargadas de tipo espiga en su superficie en comparación con una composición de material a base de cemento que no comprende una biopelícula bacteriana, o en comparación con una composición de material a base de cemento que no comprende al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana. En una realización en particular preferente de la presente invención, dichas estructuras alargadas de tipo espiga revisten aproximadamente 50 a 90% o más de la totalidad de la superficie de la composición.

En una realización preferente adicional del uso o el procedimiento de acuerdo con la presente invención como se ha descrito con anterioridad dicha composición de material hidrófoba a base de cemento es hidrófoba con relación al agua blanda, agua salada y/o mezclas de alcohol y agua. En una realización específica adicional, dicha composición de material hidrófoba a base de cemento forma un ángulo de contacto θ con una gotita de agua blanda, agua salada o una mezcla de alcohol y agua de aproximadamente 90°. En una realización en particular preferente, dicho ángulo de contacto θ es de aproximadamente 90° a 120°.

En aún otra realización preferente de la presente invención, dicha composición de material hidrófoba a base de cemento comprende o consiste esencialmente en un mortero, un hormigón hidráulico, un hormigón no hidráulico o un estuco de cemento y cal.

En una realización preferente adicional del uso o el procedimiento de acuerdo con la presente invención dicho material hidrófobo a base de cemento tiene una relación de agua a cemento (wc) de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,7. En una realización más preferente, dicha relación de agua a cemento es de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,6. En una realización aún más preferente, dicha relación de agua a cemento del material hidrófobo a base de cemento es de aproximadamente 0,5.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra que la resistencia a la humectación del mortero se aumenta por la adición de una biopelícula de *B. subtilis* a la mezcla de mortero. **Figura 1 (A)**: Cuando se añade 1% de biopelícula de *Bacillus subtilis* a un mortero estándar (izquierda) durante la generación de la muestra, el material híbrido (derecha) se vuelve hidrófobo; cuando se coloca una gotita de agua sobre el mortero híbrido, el agua ya no se propaga inmediatamente. **Figura 1 (B)**: Representación esquemática del procedimiento de producción de un mortero híbrido hidrófobo. También se obtienen las propiedades repelentes al agua del material híbrido cuando una variante de biopelícula hidrófila se usa como un agregado. Las imágenes se adquirieron inmediatamente después de que las gotas de agua se han colocado sobre las superficies del mortero. Las biopelículas se cultivaron en 1,5% (p/v) de placas de agar enriquecidas con un medio LB (Luria/Miller) o LB^{plus} como se presenta a continuación: se obtuvieron cultivos de un día para el otro de la cepa bacteriana a partir de existencias de glicerol congelado por medio de inoculación en 15 ml de medio LB durante 16 horas en una incubadora con agitación a 30 °C. Después, 100 μ l del cultivo de un día para el otro se sembraron sobre las placas de agar y se incubaron durante 24 horas a 30 °C. Las imágenes para el análisis del ángulo de contacto se adquirieron desde una vista lateral con una cámara digital comercial montada sobre un soporte perimetral y equipada con una lente de distancia focal variable. La evaluación del ángulo de contacto se llevó a cabo mediante el uso del software de análisis de imágenes ImageJ con una herramienta de complemento de análisis tipo drop snake (adaptado de A. Stalder, G. Kulik, D. Sage, L. Barbieri, and P. Hofmann, "A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles", Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2006). Las muestras de mortero de híbrido enriquecidas con biopelícula se curaron a temperatura ambiente durante 4 días antes de que se llevaran a cabo mediciones del ángulo de contacto.

La **Figura 2** ilustra las micro y nano-rugosidades tanto en la superficie como en el volumen a granel del mortero híbrido y el mortero sin modificar; el mortero híbrido muestra un fuerte aumento de las micro y nano-rugosidades tanto en la superficie como en el volumen a granel. Microscopio electrónico de barrido (adquirido en JEOL JSM-6060LV, JEOL EE.UU., Inc. Peabody, EE.UU.; la **Figura 2 (A)**) y las imágenes de perfilometría de luz (adquiridas en un Perfilómetro μ Surf, NanoFocus AG, Oberhausen, Alemania; la **Figura 2 (B)**) de superficies no modificadas (izquierda) y mortero híbrido (derecha). La muestra de mortero híbrido exhibe características de superficie fuertemente alteradas, tanto en la superficie exterior como en la superficie interior del material.

La **Figura 3** representa los resultados de las pruebas con respecto a los ángulos de contacto de las gotitas de fluido en diferentes muestras de mortero enriquecidas con biopelículas. **Figura 3 A**: se comparan las muestras de mortero híbrido con diferentes cantidades de biopelícula tanto en una forma recién cosechada como en una forma liofilizada, y los valores de w/c. En una relación de w/c de 0,5, el ángulo de contacto es mayor cuando se añade 2% (p/p) de biopelícula. Cuando se varía la relación de w/c o cuando se usa la biopelícula liofilizada en lugar de biopelícula recién cosechada, las propiedades hidrófobas de las muestras de mortero híbrido se mantienen. Cuando se usa la biopelícula liofilizada en una relación de w/c de 0,5, el ángulo de contacto es mayor cuando se añade 10% (p/p) de biopelícula. También se observa alta resistencia a la humectación con relación a la humectación con agua de mar (600 mM de NaCl). **Figura 3 B**: El ángulo de contacto del agua sobre el mortero híbrido disminuye sólo débilmente con el tiempo. El mortero no modificado se humedece inmediatamente mientras que las muestras híbridas seleccionadas muestran incluso mayor resistencia a la humectación que politetrafluoroetileno (PTFE, nombre comercial: Teflon). Las barras de error indican el error estándar de la media.

La **Figura 4A** representa los resultados de las pruebas con respecto a los ángulos de contacto de las gotitas de fluido en diferentes muestras de mortero enriquecidas con biopelículas. Para la prueba se usan las cepas mutantes de *B. subtilis* TasA, BslA y EpsA-0. Cuando se usan cepas mutantes de *B. subtilis* en lugar de *B. subtilis* de tipo salvaje, se mantienen las propiedades hidrófobas de las muestras del mortero híbrido. La **Figura 4B** muestra la elevación capilar del agua en el mortero estándar sin modificar y el mortero híbrido hidrófobo después de 5 segundos y 24 horas. El color gris claro representa la elevación del agua dentro de los materiales. Las pruebas muestran que la elevación capilar del agua en el mortero híbrido en gran medida disminuye en comparación con el mortero estándar sin modificar.

Descripción detallada de las realizaciones

10 Si bien la presente invención se describe con respecto a realizaciones particulares, la presente descripción no se ha de interpretar en un sentido limitativo.

Antes de describir en detalle ejemplos de realización de la presente invención, se presentan definiciones importantes para comprender la presente invención.

15 Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de "un" y "una" también incluyen los respectivos plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

En el contexto de la presente invención, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" denotan un intervalo de exactitud que los expertos en la técnica comprenderán para aún garantizar el efecto técnico de la característica en cuestión. El término normalmente indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 20\%$, preferentemente $\pm 15\%$, más preferentemente $\pm 10\%$, y aún más preferentemente $\pm 5\%$.

20 Se ha de comprender que la expresión "que comprende" no es limitativa. Para los fines de la presente invención, se considera que la expresión "que consiste en" o "que consiste esencialmente en" es una realización preferente de la expresión "que comprende". Si de aquí en adelante en la presente memoria se define un grupo que comprende al menos un cierto número de realizaciones, también está destinado a abarcar un grupo que preferentemente consiste sólo en tales realizaciones.

25 Además, los términos "(i)", "(ii)", "(iii)" o "(a)", "(b)", "(c)", "(d)", o "primero", "segundo", "tercero", etc., y similares en la descripción o en las reivindicaciones, se usan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Se ha de comprender que los términos usados de esta manera son intercambiables bajo circunstancias adecuadas y que las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria son capaces de funcionar en otras secuencias que las descritas o ilustradas en la presente memoria. En el caso en que los términos se refieren a las etapas de un procedimiento o uso, no hay coherencia de tiempo o intervalos de tiempo entre las etapas, es decir, las etapas se pueden llevar a cabo de manera simultánea o puede haber intervalos de tiempo de segundos, minutos, horas, días, semanas, etc., entre tales etapas, a menos que se indique lo contrario.

30 Se ha de comprender que la invención no se limita a la metodología, protocolos, reactivos, etc., particulares descritos en la presente memoria dado que estos pueden variar. Se ha de comprender también que la terminología usada en la presente memoria tiene sólo el propósito de describir realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que se limita únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados comprendidos comúnmente por los expertos en la técnica.

35 De acuerdo con la invención, se obtiene una composición de material hidrófoba a base de cemento, en la que dicha composición comprende una biopelícula bacteriana, o al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana. El término "hidrófobo" como se usa en la presente memoria se refiere a la propiedad de un aumento de la resistencia a la humectación y la reducción de la capacidad de humectación de la composición. La "hidrofobicidad" sobre una superficie se comprende típicamente como una capacidad de humectación limitada de un líquido que está situado en una superficie sólida. Se supone que la topografía y la composición ásperas de la superficie desempeñan un papel esencial en la creación de una superficie hidrófoba. Una gotita de agua situada sobre una superficie hidrófoba tiende a establecer el estado de energía más bajo posible. Por medio de la formación de una forma casi esférica en la superficie y el establecimiento de un área de superficie mínima para un volumen fijo se puede lograr tal estado de baja energía. La hidrofobicidad se puede cuantificar de acuerdo con cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Se prefiere cuantificarla de acuerdo con el ángulo de contacto formado por las gotas sobre una superficie. Dicho ángulo de contacto generalmente se define para superficies lisas de acuerdo con la ecuación de Young [Ec. 1], que se representa a continuación:

$$\cos(\theta) = (\gamma_{sv} - \gamma_{sl}) / \gamma_{lv} \text{ [Ec. 1]}$$

40 En esta ecuación γ_{sv} , γ_{sl} y γ_{lv} caracterizan las energías libres interfaciales por área de unidad de las interfaces de sólido-vapor (sv), sólido-líquido (sl) y líquido-vapor (lv). Para superficies no lisas, por ej., superficies ásperas como

las que se supone están en gran parte presentes en las composiciones de material a base de cemento, se aplica una ecuación de Young modificada (ecuación de Wenzel), como se representa a continuación:

$$\cos(\theta') = r(\gamma_{sv} - \gamma_{sl})/\gamma_{lv} \quad [\text{Ec. 2}]$$

5 La ecuación de Wenzel introduce un factor de rugosidad $r > 1$ que describe la relación del área áspera al área lisa proyectada. Para el propósito de la presente invención, la hidrofobicidad se calcula preferentemente como un ángulo de contacto de acuerdo con la ecuación de Wenzel [Ec. 2] o sus derivados.

10 La composición de material a base de cemento, en la que dicha composición comprende una biopelícula bacteriana, o al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana, puede tener un ángulo de contacto θ con una gotita de líquido de aproximadamente 90° o más. Por ejemplo, el ángulo de contacto puede ser de aproximadamente 90° a aproximadamente 120° , por ej., aproximadamente 90° , 95° , 100° , 105° , 110° , 115° , 120° o cualquier valor entre estos valores. En realizaciones adicionales, el ángulo de contacto puede ser mayor que 120° , por ej., 125° , 130° , 135° , 140° , 145° , 150° o más. El ángulo de contacto puede ser esencialmente estable durante un periodo de tiempo. La gotita de líquido puede ser una gotita de agua blanda, una gotita de agua salada o una gotita de una mezcla de alcohol y agua. En el contexto de la medición de los ángulos de contacto, "agua" o "agua blanda" se refiere al suministro de agua o de agua pura, por ej., agua bidestilada (ddH₂O). El término "agua salada" se refiere en este contexto a agua con un contenido de sal típico del agua de mar, preferentemente de aproximadamente 3,5% en peso de NaCl, más preferentemente de aproximadamente 600 nM de NaCl en ddH₂O. Una "mezcla de alcohol y agua" como se usa con anterioridad en la presente memoria se refiere a una mezcla de ddH₂O y etanol, que comprende preferentemente de aproximadamente 80% a aproximadamente 0,05% de etanol. Por ejemplo, la mezcla de alcohol y agua puede comprender aproximadamente 75%, 70%, 65%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o 5% de etanol o cualquier cantidad entre estos valores. La composición de material a base de cemento que comprende una biopelícula bacteriana, o que comprende al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana puede tener un ángulo de contacto θ de 90° o más con una gotita de ddH₂O, una gotita de agua salada que comprende aproximadamente 3,5% en peso de NaCl, o una gotita de una mezcla de alcohol y agua que comprende 70% de alcohol.

15 El ángulo de contacto se puede medir con cualquier técnica adecuada conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la medición se puede llevar a cabo con una configuración de medición que comprende un soporte perimetral con un montaje de cámara, que es ajustable en el eje vertical y horizontal, una cámara, preferentemente con una lente de alta resolución. Además, la configuración puede comprender una fuente luminosa de manera tal que la luz se dirige desde arriba con una ligera declinación, para condiciones de iluminación óptimas. La medición se puede llevar a cabo a una temperatura definida, preferentemente a temperatura ambiente, por medio de la colocación de un volumen definido de líquido, por ej., una o más gotitas de 10 a 20 μl de ddH₂O sobre la superficie de una composición de material a base de cemento. Las gotitas de líquido se pueden colocar en diferentes posiciones, por ej., en 2, 3, 4 o más posiciones diferentes de la composición de material. Preferentemente, debe haber una separación de aproximadamente 3 a 5 mm entre cada gotita a través del diámetro. Inmediatamente después de que las gotitas de líquido se colocan sobre la superficie, se toma una primera imagen. Posteriormente, por ej., después de uno o más intervalos de tiempo definidos de, por ejemplo, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 10 minutos, etc., se registran imágenes adicionales, lo que permite documentar el comportamiento del ángulo de contacto a lo largo del tiempo. Después, las imágenes registradas se pueden analizar por medio de la determinación del contorno de las gotitas de líquido, por ej., por medio del seguimiento del contorno de la gotita con una herramienta de spline, que permite determinar directamente un ángulo de contacto en la unión de tres fases. En una realización particularmente preferente, la medición se puede llevar a cabo como describe a continuación en el Ejemplo 2 en la presente memoria. También se contemplan otros procedimientos para determinar el ángulo de contacto θ , son conocidos por los expertos en la técnica y que pueden derivarse de fuentes bibliográficas adecuadas tal como T. T. Chau, "A review of factors that affect contact angle and implications for flotation practice", Minerals Engineering, 22, 213 a 219, 2009; o A.W. Neumann and R.J. Good, "Techniques of Measuring Contact Angles", Surface and Colloid Science, Vol. 11, Experimental Methods, 1979.

20 La expresión "material a base de cemento" como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier material que comprende una cierta cantidad de cemento. Típicamente, el material a base de cemento se distingue por su propiedad para ser usado en presencia de agua en los cementos hidráulicos y no hidráulicos. Los cementos no hidráulicos se componen típicamente de hidróxido de calcio y se endurecen por carbonatación en presencia de dióxido de carbono bajo condiciones secas. Los cementos hidráulicos, que se pueden endurecer al aire o bajo condiciones de humedad, típicamente se componen de una mezcla de silicatos y óxidos tal como $2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$, $3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$, $3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3$ y $4\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$. Además, la mezcla puede comprender sulfatos. El cemento está presente típicamente en la forma de granos cuyo diámetro puede oscilar del intervalo de submicrones, hasta 100 μm . Tras la mezcla con agua se inicia un procedimiento de hidratación que conduce a la generación de cristales, en particular de cristales de hidrato de silicato de calcio fibrosos, e hidróxido de calcio y cristales de hidrato de óxido de calcio • óxido de aluminio • óxido de hierro. En presencia de sulfatos, típicamente se desarrollan cristales de etringita y monosulfato (también denominados cristalitas de hidratación), por ej., en la superficie del material.

Un cemento preferido incluido en un material a base de cemento obtenido de acuerdo con la presente invención es cal apagada como cemento no hidráulico. Un cemento hidráulico preferido es el cemento Portland. También se prevén cementos alternativos tal como mezclas de cemento Portland que incluyen cemento de alto horno, cemento de humo de sílice, cemento puzolánico, cemento de cenizas volantes, así como también cemento que contiene ceniza volcánica, cementos blancos. Otros tipos de cemento, combinaciones y mezclas, que también están previstas por la presente invención, son conocidas por los expertos en la técnica o se pueden derivar de fuentes bibliográficas adecuadas tal como A.M. Neville, *Properties of Concrete*, 5° Ed., 2011.

Las composiciones de material a base de cemento obtenidas de acuerdo con la presente invención pueden comprender, además de cemento como se ha descrito con anterioridad en la presente memoria, agua y componentes adicionales. Por ejemplo, la composición de material a base de cemento puede comprender granos de arena con un tamaño de hasta 4 mm, o granos más grandes con un tamaño mayor que 4 mm. Las composiciones de material a base de cemento que comprenden granos de arena menores que 4 mm se denominan "morteros" o "mezclas de mortero". Las composiciones de material a base de cemento que comprenden granos de arena o grava mayores que 4 mm, por ej., 5, 10, 15, 20, 25 mm o más se denominan "hormigón". El hormigón puede, en ciertas realizaciones, comprender agregados de construcción, es decir, un material grueso con tamaños de partícula mayores que 4 mm que incluyen arena, grava, piedras trituradas o piedras tal como granito triturado o piedra caliza triturada, o material reciclado. Las composiciones de material a base de cemento que comprenden, además de cemento, cal o Ca(OH)_2 y granos de arena menores que 4 mm se denominan "estuco de cemento y cal". En realizaciones preferentes, la composición de material a base de cemento obtenida de acuerdo con la invención es, comprende, o consiste esencialmente en mortero, hormigón o estuco de cemento y cal. Las composiciones de mortero y hormigón se pueden proporcionar como variantes hidráulicas o no hidráulicas, por ej., dependiendo del uso de los cementos hidráulicos o no hidráulicos como se define con anterioridad en la presente memoria.

La consistencia de las composiciones de material a base de cemento obtenidas de acuerdo con la presente invención depende en cierta medida de la cantidad de agua presente, es decir, la relación del peso del agua y el peso del cemento (w/c) en la composición. Esta relación en peso del agua y el cemento se determina típicamente de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$w/c = \frac{m_{H_2O}}{m_{Cemento}}, \left[\frac{g}{g} \right] \text{ [Ec. 3]}$$

En realizaciones específicas, las composiciones de material a base de cemento obtenidas de acuerdo con la invención pueden tener una relación de agua a cemento (w/c) de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,7, por ej., una relación de w/c de aproximadamente 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65 o 0,7, o de cualquier valor entre estos valores. En realizaciones preferentes, las composiciones de material a base de cemento de acuerdo con la invención pueden tener relación de w/c de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,6. En una realización particularmente preferente, las composiciones de material a base de cemento de acuerdo con la invención pueden tener una relación de w/c de aproximadamente 0,5. La relación de w/c del material se puede ajustar de acuerdo con el uso previsto, así como también la aplicación o las consideraciones climáticas. Por ejemplo, con el fin de aumentar la resistencia y la durabilidad de la composición de una relación inferior, por ej., se puede emplear una de 0,3, 0,4 o 0,45. Las dificultades de procesamiento en tales proporciones bajas se pueden superar por medio de la adición de aditivos tal como plastificantes o superplastificantes para aumentar la capacidad de flujo. Una alta relación de w/c de aproximadamente 0,65 o 0,7 puede conducir a una segregación de cemento de otros componentes de la composición, por ej., granos de arena y puede proporcionar una composición que comprende agua no consumida por medio de hidratación. Tal composición puede tener un mayor número de poros, grietas y fracturas microscópicas y puede mostrar una tendencia a encogerse con el tiempo. Una alta relación de w/c en consecuencia se puede usar para reducir la resistencia final de la composición del material a base de cemento.

En realizaciones específicas, las composiciones de material a base de cemento obtenidas de acuerdo con la invención pueden comprender componentes o aditivos adicionales. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender agregados químicos que pueden tener una influencia en la tasa a la que se endurece la composición, o en la resistencia a la tracción de la composición. Los agregados adecuados previstos por la presente invención son aceleradores que aceleran el procedimiento de hidratación del cemento, tal como CaCl_2 , $\text{Ca(NO}_3)_2$ o NaNO_3 ; retardadores, que ralentizan el procedimiento de hidratación del cemento, tal como glucosa, sacarosa, ácido tartárico o ácido cítrico. También se prevén agentes de arrastre de aire que añaden y arrastran burbujas de aire y de ese modo ayudan a reducir el daño a la composición durante los ciclos de congelación-descongelación. Los agentes de arrastre de aire adecuados son, por ejemplo, agentes tensioactivos. Otros aditivos, a usar en combinación con cualquiera de los anteriores, o solos, son plastificantes tal como lignosulfato, o superplastificantes tal como superplastificantes basados en éter de policarboxilato (PCE); o pigmentos para cambiar el color de la composición. Otro aditivo químico previsto es un inhibidor de la corrosión, por ej., hidrazina, hexamina o fenilendiamina; un antioxidante tal como sulfito; o un agente de enlace, que se puede usar para enlazar capas de composición previamente presentes con el nuevo material. Una clase adicional de aditivos que pueden estar presentes en las composiciones del material a base de cemento de acuerdo con la presente invención son los agregados minerales.

Los ejemplos de agregados minerales son cenizas volantes, escoria de alto horno granulada molida (EAHGM/GG-BS), humo de sílice o metacaolín de alta reactividad (HRM). Las composiciones del material a base de cemento de acuerdo con la presente invención, en particular, las composiciones de hormigón, además pueden comprender refuerzos. Tales refuerzos aumentan la resistencia a la tracción del material y pueden estar incrustados dentro de la composición. Los ejemplos de refuerzo a emplear en el contexto de la presente invención incluyen barras de acero, 5 mallas de acero o alambres de acero, fibras de acero, fibras de vidrio y fibras o mallas de materiales plásticos o textiles.

El término "biopelícula bacteriana" como se usa en la presente memoria se refiere a una comunidad multicelular de una o más especies de microorganismos bacterianos, preferentemente microorganismos bacterianos no patógenos, 10 incrustados en una matriz de biopolímero extracelular con autoencapsulamiento de protección. La matriz de biopolímero extracelular típicamente está compuesta por polisacáridos, proteínas, y/o ácidos nucleicos producidos por las bacterias. Se supone que dentro de una biopelícula bacteriana existe una población heterogénea de células individuales, en la que dichas células pueden haber seguido diferentes vías de desarrollo. La presente invención contempla el uso de cualquier biopelícula bacteriana adecuada como componente de una composición de material hidrófoba a base de cemento, o como aditivo a dicha composición de material a base de cemento. Una biopelícula bacteriana adecuada puede, por ejemplo, ser una biopelícula que demuestra propiedades hidrófobas. Otra biopelícula adecuada puede, por ejemplo, ser una biopelícula que demuestra propiedades hidrófilas. Preferentemente, una biopelícula bacteriana adecuada puede mostrar un ángulo de contacto θ con una gotita de ddH₂O de 90° o más, por ejemplo, de aproximadamente 90° a aproximadamente 120°. El ángulo de contacto puede, 20 en realizaciones específicas, ser de 90°, 95°, 100°, 105°, 110°, 115°, 120° o cualquier valor entre estos valores. La adecuación, es decir, el ángulo de contacto θ de la biopelícula con una gotita de ddH₂O, preferentemente se puede probar o determinar de acuerdo con la metodología descrita con anterioridad en la presente memoria, o como se indica a continuación en los ejemplos de la presente memoria. Las biopelículas bacterianas adecuadas además están compuestas preferentemente sobre bacterias no patógenas, en particular bacterias no patógenas no humanas. En una realización específica adicional, una biopelícula bacteriana adecuada puede ser una biopelícula que es capaz de transmitir propiedades hidrófobas a una composición de material a base de cemento, si se añade en una cantidad de aproximadamente 0,5% en peso a aproximadamente 20% en peso del peso seco de la composición final. La expresión "propiedades hidrófobas de la composición" significa que dicha composición muestra un ángulo de contacto θ con una gotita de ddH₂O de 90° o más, por ejemplo, de aproximadamente 90° a aproximadamente 120°, de manera más específica de aproximadamente 90°, 95°, 100°, 105°, 110°, 115°, 120° o cualquier valor entre 30 estos valores, si dicha gotita de agua se coloca en una composición de material a base de cemento que comprende dicha biopelícula bacteriana. La adecuación, es decir, la biopelícula que comprende un ángulo de contacto θ de la composición con una gotita de ddH₂O, preferentemente se puede probar o determinar de acuerdo con la metodología descrita en la presente memoria, en particular, como se indica en los Ejemplos a continuación.

Una biopelícula bacteriana usada de acuerdo con la presente invención puede, por ejemplo, estar compuesta por bacterias grampositivas o gramnegativas, o un consorcio de bacterias grampositivas y gramnegativas. Los ejemplos de bacterias grampositivas que forman biopelículas previstas por la presente invención son *Bacillus sp.*, y bacterias del ácido láctico tal como *Lactobacillus plantarum* o *Lactococcus lactis*. Los ejemplos de bacterias gramnegativas que forman biopelículas previstas por la presente invención incluyen el género *Escherichia*, por ej., *E. coli*, y el género *Pseudomonas*, por ej., *P. aeruginosa*, *P. putida* o *P. fluorescens*. 35 40

En una realización preferente de la presente invención, la biopelícula bacteriana es una biopelícula que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en bacterias de la especie *Bacillus subtilis*. En realizaciones específicas, la biopelícula bacteriana es una biopelícula que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en bacterias de tipo salvaje o no domesticadas, preferentemente bacterias de tipo salvaje o no domesticadas de la especie *Bacillus subtilis*. En una realización particularmente preferente adicional de la presente invención, la biopelícula bacteriana es una biopelícula que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en bacterias de la cepa de *Bacillus subtilis* NCIB 3610 (en adelante denominada *B. subtilis* 3610 de tipo salvaje), que es una cepa de tipo salvaje *B. subtilis* no domesticada. En una realización particularmente preferente adicional de la presente invención, la biopelícula bacteriana es una biopelícula que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en bacterias de la cepa de *Bacillus subtilis natto* (en adelante denominada *B. subtilis natto*). En una realización específica la biopelícula bacteriana es una biopelícula que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en bacterias de la especie *Bacillus subtilis*, con la condición de que la cepa *B. subtilis* B1 no esté comprendida. En realizaciones adicionales preferentes, la biopelícula bacteriana es una biopelícula que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en bacterias del género *Pseudomonas*. 50 55 En una realización particularmente preferente de la invención, la biopelícula bacteriana es una biopelícula que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en bacterias de la especie *Pseudomonas fluorescens*. En aún otra realización particularmente preferente de la invención, la biopelícula bacteriana es una biopelícula que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en bacterias de la especie *Pseudomonas putida*. En realizaciones específicas, la biopelícula bacteriana puede comprender más de una cepa, especie o género bacteriano. Por ejemplo, la biopelícula bacteriana puede comprender un consorcio de dos o más cepas de *B. subtilis*, o de dos o más especies de *Pseudomonas*. Se prevén consorcios adicionales que comprenden *B. subtilis* y una especie de *Pseudomonas*, por ej., *P. fluorescens* o *P. putida*. Tales consorcios pueden, por ej., comprender *B. subtilis* 3610 junto con *P. fluorescens* o junto con *P. putida*. 60

En ciertas realizaciones una biopelícula bacteriana usada de acuerdo con la invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en las bacterias que han sido manipuladas o modificadas genéticamente. Por ejemplo, tal modificación genética puede conducir a una alteración en la producción de la biopelícula y/o una alteración en la expresión de los componentes hidrófobos extracelulares de la biopelícula y/o una mejora de la maleabilidad de la biopelícula o de los componentes de la biopelícula. El término "modificación genética" como se usa en la presente memoria significa que una bacteria, preferentemente *B. subtilis* o *Pseudomonas sp.*, se altera por cualquier medio y procedimiento genético adecuado conocido por los expertos en la técnica con el fin de cambiar la producción de la biopelícula, preferentemente para aumentar la producción de la biopelícula y/o para cambiar la expresión de los componentes extracelulares de la biopelícula, preferentemente para aumentar la expresión de los componentes extracelulares de la biopelícula y/o para cambiar, preferentemente mejorar, la maleabilidad de la biopelícula o de los componentes de la biopelícula. En una realización preferente, el término "modificación genética" significa que una bacteria, preferentemente *B. subtilis* o *Pseudomonas sp.*, se altera por cualquier medio y procedimiento genético adecuado conocido por los expertos en la técnica con el fin de alterar la hidrofobicidad, preferentemente para aumentar la hidrofobicidad de la biopelícula, en particular, con el fin de cambiar la producción de la biopelícula, preferentemente para aumentar la producción de la biopelícula y/o para cambiar la expresión de los componentes extracelulares hidrófobos de la biopelícula, preferentemente para aumentar la expresión de los componentes extracelulares hidrófobos de la biopelícula. Una modificación genética como se usa en el contexto de la presente invención se refiere preferentemente a un enfoque con el que se proporciona una bacteria, por ej., *B. subtilis* o *Pseudomonas sp.* con un elemento genético que, tras su expresión en la bacteria, permite la producción de biopelículas o componentes de biopelículas, y/o la expresión de los componentes extracelulares hidrófobos de la biopelícula y/o la mejora de la maleabilidad de la biopelícula o de los componentes de la biopelícula.

En una realización, la biopelícula bacteriana usada de acuerdo con la presente invención se puede obtener por el cultivo de bacterias, por ej., cepas de *B. subtilis* o especies de *Pseudomonas* como se menciona con anterioridad en la presente memoria, en un medio de cultivo líquido. Se puede usar cualquier cultivo líquido adecuado conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un medio basal o complejo que comprende una fuente de carbono tal como glucosa, fructosa o sacarosa, agua, una o más sales, así como también fuentes de aminoácidos tal como extracto de levadura, triptona, peptona, sangre, hidrolizado de caseína o extracto de carne. Un medio complejo líquido preferido para ser usado en el contexto de la presente invención es un medio LB (caldo de lisogenia), que típicamente comprende extracto de levadura, por ej., en una concentración de 5 g/l, triptona, por ej., en una concentración de 10 g/l y NaCl, por ej., en una concentración de 10 g/l (designado LB-Miller), de 5 g/l (designado como LB-Lennox), o 0,5 g/l (designado LB-Luria). El medio además puede comprender una fuente de carbono tal como glucosa, por ej., en una concentración de 1 g/l, o sacarosa, por ej., en una concentración de 1 g/l. Un medio complejo líquido preferido adicional para ser usado en el contexto de la presente invención es un medio LB plus (LB+), que típicamente comprende, además de los ingredientes del medio LB descrito con anterioridad, glicerol, por ej., en una concentración de 1% (vol/vol) y $MnSO_4$, por ej., en una concentración de 0,1 mM. En una realización alternativa, se puede usar un medio líquido 2xSGG que típicamente comprende un caldo nutriente (por ej., en una cantidad de 1,6 g por 100 ml), KCl (por ej., en una cantidad de 0,2 g por 100 ml), $MgSO_4$ (por ej., en una cantidad de 0,05 g por 100 ml), $Ca(NO_3)_2$ (por ej., en una concentración de 1 mM), $MnCl_2$ (por ej., en una concentración de 0,1 mM), $FeSO_4$ (por ej., en una concentración de 1 μM), glucosa (por ej., en una cantidad de 0,1%) y glicerol (por ej., en una cantidad de 1%). Las biopelículas bacterianas se pueden obtener a partir de cultivos líquidos por el cultivo de bacterias que forman biopelículas como se describe en la presente memoria, por ej., *B. subtilis* 3610, a una temperatura adecuada, por ej., a 30 °C, o a 37 °C bajo movimientos de agitación o revolviendo por un periodo de tiempo adecuado, por ej., durante 8 horas, 16 horas, 20 horas, 24 horas, 30 horas, 48 horas, 56 horas o 72 horas. Después, las biopelículas formadas pueden cosecharse, por ej., por la centrifugación del cultivo. Típicamente, las biopelículas cosechadas se pueden usar *in situ*, por ej., como un compuesto húmedo, por ej., como una suspensión acuosa, para una mezcla con material a base de cemento para obtener una composición de acuerdo con la presente invención, o las biopelículas cosechadas se pueden secar, por ej., liofilizar, con el fin de proporcionarlas en forma almacenable y/o convenientemente transportable. En una realización específica, la liofilización se puede llevar a cabo durante aproximadamente 20 a 48 horas, preferentemente durante aproximadamente 48 horas para asegurar la sequedad completa de la biopelícula. En realizaciones adicionales, la biopelícula bacteriana secada obtenida como se describe con anterioridad en la presente memoria, o la biopelícula recién cosechada se puede procesar de manera adicional por etapas de homogeneización o pulverización adecuadas. Por ejemplo, puede aplastarse y homogeneizarse con pilón o molerse en molinos adecuados. Además, las condiciones de crecimiento que se pueden usar de manera alternativa, que también están previstas por la presente invención, son conocidas por los expertos en la técnica o se pueden derivar de fuentes bibliográficas adecuadas.

En realizaciones adicionales, la biopelícula bacteriana usada de acuerdo con la presente invención se puede obtener por del cultivo de bacterias, por ej., cepas de *B. subtilis* o especies de *Pseudomonas* como se menciona con anterioridad en la presente memoria, en una superficie sólida. En ciertas realizaciones de la presente invención, tales superficies sólidas pueden ser medios sólidos, en particular medios sólidos a base de agar. Los medios sólidos preferidos son medios LB agar, es decir, medios LB que tienen una composición como se describe con anterioridad en la presente memoria y de manera adicional comprenden una cantidad adecuada de agar, por ej., 1,5% de agar. Son más preferidos medios LB agar plus (LB+), es decir medios LB plus que tienen una composición como se describe con anterioridad en la presente memoria y que comprenden, además, 1,5% de agar. En realizaciones

adicionales, se puede usar un medio de agar 2xSGG, es decir, un medio 2xSGG que tiene una composición como se describe con anterioridad en la presente memoria y de manera adicional comprende una cantidad adecuada de agar, por ej., 1,5% de agar. Después, las biopelículas formadas se pueden cosechar, por ej., por el raspado de la biopelícula de la superficie sólida. En realizaciones adicionales, la biopelícula recién cosechada se puede secar, por ej., por medio de liofilización durante aproximadamente 20 a 48 horas, preferentemente durante aproximadamente 48 horas para asegurar la sequedad completa de la biopelícula. Después, la biopelícula seca o la biopelícula recién cosechada se puede procesar de manera adicional por medio de etapas de homogeneización adecuadas. Por ejemplo, puede aplastarse con pilón o se puede homogeneizar con una mezcla de soporte. El procedimiento de homogeneización además se puede facilitar por la adición de líquido, por ej., agua. Después, las composiciones de biopelícula homogeneizada se pueden mezclar con materiales a base de cemento, por ej., ingredientes de mortero u hormigón.

La biopelícula bacteriana usada de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar en cualquier forma adecuada. Por ejemplo, la biopelícula bacteriana se puede proporcionar como composición seca o en un estado húmedo o natural, por ej., directamente después de su cosecha. Si se proporciona en un estado seco, la biopelícula se puede proporcionar como composición liofilizada, por ej., como se describe con anterioridad en la presente memoria. Las biopelículas bacterianas secadas o liofilizadas se pueden almacenar durante un periodo prolongado de tiempo, por ej., durante 1 a 4 semanas, o de 2 a 12 meses en un ambiente adecuado, por ej., a temperatura ambiente o aproximadamente de 4 a 6 °C en un refrigerador. Preferentemente, las biopelículas bacterianas secas o liofilizadas se pueden almacenar en un recipiente seco y sellado. Alternativamente, las biopelículas bacterianas se pueden congelar después de la cosecha, por ej., a -20 °C o a -70 °C o a cualquier otra temperatura de congelación adecuada y mantener bajo esas condiciones hasta dar una mezcla con materiales a base de cemento para obtener una composición de material hidrófoba a base de cemento de acuerdo con la presente invención.

La expresión "componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana" como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier elemento o porción de una biopelícula bacteriana aislable, fraccionable y/o sintetizable como se define con anterioridad en la presente memoria, preferentemente de una biopelícula de bacterias productoras de biopelícula, más preferentemente de una biopelícula de las cepas de *B. subtilis* o especie de *Pseudomonas*, incluso más preferentemente de una biopelícula de *B. subtilis* 3610, que es capaz de hacer hidrófoba dicha biopelícula. En realizaciones específicas, dicho componente también es capaz de hacer hidrófoba una composición de material a base de cemento. Esta capacidad se puede determinar o probar de acuerdo con cualquier metodología adecuada, preferentemente por la determinación del ángulo de contacto θ entre una composición de material a base de cemento que comprende dicho componente o fracción y una gotita de ddH₂O, por ej., como se describe con anterioridad o en los Ejemplos a continuación. Sin desear quedar ligado a teoría alguno, se supone que los componentes de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana residen en gran parte en la matriz de biopolímero extracelular de la biopelícula. Un aislamiento de una porción o elemento de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana se puede llevar a cabo, en realizaciones específicas, de acuerdo con procedimientos y técnicas para aislar componentes de la matriz de biopolímero extracelular, que son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las biopelículas bacterianas se pueden cultivar en cultivo líquido, preferentemente como se describe con anterioridad en la presente memoria, o se pueden cultivar en superficies sólidas, por ej., en placas de agar, preferentemente como se describe con anterioridad en la presente memoria. El material de biopelícula de cultivos líquidos después se puede separar del medio de cultivo por centrifugación, por ej. de 5.000 rpm a 15.000 rpm durante 5 a 20 min. El material de biopelícula de superficies sólidas se puede homogeneizar en una solución acuosa y después someterse a una etapa de centrifugación, por ej., de 5.000 rpm a 15.000 rpm durante 5 a 20 min. Un precipitado obtenido en consecuencia después se puede someter a sonicación suave para interrumpir las estructuras de la biopelícula, membrana y grupos de células, seguido por una separación adicional por centrifugación. En un sobrenadante de este procedimiento, está presente la matriz de biopolímero extracelular que además se puede fraccionar, purificar y/o analizar. En una realización específica de la presente invención, una fracción de biopelícula bacteriana que comprende la matriz de biopolímero extracelular o porciones de la misma, por ej., obtenida como se describe con anterioridad, se puede considerar, o usar como un componente de transporte de la hidrofobicidad de la biopelícula bacteriana. En una realización preferente, el sobrenadante que comprende la matriz de biopolímero extracelular, como se describe con anterioridad, o fracciones de la misma, por ej., una fracción separada por tamaño, peso o carga, que se puede proporcionar en forma seca o no seca, se puede considerar, o usar, como un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana. En realizaciones alternativas, los componentes celulares, por ej., derivados de gránulos después de un procedimiento de separación como se indica con anterioridad, en forma intacta o solubilizada, o cualquier fracción adecuada, por ej., una fracción separada por tamaño, peso o carga, se puede considerar o usar como un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana. En procedimientos de separación adicionales, las proteínas, preferentemente presentes en la fracción de la matriz, pero también en la fracción celular se pueden, por ejemplo, aislar y/o purificar por medio de un tratamiento con ácido tricloroacético. La separación molecular puede estar basada, por ejemplo, en una cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de interacción hidrófoba, una cromatografía de intercambio iónico, una cromatografía de afinidad, una cromatografía de inmunoprecipitación o de inmunoadinidad o una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) u otras técnicas adecuadas. Las proteínas se pueden purificar de manera adicional por medio de ultrafiltración. Las proteínas obtenidas correspondientemente o fracciones que comprenden dichas proteínas se pueden considerar o usar como un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana de acuerdo con la presente

invención. Los procedimientos y técnicas mencionados, así como también los procedimientos alternativos más adecuados, son conocidos por los expertos en la técnica o se pueden derivar de fuentes bibliográficas adecuadas tal como, por ejemplo, GE Healthcare Life Sciences Handbooks que se puede encontrar en <http://www.gelifesciences.com> (consultado el 20 de mayo de 2015), o Ahmed, Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification and Characterization, CRC Press, 2007. Los exopolisacáridos presentes en los componentes de la matriz de biopolímero extracelular de una biopelícula bacteriana se pueden aislar y separar sometiendo una fracción de la matriz extracelular descrita con anterioridad en la presente memoria a un tratamiento con formaldehído, después a NaOH, seguido por centrifugación. Posteriormente, después de una diálisis opcional, el tratamiento con TCA y una etapa de centrifugación (por ej., durante 1 hora a aproximadamente 15,000 x g) típicamente proporcionan un sobrenadante. El sobrenadante se puede tratar con etanol, centrifugar, dializar, liofilizar y finalmente someterse a filtración en gel, preferentemente a una filtración en gel S-200. Después de una etapa de diálisis adicional, se pueden obtener polisacáridos purificados. Los polisacáridos obtenidos de manera correspondiente o fracciones que comprenden dichos polisacáridos se pueden considerar o usar como un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana de acuerdo con la presente invención. Los procedimientos y técnicas mencionados, así como también procedimientos alternativos más adecuados, son conocidos por los expertos en la técnica o se pueden derivar de fuentes bibliográficas adecuadas tal como PM Bales *et al.*, "Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens", PLoS ONE 8(6): e67950, 2013.

En realizaciones específicas de la invención, el componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana es un componente ya conocido de una biopelícula bacteriana, o una combinación de un componente de este tipo con compuestos o elementos adicionales. Por ejemplo, un componente de transporte de la hidrofobicidad puede ser una proteína o polipéptido con propiedades hidrófobas. En una realización preferente, el componente de transporte de la hidrofobicidad es una proteína que confiere o contribuye a la repelencia superficial de las biopelículas de *B. subtilis*.

Un ejemplo de una proteína tal es la proteína BslA (también denominada YuaB), que se descubrió que constituye uno de los principales contribuyentes a la repelencia superficial de *B. subtilis* (Kobayashi and Iwano, *Molecular Microbiology*, 2012, 85(1), 51-66). En realizaciones específicas de la presente invención, la proteína BslA, o variantes de la misma, por ej., proteínas que tienen una identidad de secuencia de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con la secuencia del identificador de secuencia Uniprot A0A063XD50-1 (como se define en la base de datos Uniprot del 20 de mayo de 2015) de YuaB, codificadas, por ejemplo, por el gen BS49_34000 (como se define en la base de datos Uniprot del 20 de mayo de 2015) sobre la totalidad de la longitud de la secuencia, o variantes que comprenden una o más sustituciones, supresiones o modificaciones de aminoácidos, en las que dichas proteínas variantes poseen actividad de repelencia de BslA, por ej., como se describe por Kobayashi and Iwano, 2012, pueden estar comprendidas en composiciones de material a base de cemento, o usarse para la preparación de composiciones de material hidrófobas a base de cemento de acuerdo con la presente invención.

Un ejemplo adicional de un componente de transporte de la hidrofobicidad es la proteína TasA, que se descubrió como componente prominente de la matriz extracelular de *B. subtilis* (Branda *et al.*, *Molecular Microbiology*, 2006, 59(4), 1229-1238). En realizaciones específicas de la presente invención, la proteína de TasA, o variantes de la misma, por ej., proteínas que tienen una identidad de secuencia de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con la secuencia del identificador de secuencia Uniprot Q5ND72-1 (como se define en la base de datos Uniprot del 20 de mayo de 2015) de TasA, sobre la totalidad de la longitud de la secuencia, o variantes que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos, supresiones o modificaciones, en las que dichas proteínas variantes poseen actividad de TasA, por ej., como se describe por Branda *et al.*, 2006, pueden estar comprendidas en composiciones de material a base de cemento, o se pueden usar para la preparación de composiciones de material hidrófobas a base de cemento de acuerdo con la presente invención.

Otros ejemplos de componentes de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana de acuerdo con la presente invención son exopolisacáridos de transporte de la hidrofobicidad presentes en la matriz extracelular de bacterias productoras de biopelícula, preferentemente de *B. subtilis*, más preferentemente de *B. subtilis* 3610. Tales exopolisacáridos pueden comprender, por ejemplo, los polisacáridos de levano de tipo I y II, así como también otros tipos de polisacáridos y factores asociados. En el contexto de la presente invención, un componente de transporte de la hidrofobicidad puede no ser un exopolisacárido del grupo gellan, por ej., S-60, en particular no ser un exopolisacárido tal como welan (S-130) o diutano (S-657), o ácido esteárico.

Las proteínas o exopolisacáridos como se describe con anterioridad en la presente memoria pueden proporcionarse solos o en cualquier combinación adecuada. Por ejemplo, BslA y TasA se pueden proporcionar en combinación. Además, cada una de estas proteínas, o ambas, se pueden proporcionar en combinación con un exopolisacárido como se menciona con anterioridad. Tales combinaciones pueden estar basadas en cualquier proporción adecuada de los componentes, por ej., proteínas o polisacáridos, por ej., 5% de un componente y 95% del otro componente, 25% de un componente y 75% del otro componente, o 50% de ambos componentes, o cualquier valor entre estos valores. Asimismo, se prevén combinaciones con fracciones de biopelícula como se menciona con anterioridad en la presente memoria.

En otras realizaciones específicas de la presente invención los componentes de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana se pueden combinar con elementos de proteínas conocidos por transmitir la hidrofobicidad en otras circunstancias o sistemas biológicos, o con entidades químicas de transporte de la hidrofobicidad, por ej., nanopartículas. Por ejemplo, las hidrofobinas fúngicas, que son proteínas secretadas de hongos, de baja masa molecular (≤ 20 kDa), que se caracterizan por niveles moderados a altos de hidrofobicidad y la presencia de ocho residuos de cisteína conservados (Cys) y que se expresan típicamente por hongos filamentosos tal como *Schizophyllum commune* o *Magnaporthe grisea*, se pueden usar como un componente de transporte de la hidrofobicidad adicional. Asimismo, se prevé el empleo de proteínas chaplinas, SapB o SapT, que son conocidas por transportar una funcionalidad similar en *Streptomyces*. Los detalles adicionales son conocidos por los expertos en la técnica o se pueden derivar de fuentes bibliográficas adecuadas tal como Bayry *et al.*, PLOS, 2012, 8(5), e1002700. En otras realizaciones específicas, tales componentes de transporte de la hidrofobicidad conocidos de los sistemas biológicos definidos con anterioridad se pueden usar en lugar de los componentes de una biopelícula bacteriana.

La cantidad de biopelícula bacteriana o de componentes de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana en una composición de material a base de cemento obtenida de acuerdo con la presente invención puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,5% en peso a 20% en peso del peso seco de la composición final, preferentemente de aproximadamente 0,5% en peso a 15% en peso del peso seco de la composición final, más preferentemente de aproximadamente 0,5% en peso a 10% en peso del peso seco de la composición final, por ej., en una cantidad de aproximadamente 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5% o 20%. La cantidad exacta de biopelícula bacteriana, preferentemente proporcionada en una forma procesada, por ej., como biopelícula liofilizada, como se describe con anterioridad en la presente memoria, o proporcionada como componente aislado o purificado o semipurificado, por ej., como proteína o componente de polisacárido purificado, que está presente en dicha composición, puede depender de factores tal como el uso pretendido de la composición, el grado pretendido de hidrofobicidad, es decir, los ángulos de contacto a obtener, la fuente de material de biopelícula, la consistencia del material, es decir, si se proporciona como liofilizado de biopelícula o como una preparación de proteína, la identidad genética de las bacterias productoras de biopelícula o factores adicionales, como les constará a los expertos en la técnica. Bajo ciertas circunstancias, un aumento de la cantidad de material de biopelícula, por ej., material de biopelícula liofilizada, puede reducir la estabilidad de la composición de material a base de cemento. En realizaciones específicas en las que la biopelícula bacteriana se proporciona en forma liofilizada, la cantidad de biopelículas bacterianas en una composición de material a base de cemento puede estar preferentemente en el intervalo de aproximadamente 3% a aproximadamente 15%, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, por ej., en una cantidad de aproximadamente 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5% o 10%.

La composición de material a base de cemento que comprende el material de biopelícula obtenido de acuerdo con la presente invención, que preferentemente comprende material de biopelícula derivado de cultivos de *B. subtilis* 3610, es fácilmente maleable para la construcción típica. Las composiciones de material a base de cemento obtenidas de acuerdo con la invención no muestran esencialmente disminución alguna de la estabilidad o fuerza. En particular, se prefiere que la cantidad de biopelícula bacteriana o de componentes de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana en una composición de material a base de cemento sea de aproximadamente 2%. En una realización particularmente preferente adicional, la cantidad de biopelícula bacteriana o de componentes de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana en una composición de material a base de cemento obtenida de acuerdo con la invención es de aproximadamente 2% con una relación de agua a cemento de la composición de aproximadamente 0,4 a 0,6, más preferentemente de aproximadamente 0,5. En otras realizaciones específicas, la cantidad de biopelícula bacteriana o de componentes de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana en una composición de material a base de cemento puede estar en el intervalo de aproximadamente 3% a aproximadamente 10%. Tales cantidades pueden, por ejemplo, estar presentes en el caso de ciertas bacterias productoras de biopelículas que producen, en condiciones comparables, una matriz de biopolímero extracelular con autoencapsulamiento que se reduce, por ej., de 10 a 70% o más en comparación con la matriz de biopolímero extracelular con autoencapsulamiento producida por *B. subtilis* 3610. De manera similar, dichas cantidades pueden, por ejemplo, estar presentes en el caso de ciertas bacterias productoras de biopelículas que producen, en condiciones comparables, una biopelícula que comprende componentes menos hidrófobos, por ej., componentes menos, en 10% a 70% o más, en comparación con los componentes hidrófobos producidos por *B. subtilis* 3610. En aún otra realización, la cantidad de componentes de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana en una composición de material a base de cemento obtenida de acuerdo con la invención puede estar en el intervalo de aproximadamente menos de 2%, por ej., entre aproximadamente 0,5% a 2%, si están presentes en la composición exclusivamente o en gran parte componentes de transporte de la hidrofobicidad tal como polisacáridos, por ej., como se define con anterioridad en la presente memoria, o fracciones de la biopelícula, en particular, fracciones no celulares, como se define con anterioridad en la presente memoria. En realizaciones adicionales de la presente invención, las composiciones de material hidrófobas a base de cemento como se obtienen y se definen con anterioridad en la presente memoria, que comprenden una biopelícula bacteriana o al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana, preferentemente en una cantidad de aproximadamente 0,5% en peso a 20% en peso del peso seco de la composición final, más preferentemente en una cantidad de aproximadamente 0,5% en peso a 15% en peso del peso seco de la

composición final, por ej., en una cantidad de aproximadamente 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5% o 20%, exhiben un aumento de la rugosidad de la superficie en comparación con una composición de material a base de cemento que no comprende una biopelícula bacteriana o al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana, que en cambio muestra una superficie lisa con microgrietas. La expresión "aumento de la rugosidad de la superficie", como se usa en la presente memoria significa que tras el análisis con una técnica adecuada de formación de imágenes, por ej., Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), o perfilometría de luz, preferentemente como se ha descrito en los Ejemplos, la presencia de elementos no lisos o con salientes en una área definida de la composición, por ej., un área de $1 \mu\text{m}^2$ o $10 \mu\text{m}^2$ aumenta en 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 100% o más de 100% en comparación con una composición de material a base de cemento que no comprende una biopelícula bacteriana o al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana.

En otras realizaciones específicas, las composiciones de material hidrófobas a base de cemento como se obtienen y se definen con anterioridad en la presente memoria, que comprenden una biopelícula bacteriana o al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana, preferentemente en una cantidad de aproximadamente 0,5% en peso a 20% en peso del peso seco de la composición final, más preferentemente en una cantidad de aproximadamente 0,5% en peso a 15% en peso del peso seco de la composición final, por ej., en una cantidad de aproximadamente 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5% o 20%, exhiben un mayor número de poros en su superficie. La presencia de poros se considera un aspecto parcial del aumento de la rugosidad. Los poros pueden ser de una forma asimétrica y se pueden aumentar en número en 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 100% o más de 100% en comparación con una composición de material a base de cemento que no comprende una biopelícula bacteriana o al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana.

En realizaciones adicionales de la presente invención, las composiciones de material hidrófobas a base de cemento como se obtienen y se definen con anterioridad en la presente memoria, que comprenden una biopelícula bacteriana o al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana, preferentemente en una cantidad de aproximadamente 0,5% en peso a 20% en peso del peso seco de la composición final, más preferentemente en una cantidad de aproximadamente 0,5% en peso a 15% en peso del peso seco de la composición final, por ej., en una cantidad de aproximadamente 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5% o 20% exhiben un aumento de la densidad de las estructuras alargadas de tipo espiga en su superficie en comparación con una composición de material a base de cemento que no comprende una biopelícula bacteriana o al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana. La expresión "aumento de la densidad de las estructuras de tipo espiga" como se usa en la presente memoria significa que tras el análisis con una técnica adecuada de formación de imágenes, por ej., Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), o perfilometría de luz, preferentemente como se ha descrito en los Ejemplos, la topografía de una composición de material a base de cemento muestra un elevado número de fibrillas que son de tipo espiga y tienen un diámetro de aproximadamente 1 a 10 nm. En ausencia de componentes de biopelículas bacterianas, típicamente se observa una superficie lisa con microgrietas. En realizaciones específicas, puede haber entre aproximadamente 2 a 30 fibrillas en forma de barra por μm^2 de superficie de la composición, por ej., aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25 o 30 fibrillas en forma de barra por μm^2 de superficie de la composición, en particular de una muestra de mortero que comprende 2% de componente de biopelícula. En una composición de material a base de cemento que no comprende una biopelícula bacteriana o al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana la densidad se reduce de manera significativa, por ej., a aproximadamente 0,5 a 1 fibrillas en forma de barra por μm^2 de superficie de la composición. En realizaciones específicas de la presente invención, las composiciones de material hidrófobas a base de cemento como se obtienen y se definen con anterioridad en la presente memoria, que comprenden una biopelícula bacteriana o al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana, preferentemente en una cantidad de aproximadamente 0,5% en peso a 20% en peso del peso seco de la composición final, más preferentemente en una cantidad de aproximadamente 0,5% en peso a 15% en peso del peso seco de la composición final, por ej., en una cantidad de aproximadamente 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5% o 20% exhiben estructuras de tipo espiga en aproximadamente 70 a 90% de la totalidad de la superficie de la composición, por ej., en aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o cualquier valor de porcentaje entre estos valores, de la totalidad de la superficie de la composición. El cálculo del revestimiento por estructuras de tipo espiga se puede basar en una división de áreas de composición de $1000 \mu\text{m}^2$ en cuadrados de $1 \mu\text{m}^2$, que se pueden analizar de manera consecutiva. Si cualquiera de estos cuadrados de $1 \mu\text{m}^2$ está libre de cualquier estructura de tipo espiga o no revestido por estas estructuras, se considera una contribución a la porción no revestida, mientras que la presencia ya de una estructura de tipo espiga en un cuadrado de $1 \mu\text{m}^2$ como se ha definido con anterioridad hace que sea un área que comprende una estructura de tipo espiga. El porcentaje de superficie revestida de este modo se puede obtener por medio de la suma de la información en consecuencia obtenida para los cuadrados de $1 \mu\text{m}^2$ en el área más grande de $1000 \mu\text{m}^2$. Este procedimiento se puede llevar a cabo para 2, 5, 10 o más áreas de $1000 \mu\text{m}^2$.

consecutivas o arbitrariamente elegidas con el fin de mejorar la significancia del resultado.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se supone que la morfología modificada de la superficie de la composición conduce a un efecto de tipo hoja de loto en la nano y microescala, lo que aumenta drásticamente la hidrofobicidad y reduce la capacidad de humectación de la composición. La morfología inusual de la superficie sorprendentemente hallada por los inventores de la presente, posiblemente, puede deberse a la interrupción prematura de la hidratación durante el procedimiento de hidratación del cemento que conserva las nanoestructuras descritas.

La presente invención se refiere al uso de una biopelícula bacteriana, o de al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana en la preparación de una composición de material hidrófoba a base de cemento para la preparación de una composición de material hidrófoba a base de cemento. Se prefiere que la biopelícula bacteriana, el al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana o la composición de material a base de cemento sean los definidos con anterioridad en la presente memoria. Dicha biopelícula bacteriana o sus componentes hidrófobos se pueden usar de cualquier manera adecuada. La preparación de una composición de material hidrófoba a base de cemento se puede llevar a cabo de acuerdo con los protocolos estándar para los materiales a base de cemento, por ej., protocolos estándar para la preparación de mortero u hormigón. La biopelícula bacteriana se puede proporcionar, por ej., como un componente seco, liofilizado, o se puede proporcionar como una cosecha reciente, por ej., a partir de cultivos de biopelículas bacterianas como se describe en la presente memoria, o se puede proporcionar como un componente aislado o purificado o semipurificado, por ej., como un componente de proteína o polisacárido purificado, como se define con anterioridad en la presente memoria, o como una fracción, por ej., como la fracción de matriz extracelular o no celular de una preparación de biopelícula bacteriana, como se define con anterioridad en la presente memoria. En una realización preferente, la biopelícula bacteriana se puede proporcionar en una forma homogeneizada, por ejemplo, como una suspensión acuosa, o como un polvo liofilizado. Se puede añadir a la composición durante la fase de mezcla de los componentes. Alternativamente, se puede añadir a la composición junto con agua. En esta realización, se puede solubilizar en agua antes de que se añada el agua a la composición de material a base de cemento.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una biopelícula bacteriana, o de al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana para reducir la capacidad de humectación de una composición de material a base de cemento. La expresión "capacidad de humectación" como se usa en la presente memoria se refiere a la propiedad de la composición para permitir la penetración de líquido, por ej., agua, en las capas no superficiales de la composición. Se refiere al grado de humectación de un material, por ej., una composición como se define en la presente memoria. La capacidad de humectación se mide, de manera similar a la hidrofobicidad, por la determinación de un ángulo de contacto θ entre dicho compuesto y gotitas de líquido, por ej., agua, agua salada, o una mezcla de alcohol y agua, como se define con anterioridad en la presente memoria en el contexto de la hidrofobicidad. La expresión "disminución de la capacidad de humectación" como se usa en la presente memoria significa que el grado de humectación de una composición de material a base de cemento, por ej., una composición de mortero, hormigón o estuco de cemento y cal, que no comprende las biopelículas bacterianas de acuerdo con la presente invención, o uno de sus componentes, como se determina por su ángulo de contacto θ con una gotita se reduce en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 80%, 100% o más. En consecuencia, el ángulo de contacto θ con una gotita de ddH_2O se puede aumentar a al menos más de 90° , preferentemente más de 90° , por ej., 100° , 120° , 140° o más, o cualquier valor entre estos valores. La capacidad de humectación de la composición de material a base de cemento se puede determinar por la cantidad de biopelícula bacteriana o de componentes de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana presente en la composición. Para una disminución baja a moderada de la capacidad de humectación, una cantidad de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1% de biopelícula bacteriana, por ej., producida y procesada como se describe con anterioridad en la presente memoria, se puede añadir a materiales a base de cemento. Para una disminución media a alta de la capacidad de humectación, una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 2% de biopelícula bacteriana, por ej., producida y procesada como se describe con anterioridad en la presente memoria, se puede añadir a materiales a base de cemento. Para una disminución muy alta de la capacidad de humectación, una cantidad de 2% a aproximadamente 3% o más de biopelícula bacteriana, por ej., producida y procesada como se describe con anterioridad en la presente memoria, se puede añadir a materiales a base de cemento.

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para hacer hidrófoba una composición de material a base de cemento. El procedimiento comprende como etapa central la adición de una cantidad eficaz de una biopelícula bacteriana a un material a base de cemento, para proporcionar de este modo una composición de material a base de cemento, que es hidrófoba. Alternativamente, al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana a una composición de material a base de cemento se puede añadir a dicho material a base de cemento, para proporcionar de este modo una composición de material a base de cemento, que es hidrófoba. La hidrofobicidad de la composición resultante se puede probar como se describe con anterioridad en la presente memoria, o en los Ejemplos, a continuación. En particular, la hidrofobicidad se puede evaluar por la determinación del ángulo de contacto θ de la composición con una gotita de líquido, por ej., agua, agua salada de una mezcla de alcohol y agua como se describe con anterioridad. Se prefiere que el ángulo de contacto θ entre una composición hidrófoba obtenible por el procedimiento y una gotita de agua, agua salada o una mezcla de alcohol y agua como se define con anterioridad en la presente memoria, sea de aproximadamente 90° o más, por ej.,

aproximadamente 90° a aproximadamente 150°. Se prefiere además que la biopelícula bacteriana, el al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de la biopelícula bacteriana o la composición de material a base de cemento sean los definidos con anterioridad en la presente memoria. La etapa de adición de dicha biopelícula bacteriana o dichos componentes de transporte de la hidrofobicidad al material a base de cemento se puede llevar a cabo, en una realización, durante la fase de mezcla de los componentes del material a base de cemento, por ej., en un estado seco. En esta realización, la biopelícula bacteriana o sus componentes de transporte de la hidrofobicidad se pueden proporcionar en forma seca, preferentemente en forma pulverizada, por ej., como un componente liofilizado y procesado, por ej., como se describe con anterioridad en la presente memoria. Alternativamente, la biopelícula bacteriana o sus componentes de transporte de la hidrofobicidad se pueden proporcionar como una cosecha reciente, por ej., de cultivos de biopelículas como se describe con anterioridad en la presente memoria. De esta forma, la biopelícula bacteriana o los componentes de transporte de la hidrofobicidad se pueden añadir como una pasta o pulpa. En diferentes realizaciones, los componentes purificados o semipurificados, por ej., los componentes de proteína o polisacárido purificados, como se define con anterioridad en la presente memoria, se pueden agregar a la mezcla de materiales a base de cemento. Alternativamente, o además de la etapa de mezcla en seco descrita con anterioridad, la biopelícula bacteriana o sus componentes de transporte de la hidrofobicidad se pueden añadir al material a base de cemento (presentes como componentes secos) junto con agua. En este contexto, la biopelícula bacteriana o sus componentes de transporte de la hidrofobicidad, que pueden previamente estar presentes como componentes secos, por ej., en forma pulverizada o liofilizada, o como una pasta o pulpa, se pueden solubilizar en agua antes de que dicha agua se añada al material a base de cemento. La presente invención además contempla la provisión de soluciones que comprenden la biopelícula o sus componentes de transporte de la hidrofobicidad en recipientes adecuados, tal como bolsas de plástico o latas, por ej., listos para su uso en actividades de mezcla, por ej., en obras de construcción. El procedimiento de la presente invención además se puede combinar con etapas adicionales que permiten aumentar la hidrofobicidad de la composición mencionada. Tales etapas son, por ej., el revestimiento adicional de la superficie de la composición final con una capa hidrófoba, por ej., la aplicación de elementos químicos o biológicos, tal como el empleo de soluciones de nanorevestimiento o pulverizadores de nanorevestimiento, o el empleo de alcoxisilanos, alcoxisiloxanos, siliconatos alcalinos o siliconas. Los procedimientos y técnicas mencionados son conocidos por los expertos en la técnica o se pueden derivar de fuentes bibliográficas adecuadas tal como, por ejemplo I. Flores-Vivian *et al.*, "Self-assembling particle-siloxane coatings for superhydrophobic concrete", ACS Appl. Mater. Interfaces, 2013.

Además, la presente invención prevé composiciones hidrófobas a base de cemento que se pueden obtener por cualquiera de los procedimientos para la hacer hidrófobas composiciones de material a base de cemento, como se describe con anterioridad.

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan con fines ilustrativos. Por lo tanto, se comprende que el ejemplo y las figuras no se deben interpretar como limitantes. Los expertos en la técnica claramente serán capaces de prever modificaciones adicionales de los principios establecidos en la presente memoria.

Ejemplos

Ejemplo 1

Formación de biopelículas y preparaciones de agregado

Se usó una cepa de *B. subtilis* 3610 de tipo salvaje para la preparación de muestra de mortero híbrido. Los cultivos de un día para el otro de la cepa se cultivaron a partir de existencias de glicerol congelado en 15 ml de medio LB (Luria/Miller) a 37 °C y 90 rpm en una incubadora con agitación (Certomat BS-1, Sartorius AG, Göttingen, Alemania) durante 16 horas. Después, la suspensión bacteriana se sembró en volúmenes de 100 µl en 1,5% (p/v) de placas de agar que contenían LB (Luria/Miller) o LB plus (LB+) (Luria/Miller con glicerol adicional 1% [vol/vol] y 0,1 mM de MnSO₄ (adaptado de M. Shemesh and Y. Chaia, A combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase kind signalling, Journal of Bacteriology, 2013). La biopelícula se cultivó por la incubación de las placas de agar cebadas a 37 °C durante 24 horas (procedimiento de cultivo y crecimiento de la biopelícula adaptado de S. Grumbein, M. Opitz, and O. Lieleg, "Selected metal ions protect *Bacillus subtilis* biofilms from erosion", Metallomics, 2014). Para los experimentos con mutantes con *B. subtilis* eliminado como se muestra en la FIG. 4A, el procedimiento de crecimiento de biopelícula era idéntico al de la cepa 3610 de tipo salvaje, con la excepción de que se añadió un antibiótico adecuado al medio LB para seleccionar las bacterias mutantes respectivas durante el crecimiento bacteriano (véase la Tabla 1 publicada en Kesel *et al.*, Carbohydrate Coating Reduces Adhesion of Biofilm-Forming *Bacillus subtilis* to Gold Surfaces, Appl. Environ. Microbiol, 2014).

Agregado de biopelícula de *B. subtilis* líquido

Una biopelícula cultivada se raspó de las placas de agar y se dividió en porciones de acuerdo con una relación en peso predefinida (β):

$$\beta = \frac{m_{Biopelícula}}{m_{Arena/Cemento}}, \left[\frac{g}{g} \right] \text{ [Ec. 4]}$$

En este caso, $m_{Biopelícula}$ es la masa de la biopelícula raspada y $m_{Arena/Cemento}$ es la mezcla de granos secos de arena/cemento (mezclada previamente como se describe en la presente memoria a continuación). Los valores de β usados para el agregado son de 1%, 2% y 2,5%. Las porciones de biopelícula ($m_{Biopelícula}$) se colocaron después en un homogeneizador con agua doblemente destilada (ddH₂O) y se homogeneizaron durante 2 minutos a 1600 rpm con un mezclador de soporte (Agitador ES, Velp Científica, Bohemia, EE.UU.). Después de la homogeneización, el líquido de biopelícula-ddH₂O dio como resultado el agregado acabado para los granos secos de arena/cemento. Los agregados se prepararon con tres relaciones de w/c diferentes (0,5; 0,6; y 0,7).

Agregado de biopelícula de *B. subtilis* seco

Una biopelícula cultivada se raspó de las placas de agar enriquecidas con LB y se colocó en un liofilizador (Christ Alfa 1-2 LD, Osterode am Harz, Alemania) durante aproximadamente 48 horas para asegurar un secado completo de la biopelícula. La biomasa seca restante era de aproximadamente 20% de la biomasa fresca. Esto se calculó por medio de la medición del peso antes y después de la liofilización de la biopelícula. Después, la biopelícula seca se colocó en un tubo de centrifuga de 15 ml y se trituró con un mortero de acero inoxidable hasta que se pulverizó. Con el fin de comparar el agregado líquido y seco, el mortero híbrido acabado de ambos debía tener la misma cantidad de biopolímeros. Para ello, $m_{Biopelícula}$ de la Ec. 4 se multiplicó por un factor de 0,2, para dar la masa del agregado seco. Todas las muestras mezcladas con el agregado seco tenían una relación de w/c establecida de 0,5.

Las muestras de mortero híbrido se prepararon de acuerdo con V. D. Z. e.V. Forschungsinstitut der Zementindustrie, Zement-Taschenbuch 51° ed. vdz Deutsche Zementindustrie, 2008, con una relación en peso estándar de 3:1 de arena y polvo de cemento, es decir, 10 g de cemento (Heidelbergcement CEM I 42,5 N, Heidelberg, Alemania) se suplementaron con 30 g de arena (estandarizada por la norma DIN EN 196-1). Después de la adición del agregado (seco o líquido), el mortero híbrido viscoso se agitó durante 2 minutos y después se vertió en moldes de Teflon a medida. Los moldes se agitaron en un agitador horizontal (Promax 1020, Heidolph, Schwabach, Alemania) durante 30 segundos, para permitir que el mortero húmedo se asentara y perdiera las burbujas de aire restantes atrapadas en el interior de la pasta. El tiempo de hidratación de las muestras en el molde ascendió a aproximadamente 70 horas antes de que los ángulos de contacto se midieran en la parte inferior (la interfaz de Teflon-mortero plana hermética al aire) de las muestras.

Ejemplo 2

Determinación de las propiedades hidrófobas

La hidrofobicidad del mortero híbrido se examinó por diferentes principios (por caracterización de volumen y superficie), con el objetivo de cuantificar el comportamiento de interacción global con el agua. Una configuración de la medición del ángulo de contacto, la microscopía electrónica de barrido (SEM) y un perfilómetro se dirigieron a elucidar las propiedades superficiales hidrófobas del mortero híbrido. Las propiedades de volumen del mortero híbrido se examinaron a través de los caudales de agua, tanto a presión como estática.

Medición de los ángulos de contacto

La formación del ángulo de contacto en la superficie híbrida del mortero se cuantificó por una configuración de medición del ángulo de contacto. La configuración consistía en un soporte perimetral con un montaje de cámara, ajustable en el eje vertical y horizontal. Una cámara (Flea3, Point Grey, Richmond, Canadá) con una lente varifocal de alta resolución fue montada sobre el soporte perimetral. La luz se dirigió desde arriba con una ligera declinación, para condiciones de iluminación óptimas. Un volumen de 20 μ l de ddH₂O se pipeteó sobre la superficie del mortero híbrido tres veces con una separación de 3-5 mm, entre cada gotita a través del diámetro. Inmediatamente después de que las gotitas se pipetearon sobre la superficie, se registró la primera imagen (a los 0 minutos). La propagación de la imagen tiene un intervalo de 5 minutos entre cada registro, que documenta el comportamiento del ángulo de contacto con el tiempo. Se tomaron fotos con el software proporcionado (FlyCapture, Point Grey, Richmond, Canadá). Para obtener los datos del ángulo de contacto, la edición se llevó a cabo con ImageJ y una herramienta de complemento por medio de análisis de forma de la gota (adaptado de A. Stalder, G. Kulik, D. Sage, L. Barbieri, and P. Hofmann, A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2006). En este caso, el contorno de la gotita fue rastreado con una herramienta de spline, que dio como resultado una producción automática del ángulo de contacto en la unión de tres fases. Los datos se analizaron mediante el uso de MatLab (MathWorks, Inc., Natick, EE.UU.). Todas las mediciones del ángulo de contacto se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Microscopía Electrónica de Barrido

Se tomaron imágenes de ambas superficies de la muestra de mortero híbrido y estándar con un microscopio

electrónico de barrido (SEM) y el software proporcionado (JEOL JSM-6060LV, JEOL USA, Inc., Peabody, EE.UU.), con diversos aumentos y tensiones de aceleración.

Perfilómetro

5 Se usó un perfilómetro (μ Surf, NanoFocus AG, Oberhausen, Alemania) para barrer la superficie (un segmento de 200 μ m) de ambas muestras de mortero híbrido y estándar con el fin de cuantificar la rugosidad. La rugosidad de la superficie se evaluó después de la medición por el software proporcionado (μ Soft, NanoFocus AG, Oberhausen, Alemania) y, además, se procesó en MatLab.

Medición del caudal de agua - medición del caudal del cilindro graduado

10 La parte inferior de un cilindro graduado se retiró y se colocó en la parte superior de una muestra de mortero. La muestra y el cilindro se sellaron y se sujetaron por medio de Parafilm en el primer conjunto de experimentos. Después de un número de experimentos, el procedimiento de sellado se mejoró con masilla y Parafilm. Después, el conjunto de cilindro-mortero se colocó en posición vertical, se llenó con 170 ml de ddH₂O y, además, se selló en la parte superior, para reducir al mínimo la pérdida de ddH₂O por evaporación. El rendimiento del fluido se observó después de 24 horas.

Medición del caudal de agua - medición del caudal de agua presurizada

15 Las muestras de mortero híbrido se cebaron con un tubo de centrifuga de 15 ml truncado incrustado en la muestra durante el procedimiento de colado. Después de la solidificación de una muestra, se llenaron 10 ml de ddH₂O en el tubo de centrifuga incrustado. Después se conectó un cilindro de nitrógeno (N₂) a través del tubo y la boquilla al tubo de centrifuga de extremo abierto. El cilindro de N₂ se encendió y se presurizó el interior del tubo de centrifuga (con $p_2 = 0,2$ MPa). La presión constante generada por el cilindro de N₂ generó un trabajo de sistema de sobre el fluido y lo forzó a través de la microestructura porosa de las muestras de mortero. Este procedimiento permitió una adquisición más rápida de los datos y simuló una presión de fluido más alta.

Ejemplo 3

Mortero híbrido hidrófobo con *B. subtilis* 3610 de tipo salvaie

25 Cuando se cultivó en agar enriquecido con LB^{plus}, la cepa bacteriana de *Bacillus subtilis* 3610 forma biopelículas (BF) con fuertes propiedades superficiales hidrófobas similares a lo que se describió con anterioridad para agar MSgg (A.K. Epstein *et al.*, Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration, PNAS 108(3), 995-1000, 2011). Tales propiedades hidrófobas se pueden cuantificar por la determinación del ángulo de contacto θ , es decir el ángulo formado en la unión de tres fases de una gotita de agua que se coloca sobre la superficie sólida.

30 Para una gota de 20 ml de ddH₂O, se halló un ángulo de contacto muy alto en el intervalo de $\theta_{BF, LBplus} \approx 110^\circ$ (véase la Figura 1), que es comparable con el ángulo de contacto obtenido para el agua en Teflon. En contraste, una muestra de mortero sin modificar (UM) con una relación de agua/cemento de $w/c = 0,5$ mostró un comportamiento fuertemente hidrófilo con un ángulo de contacto de $\theta_{UM} \approx 30^\circ$.

35 Con el fin de probar si la propiedad hidrófoba fuerte del material biológico se puede transferir a un material técnico, tal como mortero por la integración del componente de biopelícula en el mortero para de ese modo crear un híbrido de material con propiedades de material mejoradas, la biopelícula se cosechó de placas de agar por medio de un raspado manual. Después, una suspensión de biopelícula acuosa se generó con un pilón. Esta suspensión se usó como un agregado durante el procedimiento de colado del mortero (véase la Figura 1(B)). Se descubrió que una muestra de mortero híbrido (HM) tal enriquecida con 2% de biopelícula ($\rho_{mojado}/\rho_{seco}$) exhibió un ángulo de contacto fuertemente aumentado de $\theta_{HM, LBplus} \approx 90^\circ$ que hace que el material sea ligeramente hidrófobo. En este caso, el contenido de la biopelícula (bc) describe la relación de la masa de biopelícula húmeda en la suspensión líquida con respecto a la masa seca del componente de mortero inorgánico. El LB^{plus}-agar usado para el crecimiento de la biopelícula se enriqueció con 1% de glicerol y 0,1 mM de MnSO₄.

45 Para aplicaciones industriales, sería útil que se pueda lograr el mismo efecto con una biopelícula de *B. subtilis* 3610 que se ha cultivado en un LB-agar simple que es más fácil y más barato de producir. Sin embargo, la biopelícula cultivada en dicho LB-agar simple típicamente muestra un comportamiento más hidrófilo con ángulos de contacto habituales en el intervalo de $\theta_{BF, LB} \approx 35^\circ$, y sólo pequeñas áreas de esta variante de biopelícula poseen fuertes propiedades hidrófobas. En consecuencia, se puede esperar que una muestra de mortero híbrido enriquecido con esta variante de biopelícula, en todo caso, sólo muestre una mejora débil en su resistencia a la humectación. De manera sorprendente, este no es el caso, dado que se observaron ángulos de contacto que son comparables, o incluso mayores que cuando se usa la biopelícula cultivada con LB+ como un agregado (véase la Figura 1 (B)).

50 Estos resultados demuestran que el aumento de la resistencia a la humectación del mortero híbrido no surge directamente de las propiedades hidrófobas del suplemento.

Ejemplo 4

Análisis de superficie del mortero híbrido

A partir de los resultados dados, se puede suponer que las propiedades hidrófobas del mortero híbrido son una propiedad de la superficie. Esta hipótesis se puso a prueba por la visualización de la superficie del mortero híbrido por medio de SEM y la comparación con un mortero sin modificar. Se pudo observar una alta densidad de estructuras alargadas de tipo espiga en el mortero híbrido (véase la Figura 2(A)) que revisten la totalidad de la superficie. Por el contrario, esas estructuras sólo se producen en algunos puntos en las muestras de mortero sin modificar en las que se forman motivos similares a "erizos" con espigas mucho más largas, denominadas etringitas (V. D. Z. e.V. Forschungsinstitut der Zementindustrie, Zement-Taschenbuch, 51° ed., VDZ Deutsche Zementindustrie, 2008).

La hoja de loto posee características de rugosidad tanto en la nano como en la microescala. Sin embargo, SEM principalmente hace un sondeo de la nanoestructura de una superficie. Para evaluar si el material híbrido también muestra un aumento de la rugosidad en una escala de longitud microscópica, se usó una perfilometría de luz como una técnica complementaria que informa la topología de la superficie en una microescala. Con esta técnica se pudo detectar una fuerte alteración de la superficie para el mortero híbrido con un aumento de las características de rugosidad (véase la Figura 2 (B)). También se pudieron observar alteraciones estructurales muy similares cuando las muestras se cortaron verticalmente y se analizó la estructura superficial de la superficie a granel generada (véase la Figura 2(A)). Este hallazgo está de acuerdo con el enfoque usado para modificar el material de mortero por la adición de manera homogénea de un componente biológico a todo el volumen a granel durante el procedimiento de colado de muestras.

Ejemplo 5

Análisis del volumen del mortero híbrido

Después, se sometió a prueba cuál mezcla de biopelícula/mortero produce la más alta resistencia a la humectación. Para este propósito, se modificaron dos parámetros independientes: primero, el contenido de la biopelícula (bc) y, segundo, la relación de agua a cemento (wc). En primer lugar, se añadieron, 2% ($\rho_{\text{mojado}}/\rho_{\text{seco}}$) de biopelícula a una mezcla de mortero con $wc = 0,5$. En una siguiente etapa, el ángulo de contacto del agua sobre muestras de mortero híbrido se determinó con contenidos de biopelícula más bajos y más altos, es decir, $bc = 1\%$, $1,5\%$, 2% , $2,5\%$ y 3% , así como también 2% , 5% y 10% con material de biopelícula liofilizado. Entre las muestras mecánicamente estables, los ángulos de contacto más altos se obtuvieron para $bc = 2\%$ (véase la Figura 3 (A)). Además, se observó que con el material de biopelícula recién cosechado el $bc = 3\%$ de la muestra es difícil de colar en un material más rígido, dado que se vuelve muy frágil y se desmorona con facilidad. Sin embargo, con el material de biopelícula liofilizado este problema no surge.

Sobre la base de los resultados descritos con anterioridad, se compararon diferentes relaciones de agua a cemento para un contenido de biopelícula fijo de 2% . En las aplicaciones industriales, este valor de wc típicamente oscila de $0,5$ a $0,7$. En la presente memoria se exploró un intervalo similar. Cuando el wc aumentó de $0,5$ a $0,6$ o $0,7$, el ángulo de contacto en el mortero híbrido permaneció comparable a los resultados anteriores (véase la Figura 3(A)). A partir de este conjunto de experimentos, se concluyó con que los parámetros inicialmente seleccionados produjeron el ángulo de contacto más alto accesible dentro de un intervalo de parámetros razonables.

Ejemplo 6

Estabilidad con el tiempo

En experimentos adicionales, se investigó si los altos ángulos de contacto observados eran estables durante un periodo de tiempo más largo. Los experimentos de humectación descritos con anterioridad se repitieron y gotas de agua individuales se controlaron durante un lapso de tiempo de 60 min. Este intervalo de tiempo se selecciona de manera tal que la evaporación del agua no pueda comprometer la medición del ángulo de contacto demasiado severamente. En las muestras de mortero sin modificar la gota de agua humedece completamente la superficie del material después de sólo 5 minutos (véase la Figura 3(B)). En contraste, en la muestra de mortero híbrido, la gota fue estable durante todo el periodo de observación; para algunas muestras, se pueden hallar ángulos de contacto iguales que superan los valores correspondientes obtenidos en Teflon (véase la Figura 3(B)).

Ejemplo 7

Resistencia a la humectación por agua del mar

En experimentos adicionales, se probó una característica adicional que es importante para el material híbrido a usar en la ingeniería civil. En particular, una alta resistencia a la humectación no sólo al agua dulce, sino también al agua del mar es crucial, ya sea en locales de construcción costeras o durante el invierno, cuando el agua de salpicaduras que contiene sal moja las estructuras de hormigón. Se halló que para el material híbrido como se describe con anterioridad, el ángulo de contacto de una solución de 600 mM de NaCl (que representa el agua de mar) era igual de alto que el ángulo de contacto de una simple gotita de ddH_2O .

Ejemplo 8

Agregado seco

Además, para un procedimiento de producción potencial del mortero híbrido de acuerdo con la invención en cantidades más grandes es extremadamente conveniente si el componente biológico se puede añadir como un polvo seco o liofilizado. Esto separaría el procedimiento de producción de la biomasa del procedimiento de colado de muestras de mortero actual. Por lo tanto, la biopelícula cosechada se liofilizó y se usó este polvo de biopelícula en forma resuspendida como un agregado durante el procedimiento de colado de mortero. Por consiguiente, se puede obtener un material híbrido con propiedades hidrófobas comparables a como cuando se usa una biopelícula recién cosechada (véase la Figura 3A). Se puede observar que la adición de contenidos de biopelícula liofilizada superiores, es decir $bc = 2\%$, 5% y 10% , proporcionan altos ángulos de contacto (véase la Figura 3(A)). Los resultados descritos con anterioridad indican claramente el gran potencial que el uso de los materiales híbridos biológicos que se describen en la presente memoria tiene para las aplicaciones industriales.

Ejemplo 9

Acción capilar

Se llevaron a cabo experimentos de elevación capilar del agua con muestras de bloques de mortero rectangulares mediante el uso de formación de imágenes de campo oscuro de rayos X para la visualización del agua. La instalación estaba equipada con un tubo de microfoco comercial operado a 60 kV y una energía de 100 W. Un detector de panel plano estándar con un tamaño de pixel de $127 \mu\text{m}$ y un centellador CsI se usó para la adquisición de imágenes. El interferómetro consiste en una trama de fuente, fase y analizador que se alinearon simétricamente a lo largo del eje del haz.

20

REIVINDICACIONES

1. Uso de una biopelícula bacteriana, o de al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana para la preparación de una composición de material hidrófoba a base de cemento.
- 5 2. Uso de una biopelícula bacteriana, o de al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana para reducir la capacidad de humectación de una composición de material a base de cemento.
3. Un procedimiento para hacer que una composición de material a base de cemento sea hidrófoba, que comprende la adición de una cantidad eficaz de una biopelícula bacteriana, o de al menos un componente de transporte de la hidrofobicidad de una biopelícula bacteriana a la composición de material a base de cemento.
- 10 4. El uso de la reivindicación 1 o 2, o el procedimiento de la reivindicación 3, en el que la cantidad de biopelícula bacteriana (contenido de biopelícula; bc) en la composición de material a base de cemento está entre 0,5% en peso y 10% en peso, preferentemente entre 1% en peso y 5% en peso, más preferentemente 2% en peso del peso seco de la composición final.
- 15 5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, o el procedimiento de la reivindicación 3 o 4, en el que dicha biopelícula bacteriana es una biopelícula que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en bacterias de la especie *Bacillus subtilis* y/o el género *Pseudomonas*, preferentemente de *Bacillus subtilis* 3610 de tipo salvaje, *Bacillus subtilis natto*, *Pseudomonas fluorescens* y/o *Pseudomonas putida*.
- 20 6. El uso o el procedimiento de la reivindicación 5, en el que dichas bacterias son de tipo salvaje, o están modificadas genéticamente para (i) alterar la producción de biopelículas, para (ii) alterar la expresión de los componentes de la biopelícula extracelular hidrófoba y/o para (iii) mejorar la maleabilidad de la biopelícula o de los componentes de la biopelícula.
- 25 7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4 a 6, o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que dicha biopelícula bacteriana se ha obtenido por el cultivo de bacterias en un medio de cultivo líquido, o sobre superficies sólidas, preferentemente en placas de agar, más preferentemente en placas de agar de caldo de lisogenia o caldo de lisogenia más placas de agar, y en el que dicha biopelícula bacteriana obtenida está opcionalmente liofilizada.
- 30 8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4 a 7, o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el que dicha composición de material hidrófoba a base de cemento es hidrófoba con relación a agua blanda, agua salada y/o mezclas de alcohol y agua que preferentemente forma un ángulo de contacto θ con una gotita de agua blanda, agua salada o una mezcla de alcohol y agua de 90° o más, más preferentemente de 90° a 120°.
- 35 9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4 a 7, o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en el que dicha composición de material hidrófoba a base de cemento comprende o consiste esencialmente en un mortero, un hormigón hidráulico, un hormigón no hidráulico o estuco de cemento y cal.
10. El uso o el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho material hidrófobo a base de cemento tiene una relación de agua a cemento (w/c) de 0,3 a 0,7, preferentemente de 0,4 a 0,6, más preferentemente de 0,5.

FIGURA 1

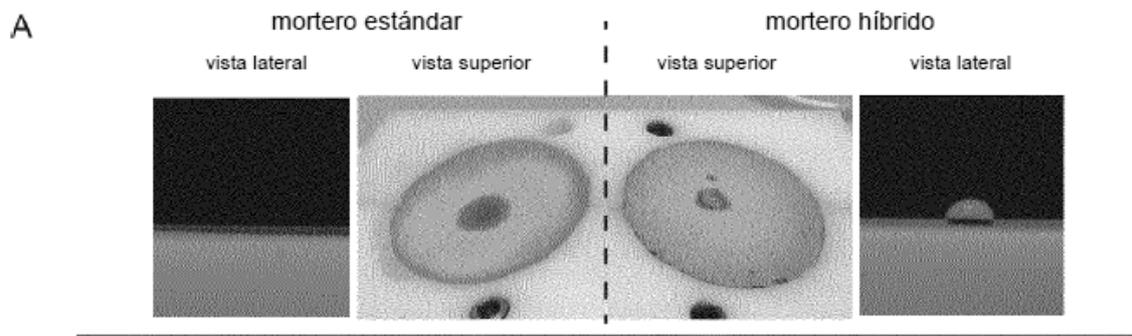


FIGURA 2

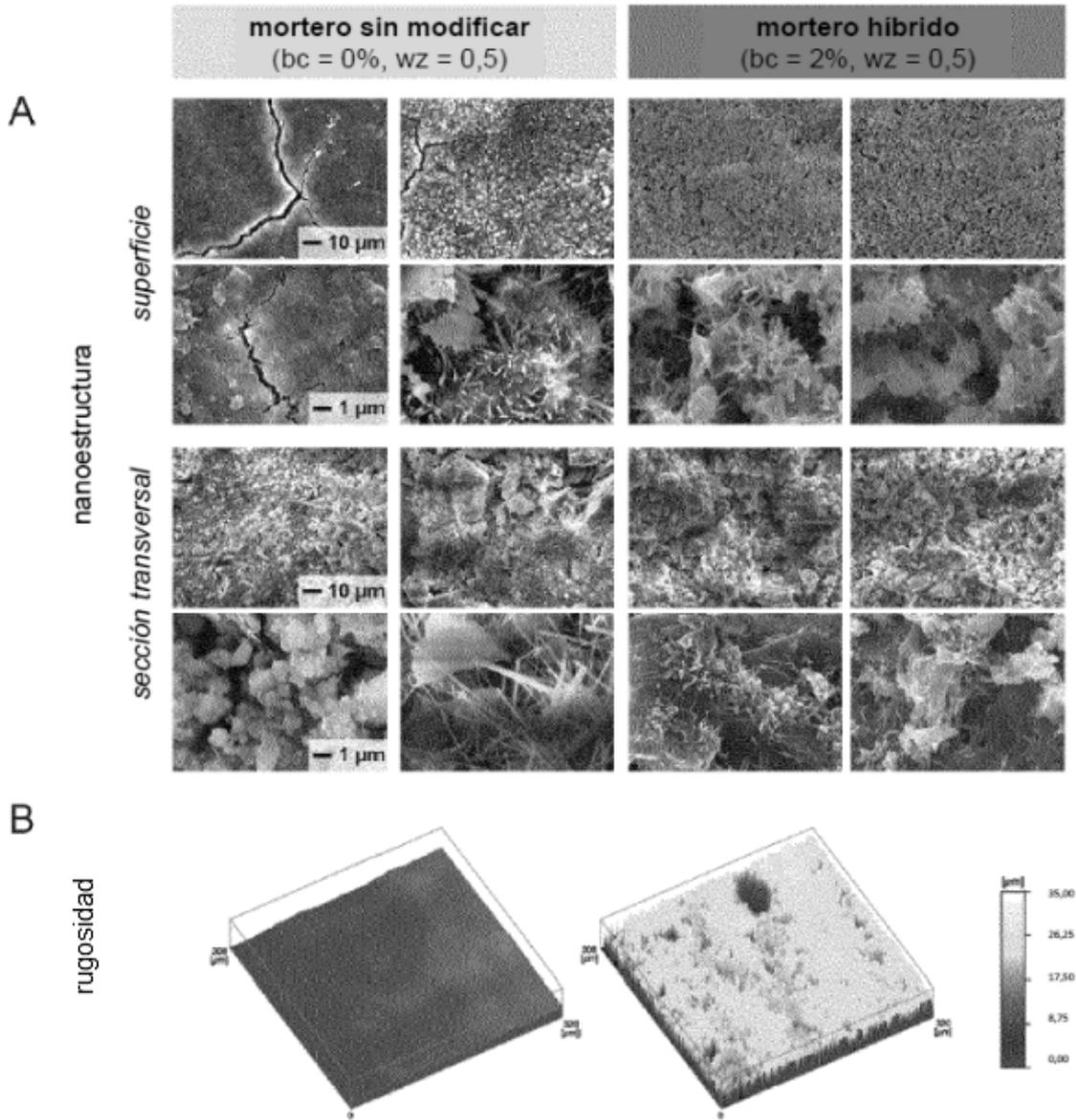


FIGURA 3

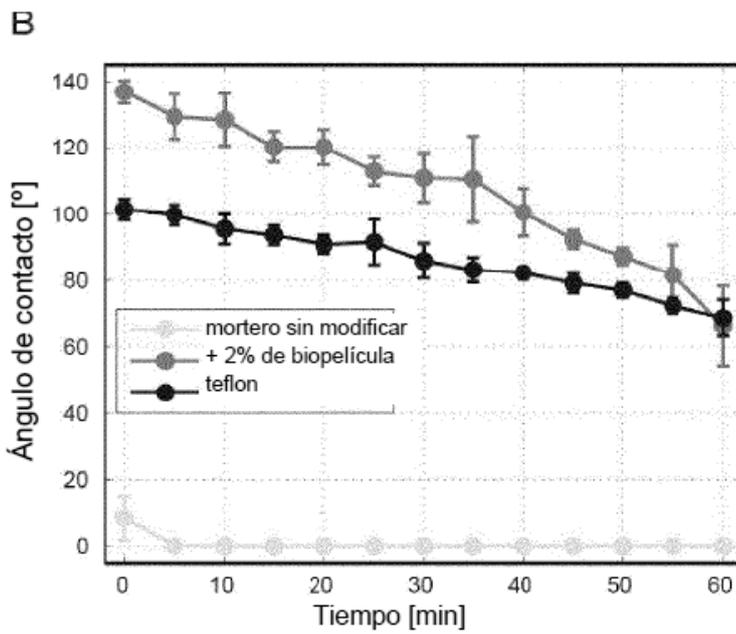
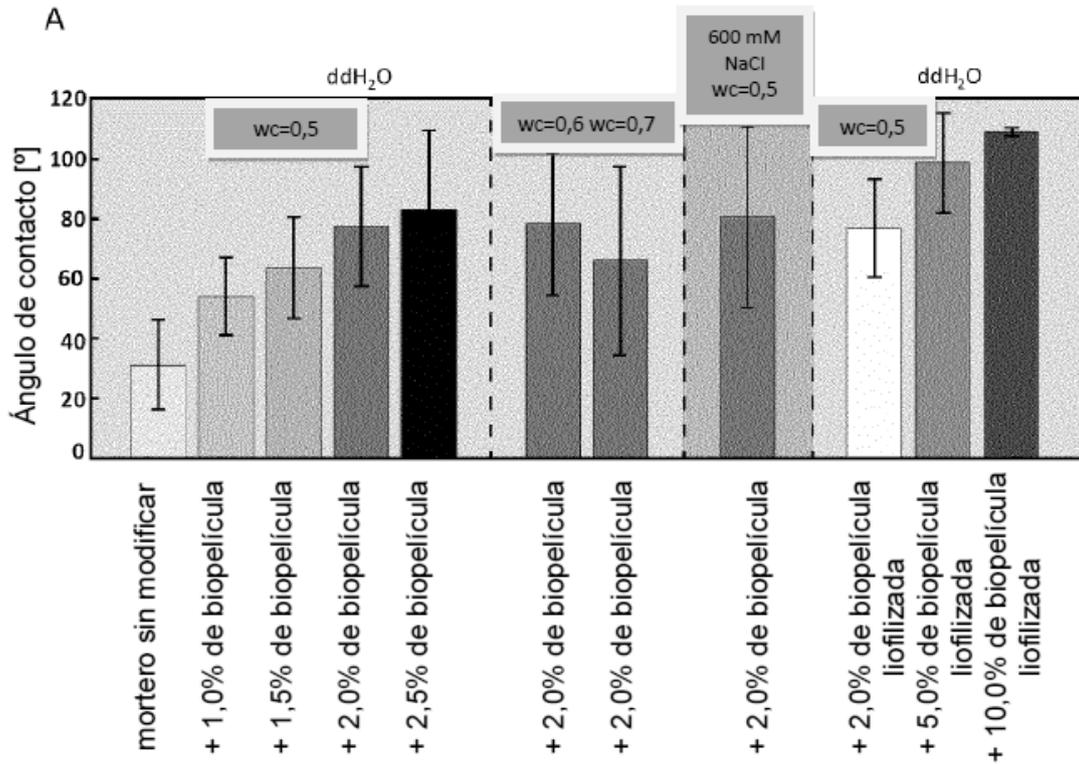
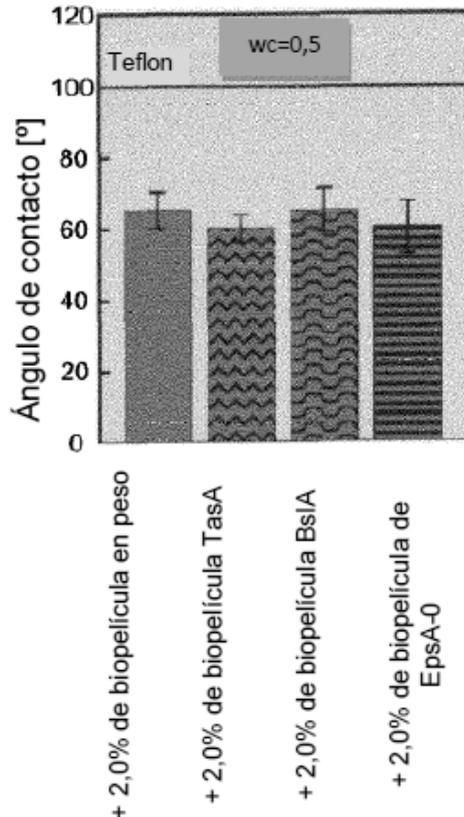


FIGURA 4

A



B

