



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NICOLE SCHWANTES

**DESEMPENHO DE *Bacillus sp.* NA BIOCIMENTAÇÃO DE  
MATERIAIS CIMENTÍCIOS**

---

Londrina  
2017

NICOLE SCHWANTES

**DESEMPENHO DE *Bacillus sp.* NA BIOCIMENTAÇÃO DE  
MATERIAIS CIMENTÍCIOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Engenharia de Edificações e Saneamento, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Berenice Martins Toralles

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Schwantes, Nicole.

Desempenho de *Bacillus sp.* na biocimentação de materiais cimentícios / Nicole Schwantes. - Londrina, 2017.

136 f. : il.

Orientador: Berenice Martins Toralles.

Dissertação (Mestrado em Edificações e Saneamento) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Tecnologia e Urbanismo, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Edificações e Saneamento, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Biocimentação - Tese. 2. Fechamento de poros - Tese. 3. Autocicatrização - Tese. I. Martins Toralles, Berenice. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Tecnologia e Urbanismo. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Edificações e Saneamento. III. Título.

NICOLE SCHWANTES

**DESEMPENHO DE *Bacillus sp.* NA BIOCIMENTAÇÃO DE MATERIAIS  
CIMENTÍCIOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Engenharia de Edificações e Saneamento, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Berenice Martins Toralles  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Gerson Nakazato  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Wellington Longuini Repette  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

---

Prof. Dr. Romel Dias Vanderlei  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Londrina, 21 de fevereiro de 2017.

*Ao meu querido e amado esposo Davi  
de Souza Cezario, pela compreensão, auxílio e  
carinho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades que me forneceu e por ter me dado subsídio para chegar até aqui, dando-me forças para não desistir dos meus sonhos e seguir o meu caminho dia após dia.

A minha orientadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Berenice Martins Toralles, que me repassou todo seu conhecimento, foi paciente e compreensiva o tempo todo.

Ao meu querido esposo Davi de Souza Cezario, que com muito carinho me ajudou a manter a calma, ter paciência e não desistir em momento algum.

Aos meus pais, Vilson Schwantes e Eloísa Bernardete Finkler Schwantes e ao meu irmão Daniel Schwantes, os quais são meu maior orgulho e exemplo de vida, que de forma especial sempre estiveram presentes em todos os momentos dividindo alegrias e tristezas e me dando forças para continuar na busca dos meus sonhos.

A CAPES pela bolsa recebida durante o desenvolvimento do mestrado.

Aos professores Gerson Nakazato e Renata Kobayashi por todo o auxílio e por disponibilizarem o laboratório de bacteriologia básica e aplicada para a realização de grande parte do experimento. E agradecendo a vocês, estendo meu agradecimento a todos os integrantes do NIP 3, principalmente ao doutorando Leonardo Medeiros, que me auxiliou e me ensinou a realizar todos os procedimentos necessários para o desenvolvimento dos experimentos na parte da microbiologia.

Ao professor Avacir Casanova Andrello, pela realização dos ensaios de porosidade por microtomografia computadorizada de raios X e também pela paciência e auxílio na interpretação dos resultados.

Ao professor Admilton Junior, por todo auxílio durante as análises em Microscópio Eletrônico de Varredura e também pela ajuda nas padronizações necessárias para que o experimento fosse finalizado com êxito, eu não teria conseguido sem a sua ajuda, muito obrigada!

Aos alunos de iniciação científica, Maria Fernanda Porto, Caroline Dias e Mateus Fonseca pelo auxílio no desenvolvimento das campanhas experimentais. Principalmente a Maria Fernanda, que esteve caminhando comigo durante todo o mestrado, auxiliando em tudo o que foi necessário.

Aos meus queridos amigos e companheiros de mestrado, Isabela Souza, Rafaela Paulino, Gersson Sandoval e Guilherme Peroso, pelo companheirismo e em especial a minha querida amiga Geovana Nogueira, pelo apoio, auxílio e amizade durante

a fase final do mestrado.

Aos técnicos do Laboratório de Materiais, Anderson e André, pela paciência e auxílio nos ensaios.

Aos técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise, pelo cuidado ao manusearem minhas amostras e pela ajuda na aquisição das imagens de Microscópio Eletrônico de Varredura.

Aos técnicos do Laboratório de Espectroscopia, de Análises por Técnicas de Raios X (LARX) e de Física Nuclear Aplicada (LFNA), pela disponibilidade dos equipamentos e realização dos ensaios de termogravimetria, microtomografia computadorizada de raios X e porosimetria por intrusão de mercúrio, respectivamente.

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou  
o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou  
o que era antes”.*

*Martin Luther King*

SCHWANTES, Nicole. **Desempenho de *Bacillus sp.* na biocimentação de materiais cimentícios.** 2017. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Edificações e Saneamento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

A durabilidade dos materiais cimentícios está intimamente ligada à porosidade, pois a partir de poros interligados a água consegue adentrar nestes materiais e acelera sua degradação. Com o intuito de diminuir a porosidade nos materiais cimentícios, as bactérias do gênero *Bacillus* estão sendo utilizadas como agentes biocimentantes de autocicatrização a partir da precipitação de cristais de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Estes cristais funcionam como preenchimento de poros dos materiais cimentícios, evitando sua deterioração precoce e protegendo-os não apenas dos desgastes sofridos pela água, mas também por outras substâncias prejudiciais. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a biocimentação em materiais cimentícios, mediante duas formas de adição de esporos bacterianos, nas propriedades mecânicas e microestruturais. O estudo foi dividido em duas campanhas experimentais: na primeira foram estudadas duas espécies bacterianas, *B. cereus* e *B. subtilis* AP91, com intuito de determinar qual apresentaria a maior precipitação deste cristal. A partir deste resultado, iniciou-se a segunda campanha, na qual a bactéria *B. subtilis* AP91 foi adicionada na concentração de 105 esporos/mL a uma argamassa básica de traço 1:3, com relação a/c de 0,63, de duas formas diferentes, na água de amassamento no momento da mistura e submersa em solução contendo os esporos bacterianos. As argamassas foram avaliadas quanto às propriedades mecânicas e características microestruturais. Com os resultados obtidos verificou-se que a bactéria *B. subtilis* AP91 apresentou uma maior precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , além de que os cristais formados por essa bactéria mostraram-se mais densos e com um maior pico de cálcio no EDS. Sua aplicação nas argamassas foi satisfatória, principalmente quando a bactéria foi adicionada na água de amassamento, pois aos 28 dias promoveu o aumento na resistência à compressão de 31,3% e a diminuição no índice de vazios e na absorção de água, de 6,3% e 3,5%, respectivamente. Além disso, na porosimetria por intrusão de mercúrio essa forma de adição apresentou diminuições maiores da porosidade, onde verificou-se que a bactéria é capaz de fechar poros menores do que 20  $\mu\text{m}$ . Sendo assim, concluiu-se que o uso de esporos da bactéria *B. subtilis* AP91 na água de amassamento de argamassas promoveu a biocimentação.

**Palavras-chave:** Biocimentação. Fechamento de poros. *B. subtilis*. Autocicatrização.

SCHWANTES, Nicole. **Performance of *Bacillus sp.* in biocimentation of cementitious materials.** 2017. 136 p. Dissertation (Master in Buildings and Sanitation Engineering) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

The durability of cementitious materials is closely linked to porosity, because from the interconnection of the pores, water can penetrate these materials and accelerate their degradation. In order to decrease the porosity in the cementitious materials, bacteria of the genus *Bacillus* are being used as a self-healing biocimentant agent by means of precipitation of calcium carbonate crystals ( $\text{CaCO}_3$ ). These crystals act filling the pores of the cementitious materials, preventing those materials from premature deterioration and protecting not only from water abrasion but also from other harmful substances. This study aims to evaluate the biocementation in cementitious materials analyzing two ways of bacterial spores addition, as well as the mechanical and microstructural properties of those materials. The study was divided into two experimental campaigns. In the first one, two bacteria (*B. cereus* and *B. subtilis* AP91) were studied in order to determine which of them would present the largest crystal precipitation. With this result, it was started the second campaign, when the *B. subtilis* AP91 strain was added at the concentration of 105 spores/mL to a basic mortar 1:3 ratio with w/c ratio of 0.63 in two different ways: in the kneading water at the time of mixing or submerged in a solution containing bacterial spores. The mortars' mechanical and microstructural properties were evaluated. The results of these tests showed that the *B. subtilis* AP91 strain presented a larger precipitation of  $\text{CaCO}_3$  besides that the crystals formed by this bacterium showed to be more dense and with a greater calcium peak in the EDS. Its application in mortar was satisfactory, particularly when the bacterium was added to the kneading water, since it promoted an increase to the compressive strength of 31.3% and a decrease to the void ratio and water absorption of 6.3% 3.5%, respectively. Moreover, in the Mercury Intrusion Porosimetry test, this way of addition resulted in larger decrease of the porosity, being that, it was found that the bacteria is capable of closing pores measuring less than 20  $\mu\text{m}$ . Thus, it was concluded that the use of *B. subtilis* AP91 spores in the mortar kneading water promoted biocimentation.

**Keywords:** Biocementation. Closing of pores. *B. subtilis*. Self-healing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação simplificada da precipitação de $\text{CaCO}_3$ .....	28
Figura 2 – Representação de microscopia eletrônica de varredura de uma amostra de <i>B. pasteurii</i> crescida com 0,2% de ureia e na presença de fosfato. ....	28
Figura 3 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revelando diferentes morfologias de cristais de calcita de <i>Bacillus subtilis</i> 168 .....	30
Figura 4 – Imagens microscópicas do fechamento das fissuras de amostras com adição de bactérias. (a) Visão geral da fissura com detalhe específico indicado por um quadrado pontilhado, visto de cima. (b) Imagem do precipitado e (c-e) imagens da parte superior do precipitado. ....	32
Figura 5 – MEV do $\text{CaCO}_3$ precipitado obtido a partir de diferentes temperaturas: 25°C (a), 50°C (b) e 75°C (c). ....	32
Figura 6 - Micrografia da divisão celular de <i>B. subtilis</i> . ....	34
Figura 7 - Germinação de um esporo do gênero <i>Bacillus</i> .....	35
Figura 8 - Comportamento de células bacterianas dentro de corpos de prova de argamassa.....	46
Figura 9 - Esquemática do funcionamento do microtomógrafo. ....	49
Figura 10 – Princípio da técnica de PIM, onde $p_0$ é a pressão inicial aplicada sobre a amostra .....	52
Figura 11 - MEV do tratamento de superfície com amostras de referência (sem bactéria) e com bactéria, tratadas com cloreto de cálcio e acetato de cálcio.....	54
Figura 12 - MEV das amostras de concreto .....	55
Figura 13 – Análise da precipitação de $\text{CaCO}_3$ no meio de cultivo B4.....	56
Figura 14 – MEV dos corpos de prova de referência e contendo <i>B. pasteurii</i> em diversas concentrações, assim como o DRX na região dos cristais .....	57
Figura 15 - Precipitação de $\text{CaCO}_3$ promovida por <i>B. sphaericus</i> (a-d) .....	57
Figura 16 – MEV e EDS da amostra contendo cristais precipitados pela bactéria <i>B. cohnii</i> .....	58
Figura 17 – Aglomerado de cristais de HC na superfície de $\text{C}_3\text{S}$ após 2,5 horas de hidratação.....	59
Figura 18 – C-S-H exterior formado após duas semanas de hidratação.....	60
Figura 19 - Produtos de hidratação do cimento Portland .....	60
Figura 20 – Fluxograma do trabalho experimental .....	63
Figura 21 - Placa com 24 poços.....	65
Figura 22 – Tubos cônicos de 15 mL com as bactérias inoculadas.....	68
Figura 23 – Recipientes com a solução de $10^5$ células de <i>B. subtilis</i> AP91/mL.....	71
Figura 24– Formas utilizadas na 2ª Campanha Experimental, onde em (a) estão apresentados os corpos de prova cilíndricos, de 50x100mm; em (b) os prismáticos, de 10x10x130 mm; em (c) o soquete utilizado para a compactação dos corpos de prova prismáticos e em (d) os tubos de ensaio utilizados para moldagem das amostras para termogravimetria. ....	73
Figura 25 – Corpos de prova prismáticos moldadas com a trinca induzida .....	74
Figura 26 – Amostras prismáticas fatiadas.....	74

Figura 27 – Microtomógrafo Skyscan (a) com o corpo de prova dentro do equipamento (b) .....	76
Figura 28 – Porosímetro Micromeritics Autopore IV .....	77
Figura 29 – Analisador termogravimétrico .....	77
Figura 30 – Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) .....	78
Figura 31 – Lupa Leica.....	79
Figura 32 – MEV apenas do meio de cultivo, com aumentos de (a) 12.000 x e (b) 20.000 x, com as setas apontando para a matéria orgânica (MO).....	80
Figura 33 – MEV do inóculo da bactéria <i>E. coli</i> HB101, com aumentos de (a) 12.000 e (b) 20.000 x, com as setas apontando para a matéria orgânica (MO). .....	81
Figura 34 - MEV do inóculo da bactéria <i>B. cereus</i> , com aumentos de (a) 3.000, (b) 12.000, (c) 6.000 e (d) 20.000 x, com as setas apontando para o biofilme formado.....	82
Figura 35 - MEV do inóculo da bactéria <i>B. subtilis</i> AP91 com ampliações de (a) 3.000, (b) 12.000, (c) 6.000 e (d) 20.000 x, com as setas apontando para o biofilme formado.	83
Figura 36 – Resultado teste urease .....	84
Figura 37 – MEV com aumentos de 50.000x e espectros de EDS das culturas crescidas durante 7 dias de <i>E. coli</i> HB101 (a), <i>B. cereus</i> (b) e <i>B. subtilis</i> AP91 (c).....	85
Figura 38 – MEV das amostras contendo <i>B. cereus</i> (a) e de <i>B. subtilis</i> , com ampliação de 15.000 x, com as setas apontando para as células bacterianas. ....	87
Figura 39 – MEV das amostras aos 7 dias com ampliação de 6.000 x. ....	116
Figura 40 – MEV das amostras aos 7 dias com ampliação de 12.000 x. ....	117
Figura 41 – MEV das amostras aos 28 dias com ampliação de 12.000 x, sendo (a) a ARG_REF, (b) a ARG_CTF, (c) a ARG_ESP_IM e (d) ARG_ESP_AM .....	118
Figura 42 – Espectro de EDS da ARG_REF aos 7 dias (a e b) e aos 28 dias (c).....	119
Figura 43 – Espectros da ARG_CTF aos 7 dias (a e b) e aos 28 dias (c).....	120
Figura 44 – Espectro de EDS da ARG_ESP_IM aos 7 dias (a e b) e aos 28 dias (c). .	121
Figura 45 – Espectro de EDS da ARG_ESP_AM aos 7 dias (a e b) e aos 28 dias (c).	122
Figura 46 – Acompanhamento das trincas por meio de lupa de todas as amostras analisadas.....	123
Figura 47 – Análise dos poros das argamassas aos 56 dias de cura. ....	124

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Influência dos meios de cultivo nos materiais cimentícios .....	42
Gráfico 2 – Resistência à compressão de argamassas com adição de bactérias e do meio B4 .....	42
Gráfico 3 – Influência do meio de adição da bactéria na resistência à compressão .....	43
Gráfico 4 – Variação da resistência à compressão em função da variação da concentração de bactérias .....	44
Gráfico 5 – Variação da resistência à compressão em relação a porcentagens de substituição de cinzas volantes (CV) e adição de concentrações de <i>B. pasteurii</i> .....	45
Gráfico 6 – Variação da resistência à compressão com diferentes porcentagens de substituição de cinza volante (CV) e sílica ativa (SA) mediante a diferentes concentrações de <i>B. pasteurii</i> .....	45
Gráfico 7 – Variação da absorção de água em relação a concentração de <i>B. pasteurii</i> /mL .....	50
Gráfico 8 – Variação da absorção de água em função da concentração de bactérias adicionadas em concreto com adição de diferentes substituições de Cinza Volante (CV) .....	51
Gráfico 9 – Variação da absorção de água em relação à concentração de bactéria adicionada em concreto com adição de diferentes substituições de Cinza Volante (CV) e Sílica Ativa (SA) .....	51
Gráfico 10 – Termogravimetria das amostras contendo <i>B. sphaericus</i> .....	62
Gráfico 11 – Precipitação média de CaCO <sub>3</sub> .....	87
Gráfico 12 – Curva granulométrica da areia .....	90
Gráfico 13 – Resultados de resistência à compressão aos 7 e 28 dias.....	93
Gráfico 14 - Resistência à tração por compressão diametral aos 7 e 28 dias .....	95
Gráfico 15 – Módulo de elasticidade dinâmico aos 7 e 28 dias .....	97
Gráfico 16 – Absorção de água aos 28 dias de cura.....	98
Gráfico 17 – Índice de vazios aos 28 dias .....	99
Gráfico 18 – Porosidade total aos 7 e 28 dias .....	100
Gráfico 19 – Porosidade aberta aos 7 e 28 dias .....	101
Gráfico 20 – Porosidade fechada aos 7 e 28 dias .....	101
Gráfico 21 – Percentual de poros da ARG_REF .....	102
Gráfico 22 – Percentual de poros da ARG_CTF.....	103
Gráfico 23 - Percentual de poros da ARG_ESP_IM .....	103
Gráfico 24 – Percentual de poros da ARG_ESP AM.....	104
Gráfico 25 – Porosidade total aos 7 e 28 dias .....	105
Gráfico 26 – Diâmetro de poro <i>versus</i> pressão.....	106
Gráfico 27 – Intrusão acumulativa <i>versus</i> pressão das argamassas (a) ARG_REF, (b) ARG_CTF, (c) ARG_ESP_IM e (d) ARG_ESP_AM .....	107
Gráfico 28 – Pressão <i>versus</i> Intrusão acumulativa das argamassas aos 7 dias de cura.	108
Gráfico 29 – Pressão <i>versus</i> Intrusão acumulativa de todas as argamassas aos 28 dias de cura. ....	108
Gráfico 30 – Porosidades dos diferentes ensaios aos 28 dias.....	110

Gráfico 31 – Derivada da perda de massa das amostras aos 7 dias.....	111
Gráfico 32 – Derivada da perda de massa das amostra aos 14 dias .....	113
Gráfico 33 – Derivada da perda de massa das amostra aos 28 dias .....	114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição granulométrica da areia.....	89
Tabela 2 – Resultados dos ensaios das argamassas em fresco .....	90
Tabela 3 – Resultados de resistência à compressão aos 7 dias.....	91
Tabela 4 – Resultados de resistência à compressão aos 28 dias.....	92
Tabela 5 – Resistência à tração por compressão diametral aos 7 dias .....	94
Tabela 6 - Resistência à tração por compressão diametral aos 28 dias .....	94
Tabela 7 – Módulo de Elasticidade Dinâmico aos 7 dias.....	96
Tabela 8 - Módulo de Elasticidade Dinâmico das argamassas aos 28 dias.....	96
Tabela 9 – Absorção de água aos 28 dias .....	98
Tabela 10 – Índice de vazios aos 28 dias .....	99
Tabela 11 – Porosidade total por $\mu$ -CT nos corpos de prova de 10x10x100mm, com resolução de 14 $\mu$ m.....	100
Tabela 12 – Pressão necessária para adentrar em cada tamanho de poro.....	106
Tabela 13 – Perda de massa aos 7 dias .....	112
Tabela 14 – Perda de massa aos 14 dias .....	113
Tabela 15 – Perda de massa aos 28 dias .....	114

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Concentrações da adição de bactérias utilizadas em pesquisas internacionais .....	37
Quadro 2 – Forma de adição da bactéria e cura dos corpos de prova .....	39
Quadro 3 - Meios de precipitação de CaCO <sub>3</sub> com a bactéria <i>B. subtilis</i> .....	40
Quadro 4 – Constituintes meio ágar ureia de Christensen.....	67
Quadro 5 – Nomenclatura das argamassas .....	70
Quadro 6 – Ensaio de caracterização do agregado miúdo .....	71
Quadro 7 – Consumo de materiais 2º Campanha Experimental .....	72
Quadro 8 – Ensaio no estado endurecido.....	75
Quadro 9 – Análise de Variância.....	88
Quadro 10 – Resultado do teste Tukey.....	88
Quadro 11 – Diferenças entre os ensaios de porosidade .....	110
Quadro 12 – Nomenclatura adotada .....	115

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.....	40
Equação 2.....	53
Equação 3.....	61
Equação 4.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACI	American Concrete Institute
Atm	Atmosfera
C3S	Silicato tricálcico
Ca	Cálcio
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de Cálcio
Cc	Calcita
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CP	Corpo de prova
C-S-H	Silicato de cálcio hidratado
CV	Cinza Volante
DRX	Difração de raios-X
EDS	Energy Dispersive System
EDX	Ensaio de difração de raios-X
EPS	<i>Extracellular polymeric substances</i>
Etr	Etringita
HC	Hidróxido de cálcio
LARX	Laboratório de Análises por Técnicas de raios-X
LB	Luria-Bertani
LMEN	Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica e Microanálise
MBI	Mineralização Biologicamente Induzida
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
NaCl	Cloreto de sódio
NBR	Norma Brasileira
PIM	Porosimetria por Intrusão de Mercúrio
pH	Potencial hidrogeniônico
SA	Sílica Ativa
SG	Sílica Gel
UEL	Universidade Estadual de Londrina
Vat	Varita

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
1.1	JUSTIFICATIVA	22
1.2	OBJETIVO GERAL	23
1.3	QUESTÃO DE PESQUISA	23
1.4	DELIMITAÇÃO DE PESQUISA	24
1.5	CONTRIBUIÇÃO ESPERADA	24
1.6	ESTRUTURA DO TRABALHO	24
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>25</b>
2.1	A ENGENHARIA ECOLÓGICA E O USO DE MICRORGANISMOS	25
2.1.1	<i>Bactérias e a Bioprecipitação de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>)</i>	26
2.1.1.1	Mecanismos de precipitação de CaCO <sub>3</sub>	27
2.1.1.2	Tipos de carbonato de cálcio	30
2.1.2	<i>Bactérias utilizadas para a biocimentação</i>	33
2.1.2.1	Características da bactéria <i>B. subtilis</i>	34
2.1.2.2	Concentração de bactéria para a biocimentação	36
2.1.2.3	Formas de adição das bactérias nos materiais cimentícios	38
2.2	A INFLUÊNCIA DA BIOCIMENTAÇÃO NAS PROPRIEDADES DOS MATERIAIS CIMENTÍCIOS	41
2.2.1	<i>Resistência à compressão</i>	41
2.2.2	<i>Porosidade</i>	47
2.2.2.1	Microtomografia computadorizada de raios-X	48
2.2.2.2	Absorção de água	50
2.2.2.3	Porosimetria por intrusão de mercúrio (PIM)	52
2.2.3	<i>Análise microestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS)</i>	53
2.2.3.1	Análise dos cristais de CaCO <sub>3</sub>	54
2.2.3.2	Análise dos produtos de hidratação do cimento	59
2.2.4	<i>Termogravimetria (TG)</i>	61
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>63</b>
3.1	PRIMEIRA CAMPANHA EXPERIMENTAL	64
3.1.1	<i>Estudo Preliminar A</i>	64
3.1.1.1	Produção de Biofilme	64
3.1.1.2	Produção de Urease	66
3.1.2	<i>Estudo Preliminar B</i>	67
3.1.2.1	Preparação do meio B4 e inóculo da bactéria	67
3.1.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) do CaCO <sub>3</sub> precipitado	68
3.1.2.3	Quantificação do material retido no filtro	68
3.2	SEGUNDA CAMPANHA EXPERIMENTAL	69
3.2.1	<i>Materiais</i>	69
3.2.2	<i>Método</i>	70
3.2.2.1	Preparo dos esporos bacterianos	70
3.2.2.2	Caracterização do agregado miúdo	71
3.2.2.3	Elaboração das argamassas	72
3.2.2.4	Ensaio realizado no estado endurecido	75
3.2.2.5	Porosimetria por microtomografia computadorizada de raios-X (μ-CT)	75
3.2.2.6	Porosimetria por intrusão de mercúrio (PIM)	76
3.2.2.1	Termogravimetria (TG)	77
3.2.2.2	Análise Microestrutural no Microscópio Eletrônico de Varredura	78
3.2.2.3	Análise das trincas por meio de lupa	78

<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>80</b>
4.1	PRIMEIRA CAMPANHA EXPERIMENTAL.....	80
4.1.1	<i>Produção de biofilme.....</i>	80
4.1.2	<i>Produção da enzima urease.....</i>	84
4.1.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) do material precipitado.....</i>	85
4.1.4	<i>Quantificação dos cristais de CaCO<sub>3</sub>.....</i>	87
4.2	SEGUNDA CAMPANHA EXPERIMENTAL.....	89
4.2.1	<i>Caracterização do agregado miúdo .....</i>	89
4.2.2	<i>Propriedades da argamassa no estado fresco .....</i>	90
4.2.3	<i>Propriedades da argamassa no estado endurecido .....</i>	91
4.2.3.1	Resistência à compressão .....	91
4.2.3.2	Resistência à tração por compressão diametral .....	93
4.2.3.3	Módulo de Elasticidade Dinâmico .....	95
4.2.3.4	Absorção de água e índice de vazios .....	97
4.2.3.5	Porosimetria por microtomografia computadorizada de raios-X ( $\mu$ -CT) .....	100
4.2.3.6	Porosimetria por intrusão de mercúrio (PIM).....	105
4.2.3.7	Termogravimetria.....	111
4.2.3.8	Análise microestrutural no MEV.....	115
4.2.3.9	Análise das trincas por meio de lupa.....	123
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>125</b>
5.1	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS .....	126
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>127</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os materiais cimentícios são muito utilizados em todo o mundo por serem resistentes, duráveis e adaptáveis a diversas formas geométricas (ALDEA, 2000). Porém, estes materiais estão sujeitos a manifestações patológicas que podem comprometer sua integridade e durabilidade (FHWA, 2001). De acordo com a ACI Concrete Terminology (2013), a durabilidade de materiais cimentícios é definida a partir da sua capacidade de resistir à ação de intempéries, ataques químicos e outras condições em serviço.

Uma das propriedades que influenciam na durabilidade e resistência dos materiais cimentícios é a porosidade, sendo que existe uma razão inversamente proporcional entre a porosidade do material e sua resistência. Em materiais multifásicos, como os materiais cimentícios, a porosidade de cada componente acaba se tornando um fator limitante da resistência do material (DE ASSIS *et al.*, 2009).

A água costuma ser o principal elemento associado aos problemas de durabilidade, pois nos sólidos porosos ela causa a maioria dos processos químicos de degradação. Os fenômenos físico-químicos associados ao transporte de água nos sólidos são analisados em função da permeabilidade do mesmo, característica intimamente relacionada com a porosidade, já que permeabilidade ocorre quando os poros dos materiais estão interligados (SILVA, 2000; DE ASSIS *et al.*, 2009).

Com o intuito de diminuir a porosidade nos materiais cimentícios, surge uma inovação tecnológica a partir da adição de bactérias do gênero *Bacillus*. Essas bactérias têm capacidade de promover a precipitação de cristais de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), através de diversos metabolismos. Na maioria das vezes, as bactérias utilizam o gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) e uma fonte de cálcio (Ca) para promover esta precipitação. Estes cristais atuam como agentes biocimentantes e proporcionam a autocicatrização de poros e fissuras nos materiais cimentícios, evitando sua deterioração precoce e os protegendo não apenas dos desgastes causados pela água, mas também por outras substâncias prejudiciais (JONKERS *et al.*, 2010; GEORGE e JIN LI, 2010).

As pesquisas já realizadas apontam duas formas de adição das bactérias aos materiais cimentícios, na água de amassamento no momento da mistura do material (RAMACHANDRAN *et al.*, 2001; WIKTOR e JONKERS, 2011; ABO-EL-ENIEN *et al.*, 2013; PEI *et al.*, 2013; XU e YAO, 2014; KRISHNAPRYA *et al.*, 2015; AL-SALLOUM *et al.*, 2016) ou por imersão dos corpos de prova em solução contendo a bactéria (DE MUYNCK *et*

*al.*, 2008; VAN TITTELBOOM *et al.*, 2010). Porém, ainda são escassas as pesquisas que confrontam estas formas de adição, tornando-se importante este estudo de forma comparativa.

Dentre as bactérias utilizadas nas pesquisas, destaca-se a bactéria *B. subtilis*, que é estudada na produção de calcita, forma cristalina de  $\text{CaCO}_3$ , em meios com uma fonte de cálcio. Esta bactéria é produtora de uma variedade de enzimas e se reproduz facilmente e em grande proporção, sendo que no seu crescimento as células são capazes de produzir esporos<sup>1</sup> e biofilme<sup>2</sup> (MONTROYA *et al.*, 2005).

Diante do exposto, se verifica a importância de desenvolver uma pesquisa que confirme a viabilidade do uso de microrganismos para a biocimentação de poros em materiais cimentícios mediante a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  promovida pela adição de esporos da bactéria *Bacillus subtilis*.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Os materiais cimentícios são os materiais mais utilizados no mundo além da água. Porém, na produção de cimento ocorre a liberação de aproximadamente uma tonelada de  $\text{CO}_2$  na atmosfera para cada tonelada produzida. Com isso, surgem preocupações ambientais envolvendo a sustentabilidade, exigindo o estudo de materiais alternativos que possam tornar os materiais cimentícios mais duráveis, além de se estudar uma forma de absorver parte desse  $\text{CO}_2$  emitido na produção do cimento (ACHAL *et al.*, 2015).

Por outro lado, na natureza existe uma infinidade de exemplos de habitats sustentáveis, como recifes de corais e formigueiros. Recentes avanços na biotecnologia apontam para o potencial de uso de bactérias que possam aumentar a durabilidade dos materiais cimentícios, mais um passo rumo à sustentabilidade (ACHAL *et al.*, 2015).

As bactérias já existem há bilhões de anos, porém muitas das suas aplicações biotecnológicas ainda não são difundidas (BANG *et al.*, 2001). Atualmente estão sendo realizadas pesquisas em diversas partes do mundo em relação a adições que proporcionem a autocicatrização de materiais cimentícios. Porém, obter uma compreensão profunda dos mecanismos e princípios básicos dos materiais que são capazes de fechar poros e fissuras ainda é um objetivo desafiador (VAN TITTELBOOM *et al.*, 2012, ABO-EL-ENEIN *et al.*, 2013).

---

<sup>1</sup> Esporos são formados por alguns gêneros de bactérias quando as mesmas se encontram em condições adversas para o crescimento.

<sup>2</sup> Biofilmes são conjuntos de microrganismos com elevado grau de organização, onde os mesmos formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais envoltas por uma matriz exopolissacarídea (EPS).

Além disso, verificar como as bactérias precipitam carbonato de cálcio é de fundamental importância, pois a literatura ainda não é muito clara em relação aos mecanismos envolvidos no processo de bioprecipitação. Estudos recentes mostraram que existem alguns fatores para as bactérias precipitarem carbonato de cálcio, entre estes destaca-se a presença de  $\text{CO}_2$ , o qual pode ser oriundo do próprio EPS produzido pelas bactérias ou capturado da atmosfera. É interessante mencionar, que a produção do cimento é uma das maiores emissoras globais de  $\text{CO}_2$  e a adição de bactérias é uma forma de reabsorver parte do gás carbônico emitido, tornando o uso de bactérias nos materiais cimentícios uma forma vantajosa no aspecto ambiental, além de apresentar resultados positivos de melhorias em algumas propriedades dos materiais cimentícios (MEHTA e MONTEIRO, 2014; GEORGE e JIN LI, 2010).

Esse tipo de material pode ser aplicado em argamassas de revestimento, assentamento e obras de concreto massa aplicados em barragens, pontes, estrutura de contenção, etc. O seu uso em obras de concreto armado não é indicado, pois o processo de precipitação de  $\text{CaCO}_3$  diminui a alcalinidade dos materiais, despassivando a armadura.

A pesquisa em questão contribuirá para o estudo de adições de microrganismos em materiais cimentícios, pois no Brasil os estudos nessa área ainda são escassos. A literatura aponta que esse tipo de adição é uma alternativa para melhoria da resistência à compressão e da porosidade, além de resultar no aumento da vida útil e ser satisfatória ambientalmente, pois pode atuar na reabsorção de  $\text{CO}_2$  atmosférico.

## 1.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a biocimentação em materiais cimentícios nas propriedades mecânicas e características microestruturais, mediante duas formas de adição de esporos bacterianos: na água de amassamento e por imersão em solução contendo os esporos.

## 1.3 QUESTÃO DE PESQUISA

A adição de esporos bacterianos em materiais cimentícios é capaz de promover biocimentação a partir da precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , mantendo uma resposta adequada para as características microestruturais e requisitos mecânicos, tais como a resistência à compressão e módulo de elasticidade?

#### 1.4 DELIMITAÇÃO DE PESQUISA

A pesquisa delimitou-se a avaliar a biocimentação promovida por duas formas de adição de esporos da bactéria *B. subtilis* AP91 na concentração de  $10^5$  esporos/ml, na água de amassamento e por imersão em solução contendo os esporos, em um argamassa básica de traço 1:3 (cimento: areia) com relação água/cimento de 0,63, com o uso do cimento CP II E – 32.

#### 1.5 CONTRIBUIÇÃO ESPERADA

Espera-se com esse trabalho apresentar dados que comprovem a viabilidade da utilização de argamassas com adição de microrganismos com função de biocimentação, promovendo o fechamento de poros e resultando em uma melhoria na durabilidade.

#### 1.6 ESTRUTURA DO TRABALHO

O presente trabalho está estruturado em cinco capítulos, sendo o primeiro dedicado a introdução, a justificativa, o objetivo, a questão de pesquisa, a delimitação de pesquisa e a contribuição esperada.

No segundo capítulo se apresenta a revisão bibliográfica, estudando primeiramente a engenharia ecológica e o uso de microrganismos, abordando sobre as bactérias e a bioprecipitação de  $\text{CaCO}_3$  e as bactérias utilizadas para biocimentação. Na sequência estão apresentadas as propriedades dos materiais cimentícios com adição de bactérias.

Os materiais empregados e os métodos utilizados no desenvolvimento das campanhas experimentais se encontram no terceiro capítulo. Sendo que os métodos adotados na pesquisa estão fundamentados na normatização técnica nacional.

Os resultados e suas discussões, tanto no que se refere aos mecanismos de precipitação de  $\text{CaCO}_3$  quanto as características mecânicas e microestruturais das argamassas estudadas estão descritos no quarto capítulo.

Por fim, o quinto e último capítulo traz as conclusões do trabalho, relacionadas com o objetivo proposto e as sugestões para trabalhos futuros.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No presente capítulo está apresentada a compilação do estudo de materiais cimentícios com adição de bactérias, abordando sobre a engenharia ecológica e o uso de microrganismos, as bactérias e a bioprecipitação de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e as propriedades dos materiais cimentícios afetadas pela adição de bactérias.

### 2.1 A ENGENHARIA ECOLÓGICA E O USO DE MICRORGANISMOS

A engenharia ecológica aborda sobre a necessidade da preservação ambiental e da redução de emissões de gases nocivos. Este pensamento tem levado à uma nova visão de tecnologias que utilizam os recursos naturais de maneira mais econômica e menos destruidora (TEIXEIRA, 2005).

Essas tecnologias são aplicadas na busca de materiais sustentáveis, com maior durabilidade e um desempenho satisfatório. Neste contexto, alguns microrganismos começaram a ser empregados para diversos fins na engenharia, como por exemplo o uso de bactérias para a remoção de produtos químicos a partir de fluxos de águas residuárias (GROSS *et al.*, 2007), para a biorremediação de solos contaminados (CHATURVEDI *et al.*, 2006) e remoção de gases de efeito estufa dos aterros (JUGNIA *et al.*, 2008).

Além destas utilizações, algumas bactérias produtoras de minerais foram empregadas para reparação de monumentos de pedra calcária (GOLLAPUDI *et al.*, 1995; STOCKS-FISCHER *et al.*, 1999; TIANO *et al.*, 1999; BACHMEIER *et al.*, 2002; DICK *et al.*, 2006; RODRIGUEZ-NAVARRO *et al.*, 2003) e no enchimento de poros e fissuras no concreto e demais materiais cimentícios (BANG *et al.*, 2001; RAMACHANDRAN *et al.*, 2001; DE MUYNCK *et al.*, 2008; RAMAKRISHNAN, 2007; VAN TITTELBOOM *et al.*, 2010; WIKTOR e JONKERS, 2011; JONKERS *et al.*, 2010; VAN TITTELBOOM *et al.*, 2012; ACHAL *et al.*, 2013; XU e YAO, 2014; DE KOSTER, *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2015).

Segundo Jonkers *et al.* (2010), essas bactérias são adicionadas aos materiais cimentícios a fim de reduzir sua porosidade e fechar fissuras, sendo apresentadas como uma técnica de reparação sustentável e promissora, a qual está sendo investigada e desenvolvida em várias universidades do mundo, dentre elas destaca-se a Universidade de Delf, na Holanda, a Universidade de Ghent, na Bélgica, a Universidade Thapar, na Índia e a Faculdade de Engenharia de Bruxelas, na Bélgica.

Esta técnica utiliza bactérias do gênero *Bacillus*, que tem capacidade de produzir minerais. Existem algumas vantagens da aplicação destas bactérias na engenharia

ecológica, pois de acordo com Pei *et al.* (2013) as paredes celulares bacterianas podem ter influência sobre algumas características dos materiais cimentícios, como a diminuição da porosidade, cura autógena de fissuras e reabsorção de CO<sub>2</sub> atmosférico.

A reabsorção do CO<sub>2</sub> nos materiais cimentícios por ação de bactérias se torna ambientalmente significativa, visto que a fabricação do cimento contribui com 7% das emissões de CO<sub>2</sub> anuais, sendo esse percentual expressivo (MEHTA e MONTEIRO, 2014). Este fator torna a adição de bactérias nos materiais cimentícios promissora, pois segundo Pade e Guimarães (2007) e Gajda (2001), em média 40% de CO<sub>2</sub> emitido durante o fabricação do cimento pode ser absorvido durante a vida útil dos materiais cimentícios, a partir do processo de carbonatação.

Porém, com o avanço das pesquisas, foi observada a necessidade de se obter uma compreensão mais profunda dos mecanismos e princípios básicos da biocimentação promovida pela ação bacteriana. Pois várias bactérias são capazes de produzir minerais por diferentes metabolismos, os quais ainda não são claros e definidos (VAN TITTELBOOM *et al.*, 2012, ABO-EL-ENEIN *et al.*, 2013).

### 2.1.1 Bactérias e a Bioprecipitação de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>)

Os microrganismos existem há bilhões de anos, constituindo a maior massa de matéria viva na terra. Eles são responsáveis pela realização de muitos processos químicos necessários para a sobrevivência de outros organismos. As bactérias são microrganismos de estrutura celular simples e podem ser encontradas na maioria dos ambientes naturais, possuem uma enorme variedade e têm capacidade de se adaptarem as mudanças ambientais, favorecendo seu crescimento (MADIGAN *et al.*, 2010).

Segundo González *et al.*, (2014) as bactérias são classificadas em gêneros e espécies. As bactérias do gênero *Bacillus* são facilmente encontradas no solo, possuem uma grande diversidade e tem facilidade para se adaptarem a diversas condições ambientais. As bactérias do gênero *Bacillus* estão sendo estudadas no processo de bioprecipitação<sup>3</sup>, que segundo Frankel e Bazylnski (2003) é um processo de grande importância para aplicações científicas e comerciais, e apresenta um impacto em várias áreas do conhecimento.

A bioprecipitação promovida por bactérias tem sido estudada como um mecanismo alternativo para a proteção dos materiais de construção, pois como resultado de algumas atividades metabólicas bacterianas, ocorre a precipitação de minerais de carbonato de

---

<sup>3</sup> Precipitação promovida por microrganismos.

cálcio. O  $\text{CaCO}_3$  precipitado colmata poros e fissuras dos materiais cimentícios, diminuindo sua porosidade e prolongando sua vida útil (ABO-EL-ENEIN *et al.*, 2013).

O carbonato de cálcio pode ser precipitado por microrganismos a partir de diversos mecanismos, de acordo com Barabesi *et al.* (2007), a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  promovida por bactérias é classificada como um mecanismo de Mineralização Biologicamente Induzida (MBI).

#### 2.1.1.1 Mecanismos de precipitação de $\text{CaCO}_3$

A precipitação de  $\text{CaCO}_3$  por ação de bactérias é considerada como MBI, pois o processo resulta em minerais que são formados a partir de uma atividade metabólica involuntária (PARK *et al.*, 2012).

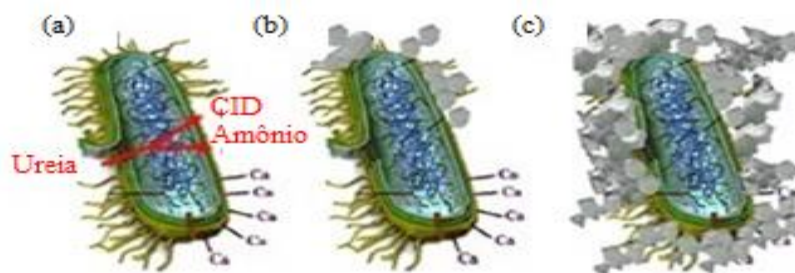
Essa precipitação a partir da MBI pode ocorrer de quatro formas em meios com uma fonte de cálcio: pela hidrólise de ureia, promovida por bactérias ureolíticas; a partir da fotossíntese, por meio de bactérias autotróficas<sup>4</sup>, pela redução de sulfatos, resultante do metabolismo de bactérias redutoras de sulfatos ou pela mudança de pH durante a produção de biofilme. Segundo Hammes e Verstraete (2002), na maioria dos casos essa precipitação promovida por bactérias acontece a partir da hidrólise de ureia, a qual ocorre por meio de uma enzima produzida por algumas bactérias, a enzima urease.

Para que haja essa precipitação, existem alguns fatores que devem ser levados em consideração, são eles: a concentração do Carbono Inorgânico Dissolvido (CID), o pH, a concentração do íons de cálcio, a presença dos locais de nucleação e de ureia. Segundo Hammes e Verstraete (2002), os primeiros três fatores resultam do metabolismo das bactérias, enquanto o local de nucleação é a própria parede celular das bactérias, onde o  $\text{CaCO}_3$  será precipitado na parede celular bacteriana, envolvendo a célula. A representação simplificada da precipitação de  $\text{CaCO}_3$  nos locais de nucleação, pode ser visualizada na Figura 1.

---

<sup>4</sup> Bactérias autotróficas são capazes de produzir seu próprio alimento por intermédio da fotossíntese ou quimiossíntese. No primeiro caso, a fonte de energia utilizada para obtenção de alimentos é a luz solar, já os organismos quimiotróficos retiram sua energia de substâncias químicas.

**Figura 1 - Representação simplificada da precipitação de  $\text{CaCO}_3$**

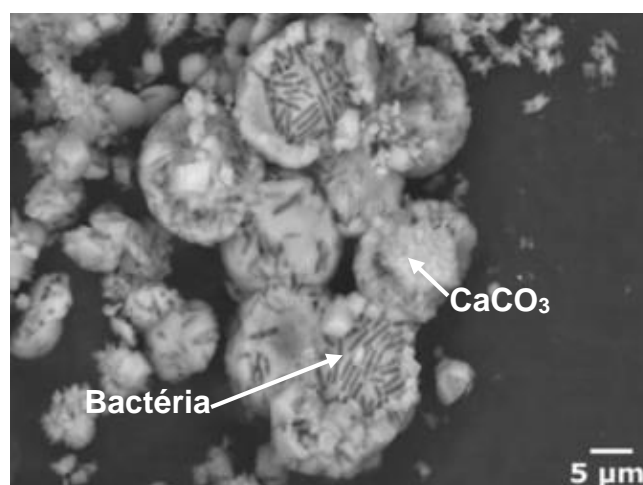


**Fonte:** Adaptado de DE MUYNCK *et al.* (2010).

A partir da visualização da Figura 1 (a), pode-se observar que os íons de cálcio presentes na solução foram atraídos para a parede celular bacteriana devido à sua carga negativa. Com a adição de ureia na solução o carbono inorgânico dissolvido (CID) e o amônio são liberados pelo metabolismo das bactérias. Na presença dos íons de cálcio, ocorre a precipitação de carbonato de cálcio na parede celular bacteriana, conforme a Figura 1 (b). Por fim, na Figura 1 (c) é possível verificar que toda a célula torna-se envolvida pelo  $\text{CaCO}_3$  (DE MUYNCK *et al.*, 2010).

Na Figura 2 pode-se observar através da Microscopia Eletrônica de Varredura o esquematizado na Figura 1, onde a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  deu-se a partir da hidrólise da ureia. Verifica-se que as células bacterianas estão envolvidas pelo  $\text{CaCO}_3$ . Segundo Dupraz *et al.* 2009<sup>(2)</sup>, os precipitados se apresentaram em alturas diferentes, com alta densidade de células, mostrando o processo de bioprecipitação nas paredes celulares, como locais de nucleação.

**Figura 2 – Representação de microscopia eletrônica de varredura de uma amostra de *B. pasteurii* crescida com 0,2% de ureia e na presença de fosfato.**



**Fonte:** DUPRAZ *et al.* (2009)<sup>(2)</sup>

A hidrólise da ureia acarreta o aumento da alcalinidade, o que dissolve o carbono inorgânico do meio e favorecendo a liberação de carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) que, por meio de atração iônica, é ligado aos íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) presentes nas soluções, precipitando o  $\text{CaCO}_3$  (HAMMES *et al.*, 2003).

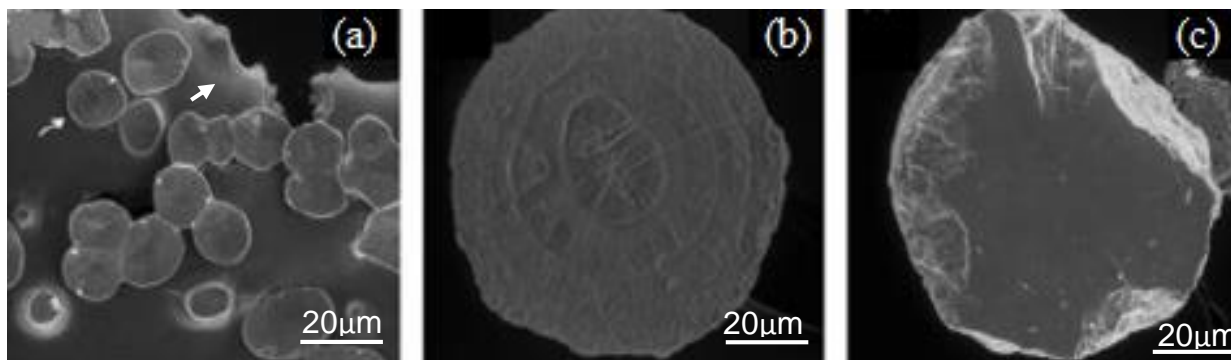
Porém, o uso de bactérias ureolíticas pode gerar alguns problemas nos materiais cimentícios, devido à redução da alcalinidade ocasionada pela carga de nitrogênio liberado pela produção de amônio durante a hidrólise da ureia (DHAMI *et al.*, 2012). Para tanto, se torna necessário o estudo das demais formas de precipitação de  $\text{CaCO}_3$  por vias metabólicas microbianas.

Neste contexto, foram iniciados estudos da precipitação de  $\text{CaCO}_3$  por meio da mudança de pH durante produção de biofilme, em meios com fonte de cálcio. Nestas pesquisas observou-se que biofilmes e esporos dormentes podem atuar como locais de nucleação do mineral sem adição de ureia (BÄUERLEIN, 2003).

Porém, sem a hidrólise da ureia não havia um entendimento de como as bactérias influenciariam na liberação de carbono orgânico dissolvido (CID). Algumas pesquisas sugeriram que proteínas específicas de substâncias extracelulares (EPS) podem controlar a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  (KAWAGUCHI e DECHO, 2002). Além de que apenas a mudança do pH do meio e a presença de uma fonte de cálcio seriam capazes de realizar a precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , sugerindo que o  $\text{CO}_2$  necessário para essa precipitação poderia ser capturado da atmosfera ou encontrado no próprio EPS (BÄUERLEIN, 2003; KAWAGUCHI e DECHO, 2002).

Na Figura 3 estão demonstradas as diferentes morfologias dos cristais que podem ser precipitados neste processo a partir da mudança de pH na produção de biofilme, a partir da cepa *B. subtilis* 168, sendo que na Figura 3 (a) estão representados os cristais presentes em biofilmes de *B. subtilis* 168 após uma semana de incubação (a seta branca indica um dos cristais no biofilme) e na Figura 3 (b e c) os cristais formados em cultivo líquido do meio B4 após 1 mês de incubação.

**Figura 3 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revelando diferentes morfologias de cristais de calcita de *Bacillus subtilis* 168**



**Fonte:** Marvasi *et al.* (2010)

Observou-se uma diferença entre as morfologias dos cristais nas diferentes condições. Segundo Braissant *et al.* (2003) a morfologia do cristal pode ser afetada pela concentração da bactéria e do meio de cultivo, acidez e pH do meio.

A condição alcalina dos materiais cimentícios, com pH variando de 10 a 13 (LEA, 1970), torna o ambiente hostil para o crescimento bacteriano, sendo este um dos principais desafios enfrentados pelo processo de biocimentação. Para tanto, são utilizadas bactérias álcali-resistentes, que a partir da entrada de umidade conseguem se reproduzir e precipitar carbonato de cálcio nos materiais cimentícios (ACHAL *et al.*, 2010).

Segundo Barabesi *et al.* (2007), pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , sendo que a morfologia do cristal sofre interferências de condições ambientais. Além disso, as bactérias têm um efeito direto sobre o meio em que os cristais de carbonato de cálcio são formados, pois são estes microrganismos que determinam o local de nucleação e crescimento do cristal. Para tanto, torna-se necessário identificar os tipos de carbonato de cálcio precipitados e quais bactérias são capazes de precipitá-los.

#### 2.1.1.2 Tipos de carbonato de cálcio

Na natureza, o carbonato de cálcio pode ser encontrado em três diferentes estruturas cristalinas: calcita, aragonita e varita, sendo que a calcita é a sua forma mais estável em condições ambientais (CHONG E SHEIKHOLESAMI, 2001; XIANG *et al.*, 2002; WEN *et al.*, 2003).

A aragonita e a varita são metaestáveis<sup>5</sup>, sendo que a aragonita muda irreversivelmente para calcita quando aquecida em ar seco a cerca de 400 °C e a varita se transforma em calcita e/ou aragonita em condições geológicas (REEDER, 1990). O processo de transformação de varita em calcita leva várias horas (YAMAGUCHI e MURAKAWA, 1981) e de aragonita para calcita vários meses (TAFT, 1967), ambos em temperatura ambiente. De acordo com Wray e Daniels (1957) a aragonita é precipitada em temperaturas de em média 70°C e a varita em média 30°C.

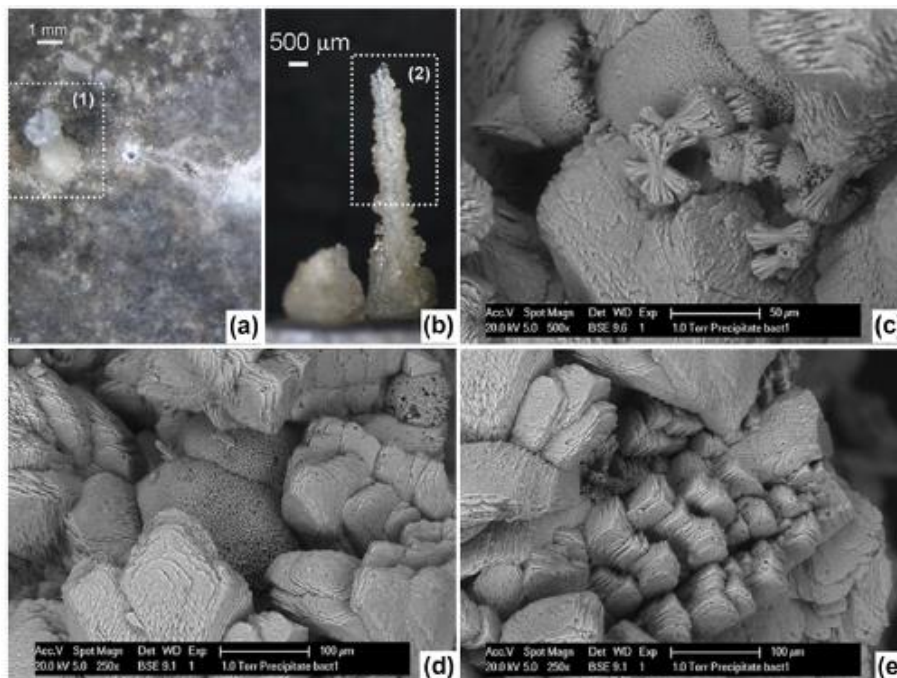
A calcita possui forma cristalina hexagonal enquanto que a aragonita possui forma ortorrômbica (SAMPAIO E ALMEIDA, 2008). Como a calcita é a forma mais estável do CaCO<sub>3</sub> o processo de precipitação de carbonato de cálcio por vias metabólicas bacterianas também pode ser chamado de ineralização de Calcita Biologicamente Induzida (ACHAL *et al.*, 2015), sendo que os artigos que abordam sobre a biocimentação normalmente encontram o carbonato de cálcio na forma de calcita (TIANO *et al.*, 1999; RAMACHANDRAN *et al.*, 2001; BACHMEIER *et al.*, 2002; DE MUYNCK *et al.*, 2008; JONKERS E SCHLANGEN, 2008; CHUNXIANG *et al.*, 2009; OKWADHA e LI, 2010; WIKTOR e JONKERS, 2011; ACHAL *et al.*, 2011; CHAHAL *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2012; ABO-EL-ENEIN *et al.*, 2013; PEI *et al.*, 2013; SCHLANGEN e SANGADJI, 2013; ACHAL *et al.*, 2013; CHAHAL e SIDDIQUE, 2013; XU e YAO, 2014; LUO *et al.*, 2015; KRISHNAPRIYA *et al.*, 2015) em poucos casos encontram varita (DE MUYNCK *et al.*, 2008; CHUNXIANG *et al.*, 2009; OKWADHA e LI, 2010; XU e YAO, 2014) e aragonita (WIKTOR e JONKERS, 2011).

Wiktor e Jonkers (2011) observaram diferentes morfologias cristalinas a partir de Microscópio Eletrônico de Varredura que diferem morfologicamente da calcita, as quais estão apresentadas na Figura 4.

---

<sup>5</sup> Material capaz de perder a estabilidade através de pequenas perturbações.

**Figura 4 –** Imagens microscópicas do fechamento das fissuras de amostras com adição de bactérias. (a) Visão geral da fissura com detalhe específico indicado por um quadrado pontilhado, visto de cima. (b) Imagem do precipitado e (c-e) imagens da parte superior do precipitado.

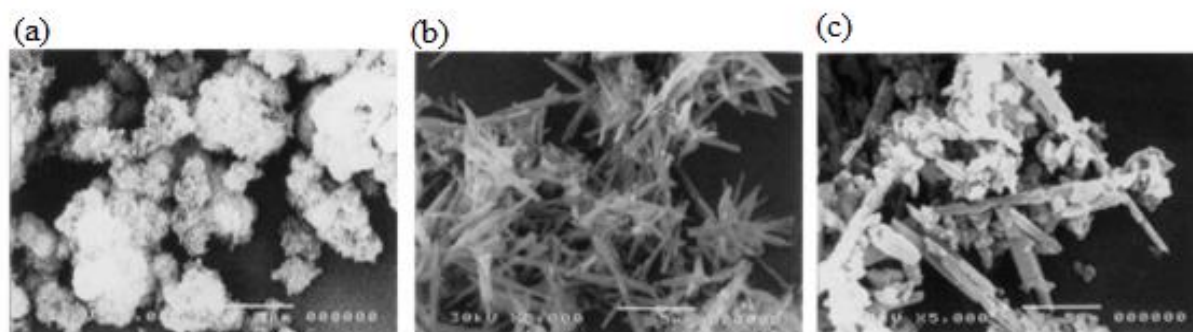


Fonte: Wiktor e Jonkers (2011)

Estes autores observaram duas morfologias principais: romboédrica lamelar deformada e aglomerados do tipo agulha montados em formas de halteres, possivelmente polimorfos de  $\text{CaCO}_3$ , pois essas precipitações só foram observadas nas superfícies de fissuras de amostras com bactérias (WIKTOR e JONKERS, 2011).

Além desses autores, Konno *et al.* (2002) verificou diferentes morfologias de  $\text{CaCO}_3$  precipitados em diferentes temperaturas, as quais estão apresentadas na Figura 5.

**Figura 5 –** MEV do  $\text{CaCO}_3$  precipitado obtido a partir de diferentes temperaturas: 25°C (a), 50°C (b) e 75°C (c).



Fonte: Konno *et al.* (2002).

De acordo com os autores, os precipitados a 25°C são de calcita, a 50°C de aragonita e a 75°C foram encontrados tanto cristais de calcita como de aragonita. Mostrando que a aragonita tem cristais mais alongados em forma de agulha, enquanto a calcita se apresenta de forma mais arredondada em grumos.

Quando as bactérias são adicionadas aos materiais cimentícios e precipitam  $\text{CaCO}_3$  o processo também é conhecido como biocimentação. A cimentação é um processo em que o carbonato de cálcio é formado ou é depositado sobre a superfície de um material cimentício. Quando esse processo é promovido biologicamente, pode ser chamado de biocimentação (ACHAL *et al.*, 2015).

### 2.1.2 Bactérias utilizadas para a biocimentação

O grupo de bactérias do gênero *Bacillus* vêm sendo estudado como microrganismos capazes de precipitar  $\text{CaCO}_3$  em materiais cimentícios. Estes estudos apontam para melhorias de durabilidade nestes materiais, como o aumento da resistência à compressão e diminuição da porosidade (PARK *et al.*, 2012).

As bactérias que estão sendo utilizadas para o fim de biocimentação são bactérias alcali-resistentes<sup>6</sup> e em grande parte, bactérias capazes de formar esporos. Segundo Montoya *et al.* (2005), dentre as bactérias precipitadoras de  $\text{CaCO}_3$  pode-se citar a *B. cereus*, *B. pasteurii*, *B. subtilis* e *Mixococcus xanthus*.

Embora a bioprecipitação de carbonato de cálcio em ambientes naturais são relevantes, a fisiologia e a genética envolvidas nesta forma de precipitação ainda são de difícil compreensão. Marvasi *et al.* (2010) optou por utilizar a bactéria *Bacillus subtilis* 168 em seus estudos pela facilidade de encontrar essa bactéria no solo e também devido aos aspectos fisiológicos associados com a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  por meio desta bactéria durante a formação de biofilme, quando cultivada no meio de precipitação B4.

A bactéria *Bacillus subtilis* tem aplicações biotecnológicas promovidas por enzimas que desempenham papéis importantes em diversos processos industriais (MONTROYA *et al.*, 2005). Segundo Barabesi *et al.* (2007) *B. subtilis* é uma bactéria modelo de laboratório que pode ser utilizada na produção de calcita em meios com uma fonte de cálcio.

Esta bactéria se reproduz facilmente e em grande proporção, sendo que no seu crescimento as células são capazes de produzir biofilme (MONTROYA *et al.*, 2005). Segundo Marvasi *et al.* (2013) existem vantagens da utilização de *B. subtilis* em relação às

---

<sup>6</sup> Bactérias resistentes a ambientes alcalinos.

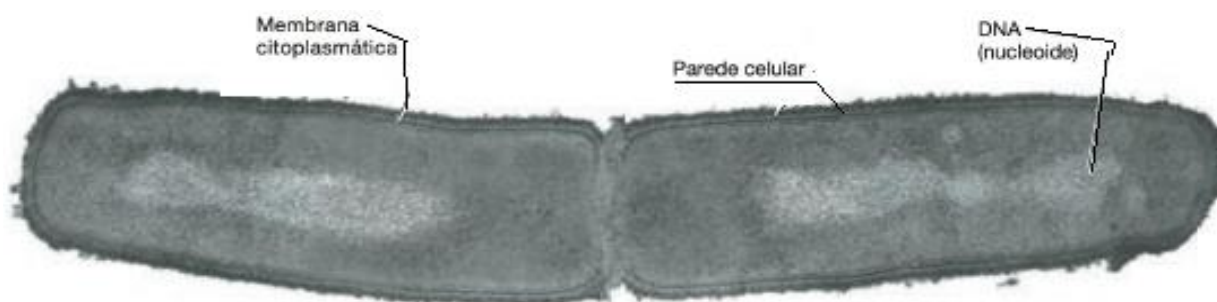
bactérias ureolíticas<sup>7</sup>, pois essa bactéria em meios sem fonte de ureia são capazes de precipitar  $\text{CaCO}_3$  devido a um aumento do pH no meio, causado durante a formação do biofilme.

Cabe ressaltar que haverá a mudança de pH quando as bactérias forem adicionadas aos materiais cimentícios, já que os mesmos são alcalinos, favorecendo a precipitação do  $\text{CaCO}_3$ .

#### 2.1.2.1 Características da bactéria *B. subtilis*

*B. subtilis* são Gram positivas<sup>8</sup>, aeróbias<sup>9</sup> ou anaeróbias facultativas<sup>10</sup> e formadoras de esporos, apresentando estrutura de parede celular comum. O formato da sua célula é de bastonete, conforme representado na Figura 6 (MADIGAN *et al.*, 2010).

**Figura 6 - Micrografia da divisão celular de *B. subtilis*.**



**Fonte:** MADIGAN *et al.* 2010.

A parede celular desta bactéria é composta principalmente de peptidoglicano, que é carregado negativamente, atraindo os íons  $\text{Ca}^{2+}$  no momento da precipitação de  $\text{CaCO}_3$ . Além disso, mesmo as paredes de células mortas de *B. subtilis* são considerados aptas para a precipitação de calcita pela atração de cálcio (FRIIS *et al.*, 2003).

Essa bactéria, ao se encontrar em situações precárias de falta de água e nutrientes produz esporos, que são uma estratégia de sobrevivência, pois elas ficam extremamente resistentes (OLIVEIRA, 2008). Segundo Ramachandran *et al.* (2001) os estudos destes esporos se tornaram significantes no contexto de adições nos materiais cimentícios, já que estes materiais são altamente alcalinos e não possuem os nutrientes necessários para a bactéria sobreviver.

<sup>7</sup> Bactérias produtoras da enzima urease.

<sup>8</sup> Bactérias Gram positivas possuem maior afinidade pelo cristal violeta do que bactérias Gram negativas, durante o teste de coloração Gram.

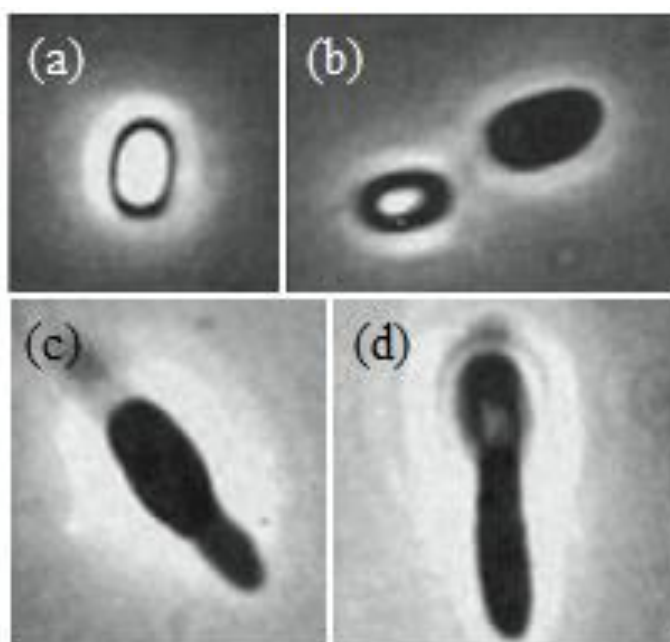
<sup>9</sup> Bactérias que precisam do oxigênio para respiração celular.

<sup>10</sup> Bactérias anaeróbicas facultativas utilizam oxigênio em seu metabolismo energético, mas também podem crescer na ausência de oxigênio.

O processo de esporulação da bactéria *B. subtilis* dura em média 8 horas e se desenvolve em três etapas: ativação, germinação e extrusão. A ativação ocorre em condições adversas de sobrevivência da bactéria e quando esse esporo entra em contato com alimento ou condições que favorecem seu crescimento, ocorre a germinação. A extrusão, por sua vez, se dá quando a célula emerge a partir do esporo rompido e inicia seu crescimento (MADIGAN *et al.*, 2010).

A Figura 7 ilustra a germinação de um esporo de bactéria do gênero *Bacillus*, onde na Figura 7 (a) apresenta a fotomicrografia de um esporo maduro, altamente refringente<sup>11</sup>. Já na Figura 7 (b) pode-se visualizar a ativação do esporo e por fim na Figura 7 (c e d) o esporo está emergindo, ou seja, está ocorrendo o processo de extrusão que dará a célula características normais novamente (MADIGAN *et al.*, 2010).

**Figura 7 - Germinação de um esporo do gênero *Bacillus***



**Fonte:** Adaptado de MADIGAN *et al.* 2010.

No caso dos materiais cimentícios, quando os esporos são adicionados aos mesmos, estão na forma de esporo maduro, conforme apresentado na Figura 7 (a). Quando for aberta uma fissura ou houver porosidade, a água entrará nesses poros e poderá ativar o esporo, fazendo com que ele germine, processo apresentado na Figura 7 (b, c e d).

<sup>11</sup> Materiais refringentes são aqueles que tem capacidade de desviar a direção dos raios luminosos, como pode-se ver na Figura 7 a e b.

Cabe salientar que os esporos são estruturas extremamente resistentes a agressões externas e elevadas temperaturas, podendo permanecer intactos por milhões de anos e a esporulação não é inibido pela falta de oxigênio (GOMES, 2013). Por esse motivo, o processo de esporulação não é afetado quando as bactérias estão inseridas nos materiais cimentícios.

Segundo Jonkers *et al.* (2010) o sucesso do uso de bactérias utilizadas para o fechamento de poros nos materiais cimentícios está diretamente relacionada com sua capacidade de formar esporos. Segundo Van Tittelboom *et al.* (2010), o pH do concreto é altamente alcalino, não possui nutrientes e há oxigênio apenas em seus poros abertos e na sua superfície, tendendo a restringir o crescimento bacteriano.

Em adição, Perito *et al.* (2014) comprovou que a capacidade de precipitação de  $\text{CaCO}_3$  por ação bacteriana não está relacionada com a absorção de cátions nas células apenas durante o crescimento, ou seja, células mortas ou esporos dormentes em determinadas concentrações também podem agir como local de nucleação dos cristais e promover a precipitação. Portanto, se torna necessário o estudo das concentrações de bactéria a serem adicionadas aos materiais cimentícios, pois estas também influenciam nas propriedades destes materiais.

#### 2.1.2.2 Concentração de bactéria para a biocimentação

As bactérias podem ser adicionadas aos materiais cimentícios em diferentes concentrações, as quais podem interferir em algumas propriedades, principalmente no estado endurecido. Sendo assim, as concentrações já estudadas por outros pesquisadores estão representadas no Quadro 1, juntamente com os ensaios que foram realizados, por ordem cronológica de publicação.

Quadro 1 - Concentrações da adição de bactérias utilizadas em pesquisas internacionais

BACTÉRIA UTILIZADA	CONCENTRAÇÕES ADICIONADAS	ENSAIOS REALIZADOS	REFERÊNCIA
<i>B. pasteurii</i>	3,0x10 <sup>7</sup> ; 6,0 x10 <sup>7</sup> e 1,8x10 <sup>8</sup> esporos/mL	Resistência à compressão em argamassas fissuradas e não fissuradas e MEV	RAMACHANDRAN <i>et al.</i> , 2001
<i>Shewanella</i>	10, 10 <sup>2</sup> ,10 <sup>3</sup> , 10 <sup>4</sup> , 10 <sup>5</sup> ,10 <sup>6</sup> , 10 <sup>7</sup> células/mL	Resistência à compressão e MEV	GHOSH <i>et al.</i> , 2009
<i>B. sphaericus</i>	10 <sup>7</sup> esporos/mL	Absorção de água, Permeabilidade a gás, resistência ao congelamento e descongelamento, carbonatação e MEV	DE MUYNCK <i>et al.</i> , 2008
Esporos de <i>B. pseudofirmus</i> e de <i>B. cohnii</i>	10 <sup>8</sup> a 10 <sup>9</sup> esporos/mL	Resistência à compressão e porosimetria por intrusão de mercúrio	JONKERS <i>et al.</i> , 2010
<i>B. subtilis</i> JC3	10 <sup>4</sup> , 10 <sup>5</sup> ,10 <sup>6</sup> e 10 <sup>7</sup> células/mL	Resistência à compressão, resistência à tração, MEV e ataque ácido	REDDY <i>et al.</i> , 2010
<i>B. pasteurii</i>	10 <sup>3</sup> , 10 <sup>5</sup> e 10 <sup>7</sup> células/mL	Resistência à compressão, absorção de água, permeabilidade rápida à cloretos e MEV	CHAHAL <i>et al.</i> , 2012
<i>B. subtilis</i>	1,36x10 <sup>8</sup> células/mL	Permeabilidade, fechamento de fissuras, resistência à compressão, EDX e MEV	PARK <i>et al.</i> , 2012
<i>Bacillus</i> ssp	5x10 <sup>6</sup> , 5x10 <sup>7</sup> e 5x10 <sup>8</sup> células/mL	Porosidade, permeabilidade rápida à cloretos, fechamento de fissuras e MEV	ACHAL <i>et al.</i> , 2013
<i>B. pasteurii</i>	10 <sup>3</sup> , 10 <sup>5</sup> e 10 <sup>7</sup> células/mL	Resistência à compressão, permeabilidade, absorção de água, permeabilidade rápida à cloretos, EDX e MEV	CHAHAL e SIDDIQUE, 2013
<i>B. megaterium</i> , <i>B. flexus</i> e <i>B. licheniformis</i>	10 <sup>5</sup> células/mL	Resistência à compressão, fechamento de fissuras e MEV	KRISHNAPRIYA <i>et al.</i> , 2015

Fonte: O próprio autor.

A maioria dos estudos apresentados no Quadro 1 não observaram uma relação entre as características dos materiais cimentícios analisadas com a variação da concentração bacteriana. Os artigos que apresentaram este estudo foram os publicados por Ramachandran *et al.* (2001), Ghosh *et al.* (2005), Reddy *et al.* (2010) Chahal *et al.* (2012) e Chahal e Siddique (2013).

Ramachandran *et al.* (2001) utilizou três concentrações de bactéria, de 3,0x10<sup>7</sup>; 6,0 x10<sup>7</sup> e 1,8x10<sup>8</sup> esporos/mL e observou que a resistência à compressão diminuiu conforme a concentração de bactéria aumentava, nas concentrações citadas.

Já Ghosh *et al.* (2005) utilizou as concentrações de 10, 10<sup>2</sup>,10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>,10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> células/mL da bactéria *Shewanella* e obteve um aumento de resistência à compressão de até 25% e a maior redução da porosidade aos 28 dias, com a adição da concentração de 10<sup>5</sup> células/mL e não observou a mesma tendência averiguada por Ramachandran *et al.* (2001).

Reddy *et al.* (2010) adicionou a bactéria *B. subtilis* JC3 na água de amassamento de um concreto na concentração de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/mL e observou melhores desempenhos mecânicos na concentração de  $10^5$  células/mL.

O mesmo resultado foi encontrado por Chahal *et al.* (2012) e Chahal e Siddique (2013). Estas duas pesquisas avaliaram as concentrações de  $10^3$ ,  $10^5$  e  $10^7$  células/mL mostraram melhores resultados de resistência à compressão, absorção de água e permeabilidade rápida de cloretos, com a concentração de  $10^5$  células/mL. Porém, essas propriedades também podem variar de acordo com a forma de adição das bactérias nos materiais cimentícios, ou seja, a concentração bacteriana adicionada não é o único fator que pode influenciar nas propriedades dos materiais.

### 2.1.2.3 Formas de adição das bactérias nos materiais cimentícios

As concentrações descritas no item anterior são adicionadas aos materiais cimentícios de duas formas: na água de amassamento no momento da mistura ou por imersão dos corpos de prova em soluções contendo as bactérias, após a desmoldagem dos mesmos.

Quando as bactérias são adicionadas aos materiais cimentícios e promovem o fechamento dos poros através da bioprecipitação, são consideradas como uma forma de autocicatrização (JONKERS, 2007; JONKERS *et al.*, 2009; JONKERS *et al.*, 2010).

No Quadro 2 estão apresentadas as pesquisas já publicadas referente ao uso de bactérias na biocimentação, mostrando a bactéria utilizada no estudo, se a bactéria produz ou não a enzima urease, a forma de adição desta bactéria aos materiais cimentícios, como os corpos de prova foram curados e o autor da publicação, por ordem cronológica. Cabe lembrar que a urease é uma enzima produzida por algumas bactérias, que é capaz de hidrolisar a ureia e precipitar  $\text{CaCO}_3$ . Caso as bactérias não produzam esta enzima, a precipitação do carbonato de cálcio se dá normalmente pela mudança de pH.

**Quadro 2 – Forma de adição da bactéria e cura dos corpos de prova**

BACTÉRIA UTILIZADA	BACTÉRIA UREOLÍTICA	FORMA DE ADIÇÃO DA BACTÉRIA	FORMA DE CURA	REFERÊNCIA
<i>B. pasteurii</i>	Sim	Na água de amassamento	Imerso em 3 L de Ureia-CaCl <sub>2</sub> com 2g de cal	RAMACHANDRAN <i>et al.</i> , 2001
<i>B. sphaericus</i>	Sim	Imersão dos corpos de prova durante 24h no meio de cultura com a bactéria crescida um dia	Imersa em água	DE MUYNCK <i>et al.</i> , 2008 <sup>(1)</sup>
<i>B. sphaericus</i>	Sim	Imersão dos corpos de prova em meio de cultura de bactéria crescida durante 1 dia	Imersos em várias soluções durante 6 dias	DE MUYNCK <i>et al.</i> , 2008 <sup>(2)</sup>
<i>B. sphaericus</i>	Sim	Imersão dos corpos de prova na solução de cura	Solução equimolar de ureia-cálcio	VAN TITTELBOOM <i>et al.</i> , 2010
<i>B. alkalinitrilicus</i>	*	Na água de amassamento	Imersa em água	WIKTOR e JONKERS, 2011
<i>B. pasteurii</i>	Sim	Na água de amassamento	Imerso em 20g/l de ureia e 25mM de CaCl <sub>2</sub>	ABO-EL-ENIEN <i>et al.</i> , 2013
<i>B. subtilis</i> 168	Sim	Na água de amassamento com solução de ureia-CaCl <sub>2</sub>	Imerso em água	PEI <i>et al.</i> , 2013
<i>B. cohnii</i>	Não	Na água de amassamento com lactato de cálcio ou glutamato de cálcio	Imerso em água	XU e YAO, 2014
<i>B. megaterium</i> , <i>B. flexus</i> e <i>B. licheniformis</i>	Sim	Na água de amassamento	Imerso em água	KRISHNAPRIYA <i>et al.</i> , 2015
<i>B. pasteurii</i>	Sim	Na água de amassamento	Em câmara úmida	AL-SALLOUM <i>et al.</i> , (2016)

\* Bactéria é variável na produção de urease e o artigo não apresentou se a bactéria utilizada era produtora ou da enzima;

**Fonte:** O próprio autor.

Conforme retratado no Quadro 2, a maioria dos estudos vem utilizando bactérias ureolíticas. Porém, na precipitação de CaCO<sub>3</sub> a partir da hidrólise da ureia, para cada íon carbonato liberado, são produzidos dois íons de amônio, podendo acelerar a degradação dos materiais cimentícios (JONKERS *et al.*, 2010).

Afim de se buscar uma solução que não resulte em um subproduto prejudicial à superfície dos materiais cimentícios, a bioprecipitação vem sendo estudada por diferentes mecanismos. Segundo Braissant *et al.* (2003) a bactéria *B. subtilis* está sendo pesquisada na precipitação de CaCO<sub>3</sub> a partir da mudança de pH ocasionado na produção de biofilme. Porém, a maioria dos estudos que tratam desta precipitação são *in vitro*, com foco no processo microbiológico e ainda são pouco aplicados aos materiais cimentícios.

As pesquisas realizadas que estudaram a bioprecipitação *in vitro* com o uso da bactéria *B. subtilis* no meio de precipitação B4 estão apresentadas no Quadro 3, onde estão representados os compostos do meio de precipitação utilizado, a temperatura em que as amostras foram submetidas, o tempo que as mesmas foram armazenadas em estufa até a análise dos cristais e como se sucedeu esta análise.

**Quadro 3 - Meios de precipitação de CaCO<sub>3</sub> com a bactéria *B. subtilis***

MEIO DE PRECIPITAÇÃO DE CaCO <sub>3</sub>	TEMPERATURA; TEMPO PARA ANÁLISE	FORMA DE ANÁLISE DOS CRISTAIS	REFERÊNCIA
B4, composto por 0,4% de extrato de levedura, 0,5% de dextrose, 0,25% de acetato de cálcio	28 E 37°C; 15 dias	Os cristais foram coletados por ebulição e filtrados em Millipore 0,45 µm	TIANO <i>et al.</i> , 1999
B4, composto por 0,4% de extrato de levedura, 0,25% de acetato de cálcio e 15g/l de ágar	26 °C; 20 dias	Os cristais foram preparados para análise em MEV e EDX	BRAISSANT <i>et al.</i> , 2003
B4, composto por 0,4% de extrato de levedura, 0,5% de dextrose, 0,25% de acetato de cálcio e 1,5% de ágar	34 °C; 15 dias	Os cristais foram raspados das placas e re-suspensos em água destilada, a qual foi a ebulição e então filtrados em Millipore 0,45 µm	MONTOYA <i>et al.</i> , 2005
B4, composto por 0,4% de extrato de levedura, 0,5% de dextrose, 0,25% de acetato de cálcio e 1,5% de ágar	37 °C; 21 dias	Os cristais foram coletados por ebulição, filtrados em millipore 0,45 µm, os filtros foram secados em estufa a 60°C e analisados por EDX	BARABESI <i>et al.</i> , 2007
B4, composto por 0,4% de extrato de levedura, 0,5% de glicose e 1,5% de acetato de cálcio	30 °C; 5 dias	Os cristais precipitados foram analisados por microscópio de luz e de imagens	PARK <i>et al.</i> , 2012
B4 com 0,4% de extrato de levedura, 12,5 mL de glicose a 40% e 25 mL de acetato de cálcio a 10%	26 °C; 21 dias	Os cristais precipitados foram analisados por microscópio de luz	MARVASI <i>et al.</i> , 2013

**Fonte:** O próprio autor.

Os constituintes do meio de cultivo B4 variam entre os autores, porém o artigo apresentado por Marvasi *et al.* (2013) descreve detalhadamente o procedimento necessário para o preparo e a mistura do meio.

Com relação à metodologia de quantificação dos cristais, os estudos apresentados na literatura realizam essa quantificação a partir de filtros *millipore* com poros que permitam que as células bacterianas passem pelo filtro e apenas os cristais fiquem retidos. Quando as amostras são filtradas, pode-se também fazer a quantificação do CaCO<sub>3</sub> precipitado, a partir da Equação 1 (KRISHNAPRIYA *et al.*, 2015):

$$M_{CaCO_3} = M_{F+Material} - M_F$$

Equação 1

Onde:

- $M_{CaCO_3}$ : Massa de CaCO<sub>3</sub> precipitado, em gramas;

- $M_{F+Material}$ : Massa do filtro mais o material filtrado, em gramas;
- $M_F$ : Massa do filtro antes do ensaio, em gramas;

A partir dos resultados de quantificação *in vitro* e das análises das possíveis aplicações do  $CaCO_3$  como agente cimentante nos materiais cimentícios, observou-se a necessidade de avaliar a influência da biocimentação nas propriedades mecânicas e microestruturais desses materiais (ABO-EL-ENEIN *et al.*, 2013; PEI *et al.*, 2013; DE MUYNCK *et al.*, 2008; CHAHAL *et al.*, 2012; CHAHAL e SIDDIQUE, 2013).

## 2.2 A INFLUÊNCIA DA BIOCIMENTAÇÃO NAS PROPRIEDADES DOS MATERIAIS CIMENTÍCIOS

Segundo Mehta e Monteiro (2014) existem diversas características que influenciam nas propriedades dos materiais cimentícios, o estudo destas propriedades são de fundamental importância para que estes atinjam o desempenho requerido nas condições necessárias.

Neste sentido, torna-se necessário um conhecimento de quais propriedades podem ser influenciadas pela adição das bactérias aos materiais cimentícios e como essas propriedades se comportam mediante a forma de adição destes microrganismos e suas concentrações. Na sequência estão descritas essas propriedades e como foi o comportamento das mesmas mediante a adição de bactérias.

### 2.2.1 Resistência à compressão

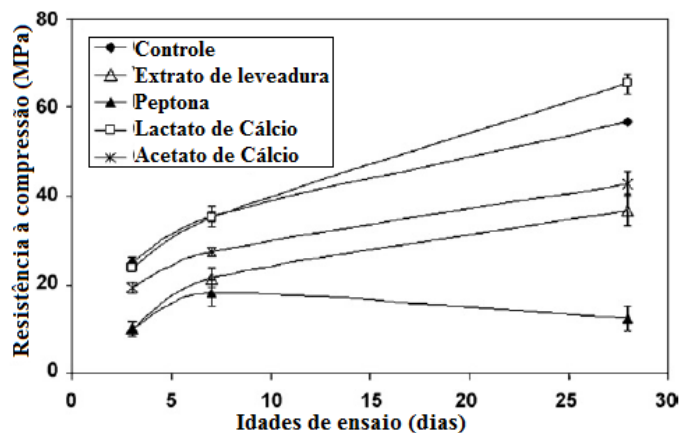
A resistência de um material se refere à capacidade que o mesmo tem para resistir a tensões sem romper, sendo definida como a tensão máxima que o material pode suportar. Esta propriedade é uma das mais importantes para os projetistas e engenheiros de controle de qualidade, pois existem várias propriedades que podem ser deduzidas a partir da resistência (MEHTA e MONTEIRO, 2014).

A resistência à compressão é uma das propriedades dos materiais cimentícios que é influenciada pela adição de bactérias, pois de acordo com estudos realizados por Jonkers *et al.* (2010), a adição de esporos de *B. pseudofirmus* na concentração de  $6 \times 10^8$  esporos/mL diminuiu em menos de 10% a resistência à compressão do concreto nas idades de 3, 7 e 28 dias.

Este mesmo autor analisou a interferência da adição de meios de cultivo à mistura, com a mesma bactéria e na mesma concentração. Para tanto, ensaiou as amostras com

adição de extrato de levedura, peptona, acetato de cálcio e lactato de cálcio, com proporção de 1% da massa de cimento. Os resultados obtidos para a resistência à compressão estão apresentados no Gráfico 1, onde as barras representam os desvios padrão.

**Gráfico 1 – Influência dos meios de cultivo nos materiais cimentícios**

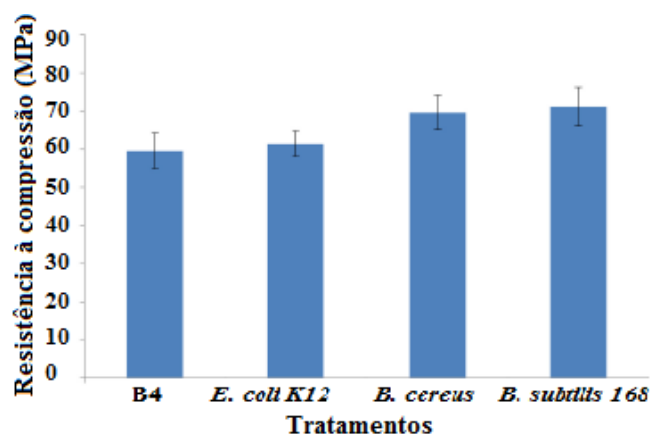


Fonte: Jonkers *et al.* (2010)

Pode-se observar que houve um aumento na resistência à compressão nos corpos de prova com adição de lactato de cálcio, enquanto nos demais houve uma redução da resistência em relação à referência. Porém, estes compostos adicionados por Jonkers *et al.* (2010) são materiais orgânicos e podem ser prejudiciais aos materiais cimentícios.

Outro meio de cultivo que vem sendo muito estudado na área da biocimentação é o meio B4, já descrito no Quadro 3. Park *et al.* (2012) estudou a resistência à compressão em argamassas com submersão dos corpos de prova no meio B4, testando três bactérias diferentes: *E. coli* K12, *B. cereus* KCTC3624 e *B. subtilis* 168, na concentração de  $6,3 \times 10^7$  células/mL. Os resultados obtidos podem ser visualizados no Gráfico 2.

**Gráfico 2 – Resistência à compressão de argamassas com adição de bactérias e do meio B4**

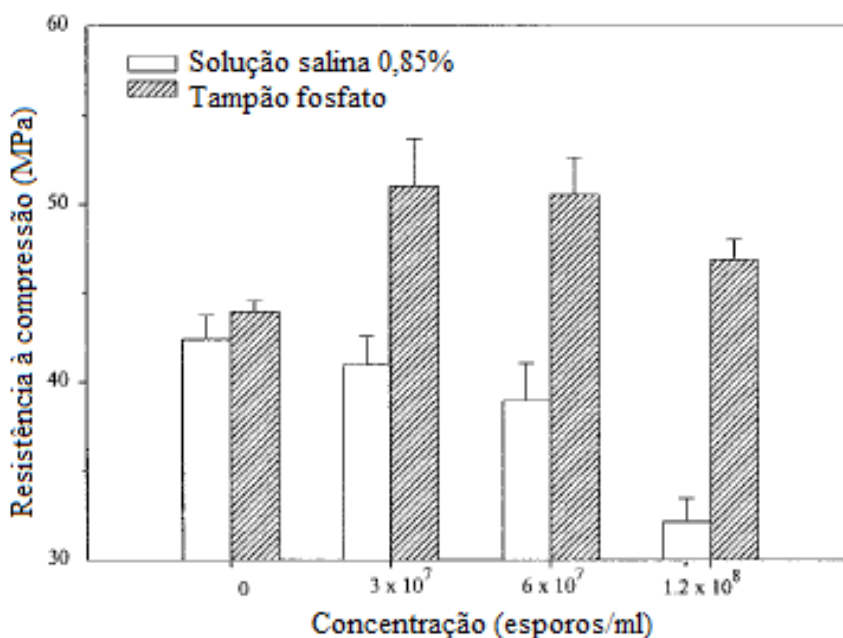


Fonte: Park *et al.* (2012).

Com os resultados obtidos por Park *et al.* (2012), observa-se que houve um aumento da resistência à compressão em todas as argamassas que entraram em contato com as bactérias, sendo que os aumentos mais significativos foram obtidos a partir da imersão em meio B4 contendo as bactérias *B. cereus* e *B. subtilis* 168.

Porém, os meios de cultivo contém matéria orgânica e podem com o tempo degradar os materiais cimentícios. Neste pensamento, Ramachandran *et al.* (2001) estudou a adição de *B. pasteurii* em diversas concentrações e suspensos em duas diferentes soluções, salina a 0,85% e tampão fosfato. Estas soluções teriam o intuito apenas de manter o meio isotônico para a bactéria, para que a célula não se rompesse quando adicionada aos materiais cimentícios.

**Gráfico 3 – Influência do meio de adição da bactéria na resistência à compressão**



Fonte: Ramachandran *et al.* (2001)

Pode-se observar com os resultados obtidos por Ramachandran *et al.* (2001), que a adição das bactérias suspensas em tampão fosfato obtiveram um resultado superior quanto a resistência à compressão para todas as concentrações de bactéria adicionada.

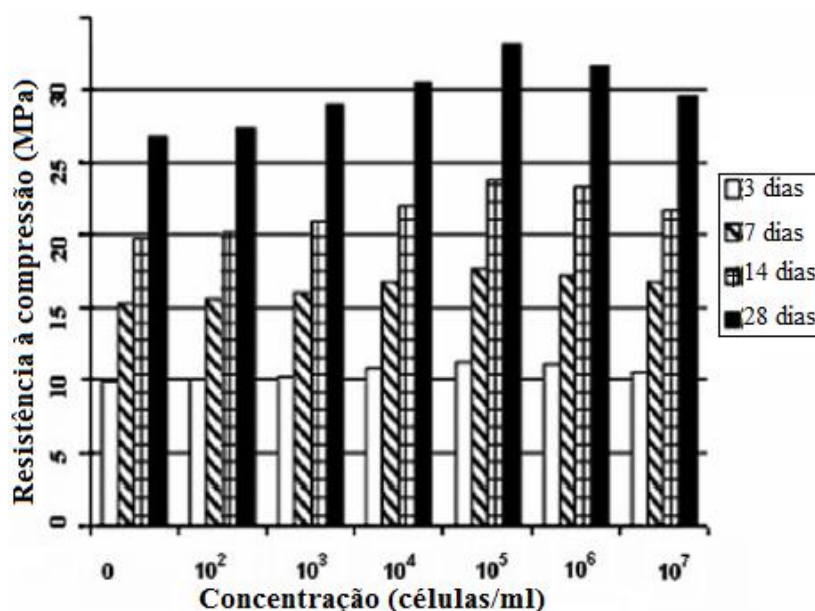
Verificou-se ainda que a adição de bactéria com tampão fosfato apresentou maior resistência à compressão em todos os corpos de prova, enquanto a adição em solução salina teve resistências menores com adição de bactéria, quando comparada a referência. Além disso, pode-se constatar que a maior resistência encontrada para os corpos de prova com adição de bactéria, foi na concentração de  $3,0 \times 10^7$  esporos/mL, tanto para a adição com tampão fosfato,

quanto com solução salina. Quando as concentrações foram aumentando, a resistência à compressão foi diminuindo, mostrando que é necessário um estudo aprofundado para avaliar qual a concentração de bactéria ideal para que se tenha ganhos nas propriedades mecânicas.

Para tanto, buscou-se outros estudos que avaliassem as propriedades mecânicas em função da variação da concentração de bactéria adicionada aos materiais cimentícios.

Ghosh *et al.* (2009) realizou estudos com a adição da bactéria *Shewanella* na água de amassamento das argamassas nas concentrações de 0,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/mL, os resultados obtidos estão apresentados no Gráfico 4, com dados de 3, 7, 14 e 28 dias.

**Gráfico 4 – Variação da resistência à compressão em função da variação da concentração de bactérias**



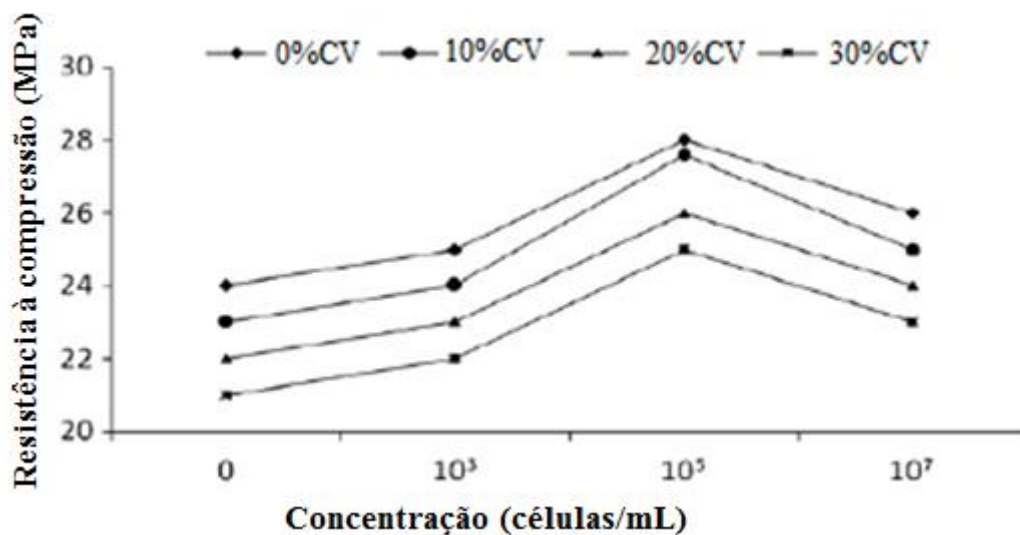
Fonte: Ghosh *et al.* (2009)

Com os resultados obtidos por Ghosh *et al.* (2009) pode-se observar que houve um aumento na resistência à compressão gradativamente até a concentração de  $10^5$  células/mL, após essa concentração, a resistência à compressão tornou a diminuir, em todas as idades analisadas.

Chahal *et al.* (2012) e Chahal e Siddique (2013) desenvolveram experimentos que corroboram com os resultados obtidos por Ghosh *et al.* (2009). Estes autores utilizaram as concentrações de *B. pasteurii* de 0,  $10^3$ ,  $10^5$  e  $10^7$  células/mL, na água de amassamento de concretos com diferentes porcentagens de cinza volante (CV) e sílica ativa (SA). Os resultados

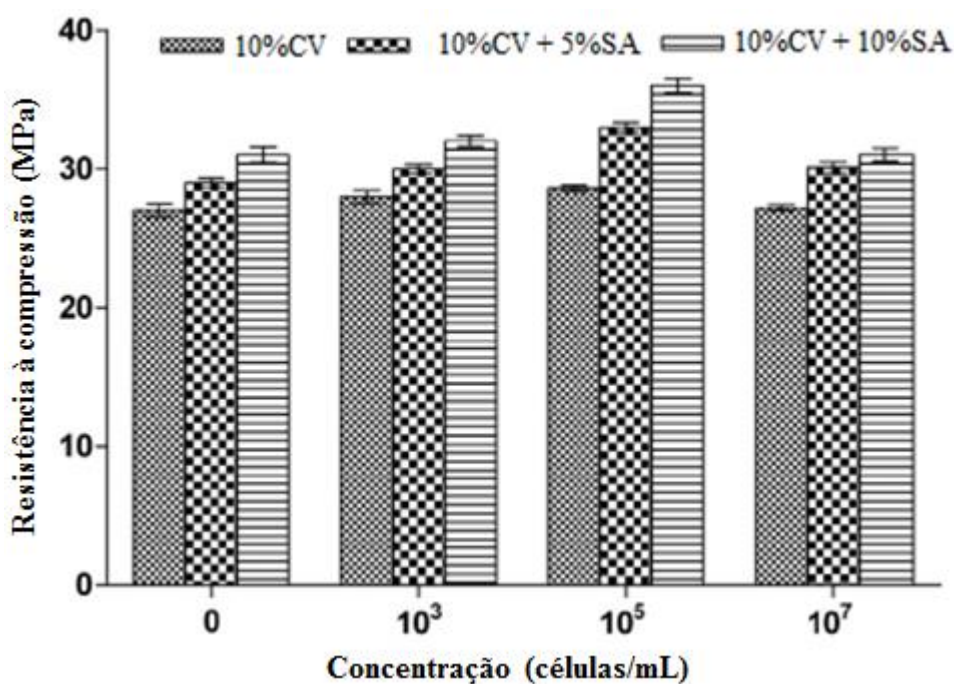
obtidos por estes autores, estão representados nos Gráficos 5 e 6, mostrando que mesmo com a substituição de parte do cimento por cinza volante e sílica ativa, a concentração de  $10^5$  células/mL foi a que apresentou os melhores resultados quanto à resistência à compressão.

**Gráfico 5 – Variação da resistência à compressão em relação a porcentagens de substituição de cinzas volantes (CV) e adição de concentrações de *B. pasteurii***



Fonte: Chahal *et al.* (2012)

**Gráfico 6 – Variação da resistência à compressão com diferentes porcentagens de substituição de cinza volante (CV) e sílica ativa (SA) mediante a diferentes concentrações de *B. pasteurii***

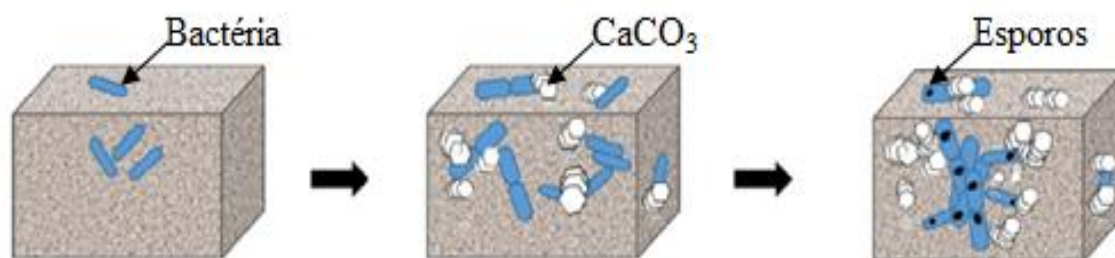


Fonte: Chahal e Siddique (2013)

Em ambos os trabalhos foi verificado que independente das porcentagens de substituições, houve o aumento da resistência à compressão nos corpos de prova com adição de bactéria, em relação à referência. A maior resistência obtida foi com a adição da concentração de  $10^5$  células/mL, para todas as porcentagens de substituição. Mostrando que não há um aumento linear entre o aumento da resistência à compressão e o aumento da concentração de células/mL, pois com a adição de  $10^7$  células/mL a resistência à compressão diminuiu, em relação a  $10^5$  (Chahal *et al.*, 2012; Chahal e Siddique, 2013).

A tendência geral de aumento na resistência à compressão pode ser atribuída ao comportamento das células bacterianas dentro dos corpos de prova dos materiais cimentícios, conforme apresentado na Figura 8. Quando as células são adicionadas na água de amassamento desses materiais, a partir da entrada de umidade em poros e fissuras, as mesmas são capazes de se reproduzir e produzir calcita. Uma vez que a precipitação de calcita fecha os poros e fissuras dos materiais e impede que o oxigênio, nutrientes e a umidade adentre nesse material, as bactérias esporulam e passam a agir como fibras orgânicas dentro dos materiais cimentícios (RAMACHANDRAN *et al.*, 2001; ACHAL *et al.*, 2010).

**Figura 8 - Comportamento de células bacterianas dentro de corpos de prova de argamassa**



Fonte: Adaptado de Achal *et al.* (2010)

Cabe ressaltar que do ponto de vista da resistência à compressão, a relação água/cimento ( $a/c$ ) e a porosidade são sem dúvida os fatores que mais influenciam em seu resultado. Sendo que a relação  $a/c$  determina a porosidade da matriz e quanto maior esta relação, maior será a porosidade e, conseqüentemente, menor a resistência (RICHARD e CHEYREZY, 1995; MEHTA e MONTEIRO, 2014). Para tanto, torna-se necessário o estudo da porosidade dos materiais cimentícios e como essa se comporta mediante a adição de bactérias.

### 2.2.2 Porosidade

A avaliação da porosidade e da estrutura interna dos materiais cimentícios é de fundamental importância para que se possa prever a sua durabilidade, porém essa análise ainda é considerada um desafio para a engenharia, pois os materiais cimentícios apresentam uma grande variabilidade de tamanhos de poros (JR MATTANA e COSTA, 2012). De acordo com Dullien (1979) os poros dos materiais cimentícios são de vários tamanhos e dificilmente um único método de análise engloba a totalidade dos mesmos.

A porosidade em materiais cimentícios pode afetar diversas propriedades, como permeabilidade, durabilidade, dureza, entre outras. Sendo assim, a porosidade de uma pasta cimentícia está diretamente relacionada com a sua resistência à compressão e módulo de elasticidade (BEAUDOIN *et al.*, 1994).

Segundo Dullien (1979), um material poroso pode ser definido com aquele que contém espaços intersticiais não preenchido por matérias sólidas (poros), distribuídos na matriz. A origem dos poros nas pastas de cimento está intimamente ligada à hidratação do cimento e a evaporação da água livre (MEHTA e MONTEIRO, 2014). Segundo Neville e Brooks (2013) o teor de água exigido para a hidratação do cimento gira em torno da relação água/cimento de 0,28. Quando a quantidade de água for maior do que a necessária, o excedente resultará em água livre, que após a evaporação acarretará no aumento do volume de poros capilares.

Segundo Gallucci *et al.* (2007) a porosidade dos materiais cimentícios pode ser classificada de três formas:

- Os chamados “gel-poros” que são resultado da reação do C-S-H. Estes poros possuem apenas alguns nanômetros de tamanho e exercem um pequeno papel nos processos de transporte, podendo afetar a durabilidade e desempenho dos materiais cimentícios.
- Os poros capilares, que são formados nos espaços cheios de água que não foram preenchidos por produtos de hidratação e tem tamanho variando de poucos nanômetros a dezenas de micrômetros;
- E por fim, os vazios de ar que apresentam tamanhos variando de dezenas de micrômetros a milímetros. Estes vazios correspondem a uma pequena fração de toda a porosidade, ficam isolados e praticamente não influenciam nos processos de transporte de água e agentes agressivos.

Com isso, pode-se concluir que a porosidade capilar é a que mais afeta as propriedades dos materiais cimentícios, por apresentar uma rede interligada de poros, facilita o transporte de água e agentes agressivos para o interior dos materiais, acelerando seu processo de degradação e diminuindo sua durabilidade (NEVILLE e BROOKS, 2013)

Como a porosidade está intimamente ligada a durabilidade do material, os dados de porosidade total, assim como, a distribuição dos poros em sua microestrutura permite inferir conclusões sobre o desempenho deste material à longo prazo (BEAUDOIN *et al.*, 1994).

Atualmente há vários métodos para determinar a porosidade, entre eles, há os métodos destrutivos, os quais, geralmente alteram a estrutura do material analisado, e os métodos não destrutivos, àqueles que permitem a integridade do material durante o ensaio. O ensaio normativo que dá um indicativo da porosidade é o ensaio de absorção de água, padronizado pela NBR 9778. Além deste, pode-se citar a microtomografia computadorizada de raios-X, que é um método não destrutivo e a porosimetria por intrusão de mercúrio (PIM), que é um método destrutivo.

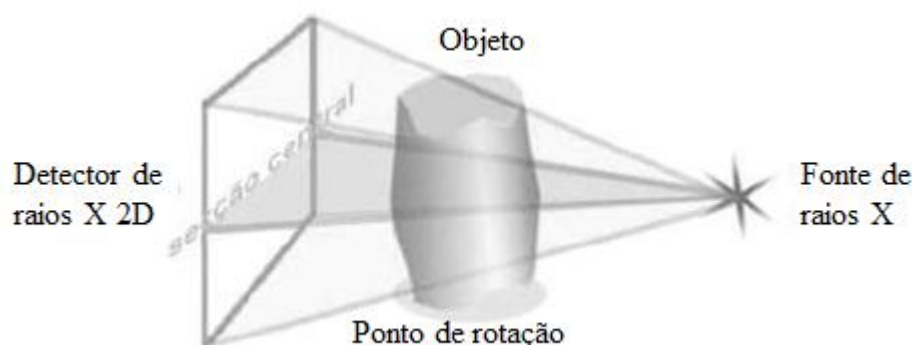
A principal diferença entre estas análises, é que a padronizada pela NBR 9778 e a PIM analisam apenas os poros permeáveis, enquanto na microtomografia é possível quantificar os poros abertos e fechados dos materiais cimentícios. Entretanto, vale ressaltar que a  $\mu$ -CT só quantifica poros acima da resolução espacial utilizada para cada amostra medida, o que pode resultar em valores diferentes de porosidade, quando comparada aos demais métodos.

#### 2.2.2.1 Microtomografia computadorizada de raios-X

A microtomografia computadorizada ( $\mu$ -CT) de raios-X é um método não destrutivo de análise da porosidade dos materiais, além de fornecer informações e imagens da estrutura interna do objeto analisado. Seu funcionamento baseia-se na propriedades que os materiais têm de absorverem a radiação de maneira diferenciada dependendo da sua densidade e composição química. A técnica divide o objeto em fatias que são apresentadas em formas de imagens bidimensionais, obtendo por meio de algoritmos computacionais, imagens em 3D (JR MATTANA, 2010).

A Figura 9 representa o funcionamento interno do microtomógrafo, no qual, o objeto fica posicionado entre a fonte de raios-X e o detector. A amostra sofrerá rotações precisas de alguns décimos de graus, até completar 360 graus, e a cada rotação o detector obterá as projeções das fatias (MAURÍCIO *et al.*, 2012).

**Figura 9 - Esquematização do funcionamento do microtomógrafo.**



**Fonte:** adaptado de MAURÍCIO *et al.* (2012)

A partir destas projeções, é definido para cada pixel um valor de uma escala de cinza, proporcional aos coeficientes de absorção, sendo que quanto mais denso mais escura será sua imagem (LIMA *et al.*, 2007). A partir disso, é possível visualizar os poros de cada projeção do material e através de processos matemáticos, calcular a porosidade.

Os meios convencionais de determinação da porosidade, como por intrusão de mercúrio, de gases e métodos teóricos, apesar de sua importância, não conseguem caracterizar a estrutura interna do material além de, alguns destes serem métodos de análises destrutivos (JR MATTANA e COSTA, 2011).

Nem sempre métodos diferentes de determinação da porosidade dos materiais cimentícios resultam em valores semelhantes. Isso porque os métodos de ensaios tradicionais para a determinação desse índice geralmente alteram a estrutura da pasta de cimento, principalmente quando envolvem adição ou remoção de líquido (NEVILLE e BROOKS, 2013).

A automação de métodos que determinam a porosidade de materiais é objetivo de trabalhos que vêm sendo produzidos ao longo do tempo. Alguns desses métodos utilizam imagens de alta qualidade que são trabalhadas através de técnicas e programas de processamento de imagens digitais.

Estudos com relação a análise da diminuição da porosidade por biocimentação promovida por bactérias por ensaio de microtomografia de raios X ainda são escassos. Sendo que é mais usual a verificação desta diminuição a partir de ensaios de absorção de água e intrusão de mercúrio.

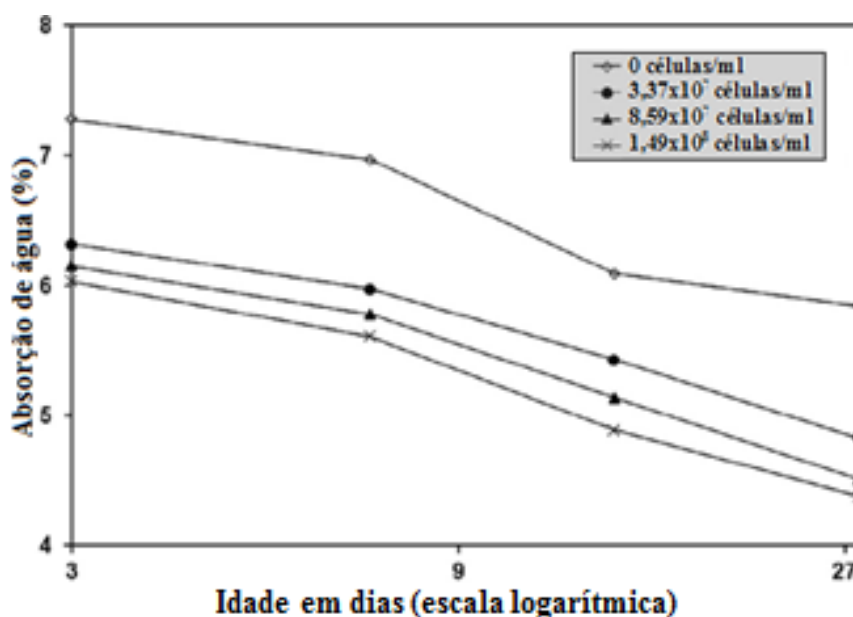
### 2.2.2.2 Absorção de água

Segundo Mehta e Monteiro (2014) a água está presente em todos os tipos de deterioração dos materiais cimentícios, como as moléculas de água são muito pequenas, elas conseguem penetrar em cavidades e poros extremamente finos. Além disso, a água é considerada o solvente mais conhecido, pela sua capacidade de dissolver o maior número de substâncias, podendo carregar consigo substâncias orgânicas e sais que acabam causando manifestações patológicas nos materiais cimentícios.

Como já foi abordado, a adição de bactérias de gênero *Bacillus* nos materiais cimentícios resulta em um processo que é denominado de biocimentação, que nada mais é do que a precipitação de cristais de  $\text{CaCO}_3$  por vias metabólicas bacterianas, que acarreta no fechamento de poros e fissuras. Para tanto, torna-se relevante analisar a absorção de água destes materiais, pois se ao longo do período de cura houver essa precipitação, haverá a diminuição da absorção de água de corpos de prova com adição de bactérias.

Neste contexto, Abo-El-Enien *et al.* (2013) realizou estudos com adição de concentrações de 0,  $3,37 \times 10^7$ ,  $8,59 \times 10^7$  e  $1,49 \times 10^8$  células de *B. pasteurii* por mL, na água de amassamento. Os corpos de prova foram curados imersos em 20g/l de ureia e 25 molar de  $\text{CaCl}_2$  para análise em idades de 3, 7 e 27 dias. No Gráfico 7 estão apresentados os resultados obtidos nesse estudo.

**Gráfico 7 – Variação da absorção de água em relação a concentração de *B. pasteurii*/mL**

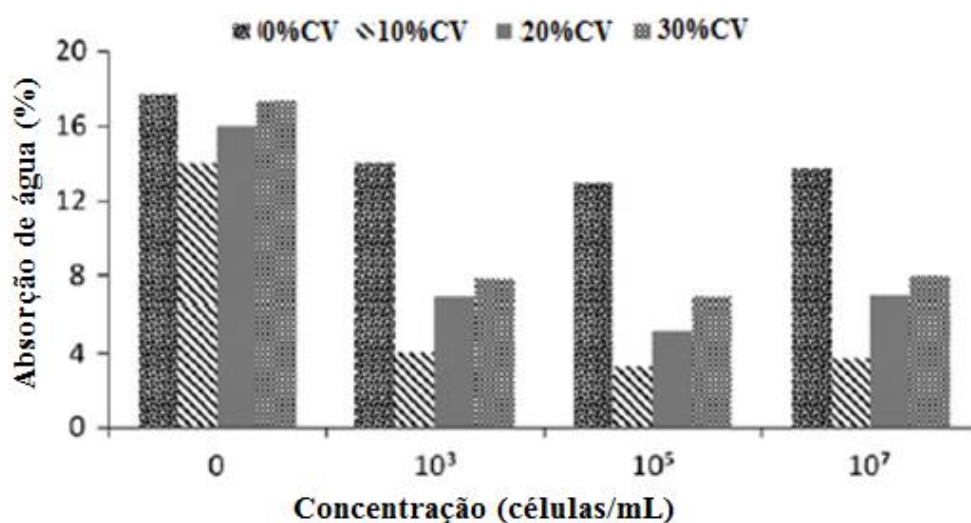


Fonte: Abo-El-Enien *et al.* (2013)

Com estes resultados, verificou-se que para todas as idades analisadas, quanto maior foi a concentração de bactéria adicionada, menor foi a absorção de água (ABO-EL-ENIEN *et al.*, 2013).

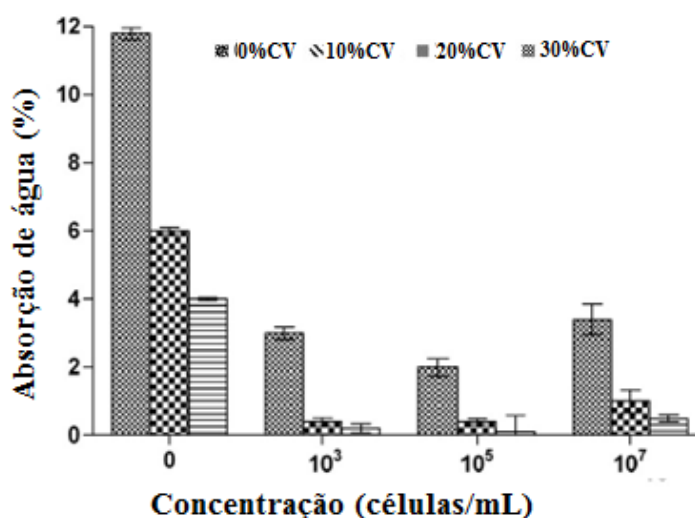
Os resultados apresentados por Chahal *et al.* (2012) e por Chahal e Siddique (2013), podem ser visualizados nos Gráficos 8 e 9, observou-se a mesma tendência dos resultados da resistência à compressão (apresentado em 2.2.1), onde os corpos de prova contendo a concentração de  $10^5$  células/mL resultaram na menor absorção de água.

**Gráfico 8 – Variação da absorção de água em função da concentração de bactérias adicionadas em concreto com adição de diferentes substituições de Cinza Volante (CV)**



Fonte: Chahal *et al.* (2012)

**Gráfico 9 – Variação da absorção de água em relação à concentração de bactéria adicionada em concreto com adição de diferentes substituições de Cinza Volante (CV) e Sílica Ativa (SA)**



Fonte: Chahal e Siddique (2013)

Da mesma forma que foi observado pelos autores na resistência à compressão, independente das porcentagens de substituições efetuadas, a absorção de água diminui até a concentração de  $10^5$  células/mL e a partir do aumento da concentração após  $10^5$ , a absorção de água torna a aumentar, apontando a concentração de  $10^5$  como a ideal a ser utilizada.

Porém o ensaio de absorção de água não tem capacidade de fornecer o tamanho dos poros existentes, nem a porcentagem de poros que há em cada tamanho, diferente da microtomografia computadorizada de raios X e da porosimetria por intrusão de mercúrio.

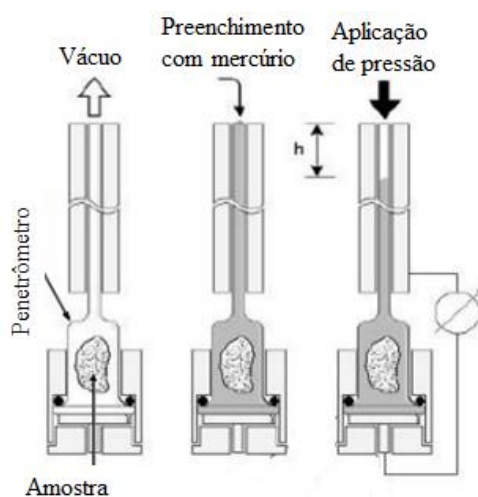
### 2.2.2.3 Porosimetria por intrusão de mercúrio (PIM)

A Porosimetria por Intrusão de Mercúrio tem sido uma técnica experimental utilizada para caracterizar aspectos morfológicos de materiais porosos. A PIM foi originalmente desenvolvida para determinar a distribuição do tamanho de poros na faixa dos macroporos (GREGG & SING, 1982). De acordo com Moravia *et al.* (2006), essa técnica é adequada para avaliar poros com diâmetros entre  $0,04 \mu\text{m}$  e  $300 \mu\text{m}$ .

A PIM se baseia no fato de que o mercúrio se comporta como um fluido não molhante e por consequência, não penetra espontaneamente em poros abertos ou fissuras dos materiais analisados, ao menos que se aplique uma pressão sobre ele (SCHMITT, 2009).

A amostra é ensaiada em um equipamento dotado de um penetrômetro, conforme representado na Figura 10. Sobre a amostra é aplicado vácuo sobre a amostra e na sequência o recipiente é preenchido com mercúrio, sendo que ao se aumentar a pressão exercida sobre o líquido, este penetrará nos poros cada vez menores (SCHMITT, 2009).

**Figura 10 – Princípio da técnica de PIM, onde  $p_0$  é a pressão inicial aplicada sobre a amostra**



Fonte: Adaptado de SCHMITT (2009).

A curva da porosimetria é obtida através da informação do volume de poros do material que foi penetrado pelo mercúrio a uma dada pressão. De acordo com Porcheron & Monson (2004) este método de cálculo da porosidade traduz as pressões aplicadas em valores de distribuição de tamanho de poros do material. A Equação 2 (Equação de Washburn) é utilizada para este cálculo.

$$D = \frac{-4*\gamma \cos\theta}{P} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

- D é o diâmetro do poro;
- P é a pressão necessária para que o mercúrio adentre naquele tamanho de poro;
- $\gamma$  é a interpretação de tensão superficial e;
- $\theta$  é o ângulo de contato entre o mercúrio e a parede do poro.

De Muynck *et al.* (2010) realizou estudos de PIM em amostras de calcário com adição de bactérias a partir da imersão das amostras em culturas crescidas de *Bacillus sphaericus* durante um dia de idade e observou que após esse período de exposição não houve diferenças significativas entre a PIM das amostras o tratamento com bactéria e com esse tratamento.

Além destes ensaios, para averiguar se a diminuição dos poros por biocimentação se dá pela precipitação bacteriana de  $\text{CaCO}_3$  são feitas análises microestruturais a partir de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), Sistema de energia dispersiva (*energy dispersive system* - EDS) e termogravimetria (TG).

### 2.2.3 Análise microestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS)

A análise por Microscópio Eletrônico de Varredura é utilizada em diversas áreas do conhecimento, este microscópio é capaz de produzir imagens de alta resolução da superfície de uma amostra. A imagem é formada pela incidência de um feixe de elétrons na superfície da amostra, promovendo a emissão de elétrons secundários e retroespalhados. A imagem representa em tons de cinza a contagem destes elétrons secundários e retroespalhados, emitidos pelo material analisado (DUARTE *et al.*, 2003).

Além das imagens, pode ser acoplado ao MEV um sistema de EDS (*Energy Dispersive System*), que possibilita a determinação da composição qualitativa das amostras, a partir da emissão de raios X característicos. O limite de detecção é da ordem de 1%, mas pode

variar de acordo com as especificações utilizadas durante a análise, como o tempo de contagem, por exemplo (DUARTE *et al.*, 2003).

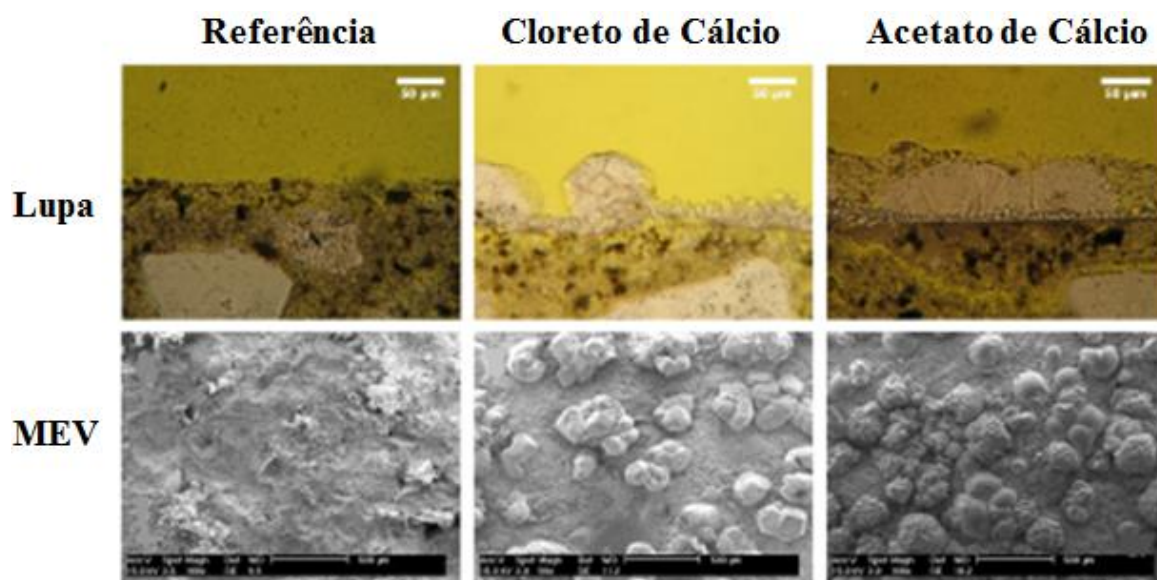
O uso de MEV e EDS pode ser utilizado tanto para a visualização da precipitação de  $\text{CaCO}_3$  por ação bacteriana quanto para a verificação da microestrutura dos produtos de hidratação do cimento.

### 2.2.3.1 Análise dos cristais de $\text{CaCO}_3$

A análise por MEV e EDS nos estudos de biocimentação são bastante utilizados, pois pode-se verificar o fechamento de poros nos materiais cimentícios analisados, assim como a precipitação dos cristais de  $\text{CaCO}_3$ , analisando a partir de EDS se os locais onde os cristais são visualizados apresentam picos de cálcio.

Alguns estudos de micro análise já foram realizados na área, De Muynck *et al.* (2008) utilizou a bactéria ureolítica *B. sphaericus* na concentração de  $10^7$  esporos/mL, adicionando essa bactéria como um tratamento de superfície, a partir da imersão das amostras em duas soluções, uma contendo a bactéria com cloreto de cálcio e outra com acetato de cálcio. Os resultados da análise por lupa e MEV podem ser visualizados na Figura 11.

Figura 11 - MEV do tratamento de superfície com amostras de referência (sem bactéria) e com bactéria, tratadas com cloreto de cálcio e acetato de cálcio.



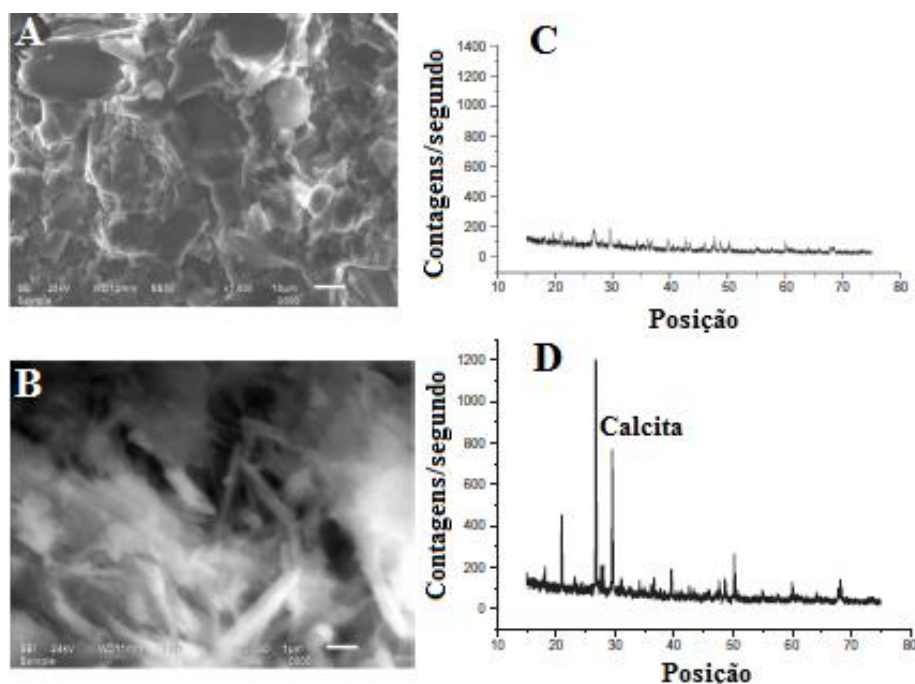
Fonte: Muynck *et al.* (2008)

Pode-se observar que nas imagens das amostras de referência (sem adição de bactéria) não houve a precipitação de cristais, já nos com adição de *B. sphaericus* na

concentração de  $10^7$  esporos/mL ocorreu a precipitação, tanto para a adição com cloreto de cálcio, quanto para adição com acetato de cálcio. Porém, verificou-se que as amostras com acetato de cálcio precipitaram  $\text{CaCO}_3$  de uma forma mais densa e homogênea, ao longo de toda superfície, quando comparada a amostra contendo cloreto de cálcio.

Chahal e Siddique (2013) ensaiaram amostras de concreto com substituição de cinza volante e sílica ativa ao cimento, com adição de três concentrações de *B. pasteurii*,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  células/mL. Os resultados obtidos por MEV e difração de raios X (DRX) podem ser visualizados na Figura 12, onde em (a) estão as amostras sem adição de bactéria e sem nenhuma substituição a massa de cimento, em (b) com adição de bactéria e com substituição de 10% de cinza volante e 10% de sílica ativa; em (c) DRX da referência, sem bactéria e sem substituições e em (d) DRX da amostra representada em (b).

Figura 12 - MEV das amostras de concreto



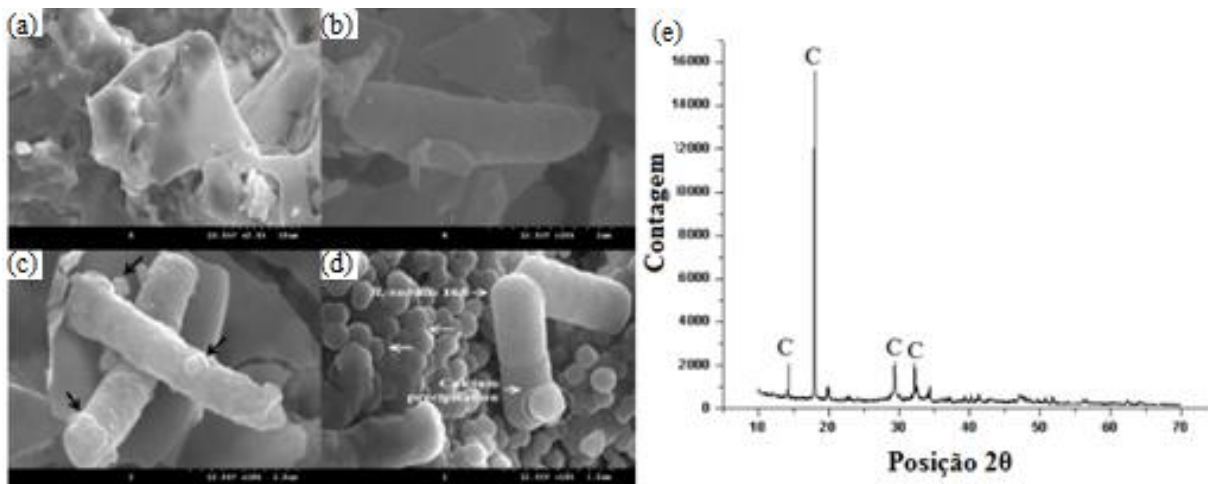
Fonte: Chahal e Siddique (2013).

Com a análise dos resultados de MEV apresentados por Chahal e Siddique (2013), verificou-se que as amostras sem adição de bactéria não apresentaram a precipitação de cristais e não teve picos de calcita no DRX, mostrando que não ocorreu a precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , diferente da amostra com adição de bactéria.

Além destes autores, Park *et al.* (2012) realizou estudos com a bactéria *B. subtilis* no meio de cultivo B4. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 13. Onde o controle foi efetuado de duas formas, apenas o meio de cultivo Figura 13 (a), o meio de cultivo

com o inóculo da bactéria *E. coli*, que não precipita cristais, Figura 13 (b), a bactéria *B. cereus* na Figura 13 (c) e *B. subtilis* na Figura 13 (d).

**Figura 13 – Análise da precipitação de  $\text{CaCO}_3$  no meio de cultivo B4**

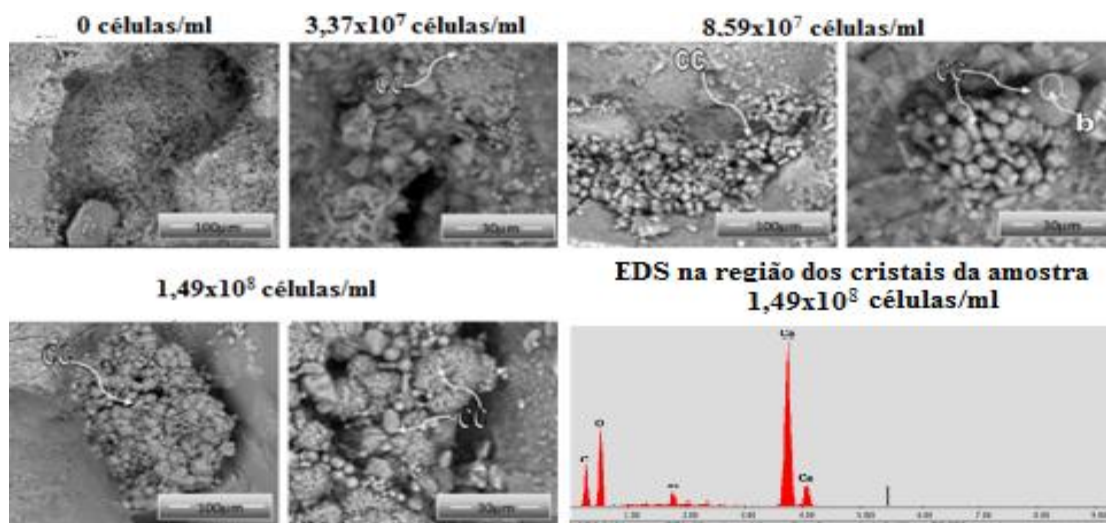


Fonte: Park *et al.* (2012)

Da mesma forma do apresentado pelos autores já relatados, o estudo realizado por Park *et al.* (2012) verificou que apenas o meio de cultivo e a bactéria *E. coli* não tem capacidade de precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , diferente das bactérias *B. cereus* e *B. subtilis*. Pode-se observar que houve maior precipitação nas amostras contendo *B. subtilis*, e a presença de calcita foi comprovada a partir do DRX.

Abo-El-Enien *et al.* (2013) realizou análise em MEV e EDS de amostras com a bactéria *B. pasteurii* em concentrações de 0,  $3,37 \times 10^7$ ,  $8,59 \times 10^7$  e  $1,49 \times 10^8$  células/mL na água de amassamento das amostras, as quais foram curadas imersas em 20g/l de ureia e 25 molar de  $\text{CaCl}_2$  para análises. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 14.

**Figura 14 – MEV dos corpos de prova de referência e contendo *B. pasteurii* em diversas concentrações, assim como o DRX na região dos cristais**

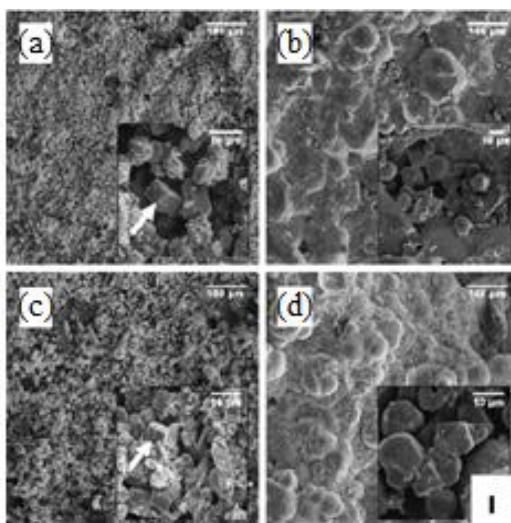


Fonte: Abo-El-Enien *et al.* (2013)

A partir da análise da Figura 14, pode-se observar que em todas as amostras contendo adição de bactérias houve precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , confirmado pela presença de cálcio no EDS, já nas amostras sem adição de bactérias, essa precipitação não foi verificada.

Além desses autores, De Muyneck *et al.* (2008) utilizou a bactéria *B. sphaericus* na concentração de  $10^7$  esporos/mL para analisar a precipitação de  $\text{CaCO}_3$ . A Figura 15 ilustra os resultados obtidos na pesquisa, onde em (a) a bactéria *B. sphaericus* está em meio contendo cloreto de cálcio, em (b) em cloreto de cálcio com nutrientes, em (c) com acetato de cálcio e em (d) com acetato de cálcio e nutrientes.

**Figura 15 - Precipitação de  $\text{CaCO}_3$  promovida por *B. sphaericus* (a-d)**

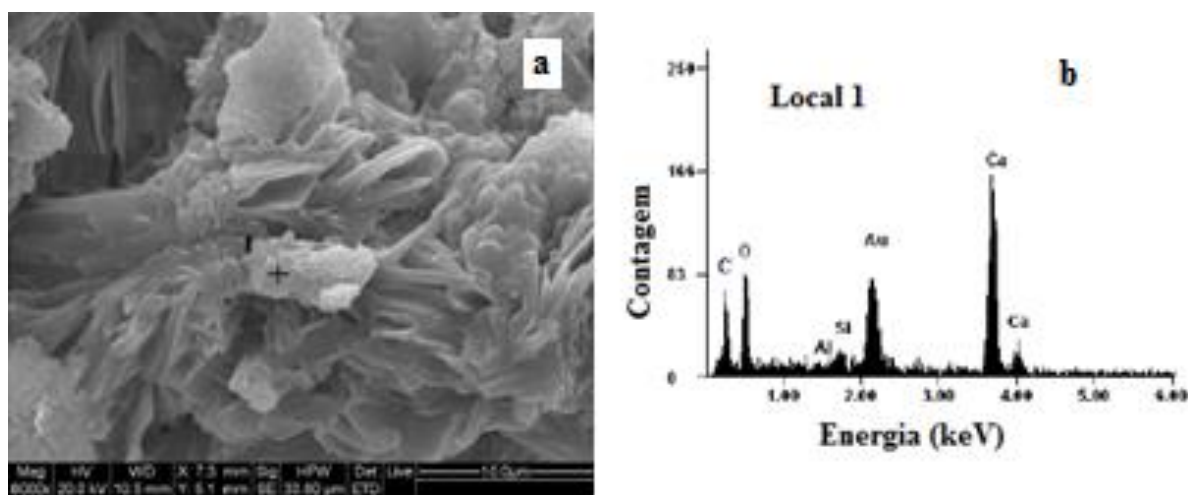


Fonte: Muyneck *et al.* (2008)

Pode-se observar que houve a precipitação de cristais de  $\text{CaCO}_3$  em todas as amostras, independente das adições que as mesmas continham, apresentando apenas pequenas variações de morfologia.

Xu e Yao (2014) também realizaram MEV e EDS em amostras de argamassas com adição de *B. cohnii* com lactato de cálcio e glutamato de cálcio na água de amassamento, as quais foram curadas imersas em água. A Figura 16 ilustra os resultados obtidos pela pesquisa, onde em (a) está representada a Microscopia Eletrônica de Varredura da amostra e em (b) está o EDS do local indicado em (a).

**Figura 16 – MEV e EDS da amostra contendo cristais precipitados pela bactéria *B. cohnii***



Fonte: Xu e Yao (2014)

Na Figura 16 (b) verificou-se um pico de ouro, o qual é proveniente da preparação da amostra para análise. Foi passada uma película de ouro sobre a amostra afim de se obter uma imagem de melhor qualidade e fazer ao mesmo tempo a imagem e o ensaio de EDS.

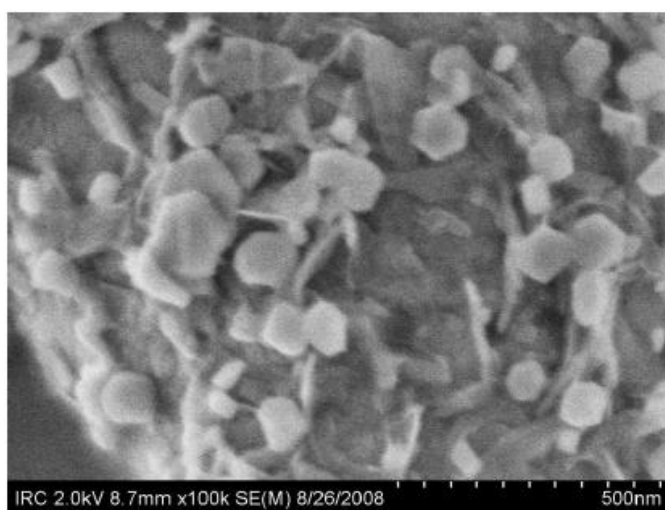
Como nas demais amostras analisadas, observou-se que houve a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  pela presença de Cálcio (Ca), Carbono (C) e oxigênio (O). Os outros componentes podem ser resultantes de resíduos dos meios de cultivo ou da preparação da amostra. Porém, cabe salientar que estes componentes foram encontrados em pequena escala, sendo que em algumas amostras, os autores até retiraram os elementos dos picos, para enfatizar a importância do cálcio nos resultados de EDS.

### 2.2.3.2 Análise dos produtos de hidratação do cimento

Quando a água é adicionada ao cimento Portland inicia-se um processo reativo exotérmico, a partir do qual desenvolvem-se reações de hidratação, formando ligações que ministram resistência à pasta. Nos primeiros minutos do contato da água com o cimento, o alumínio e o ferro reagem com o gesso, formando um gel amorfo na superfície dos grãos de cimento e pequenos cristais de etringita, o que vai consumindo o cálcio presente no ambiente, até que se atinja o período de dormência (DUARTE, 2010).

Após o período de dormência, dá-se a reação dos silicatos de cálcio no interior dos grãos, formando o hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) e os silicatos de cálcio hidratados (C-S-H). O hidróxido de cálcio (HC) tem forma hexagonal e lamelar, podendo apresentar um tamanho médio de 7  $\mu\text{m}$  e têm como grande limitação ao seu crescimento os tortuosos caminhos de vazios capilares livres (DUARTE, 2010). Na Figura 17 se apresenta a morfologia dos cristais de HC.

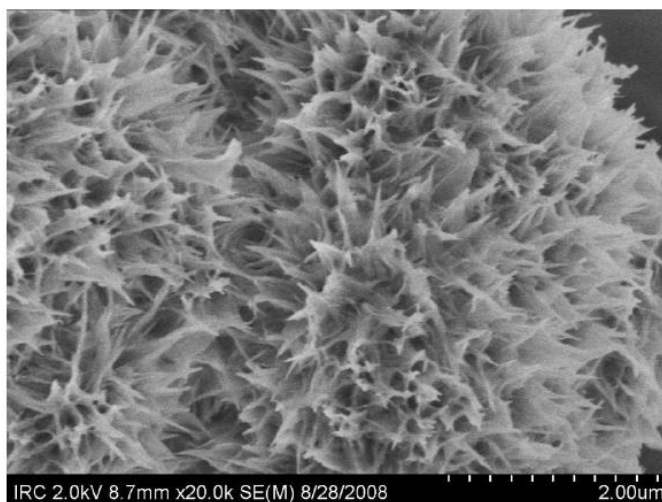
**Figura 17 – Aglomerado de cristais de HC na superfície de  $\text{C}_3\text{S}$  após 2,5 horas de hidratação**



**Fonte:** Duarte, 2010.

Já o C-S-H pode ser visualizado de duas formas, uma externa ao grão e outra interna. Quando o silicato tricálcico ( $\text{C}_3\text{S}$ ) reage com a água, ocorre a produção do C-S-H exterior (Figura 18), que apresenta estrutura fibrilar alongada e fina, com textura irregular e elevada porosidade, a qual é formada nos espaços anteriormente ocupados pela água. Já o C-S-H interior vai se formando próximo de superfícies com  $\text{C}_3\text{S}$  e é formado nos lugares anteriormente ocupados pelos grãos de cimento, possuindo estruturas com texturas uniformes (RICHARDSON, 2007; DUARTE, 2010).

**Figura 18 – C-S-H exterior formado após duas semanas de hidratação**

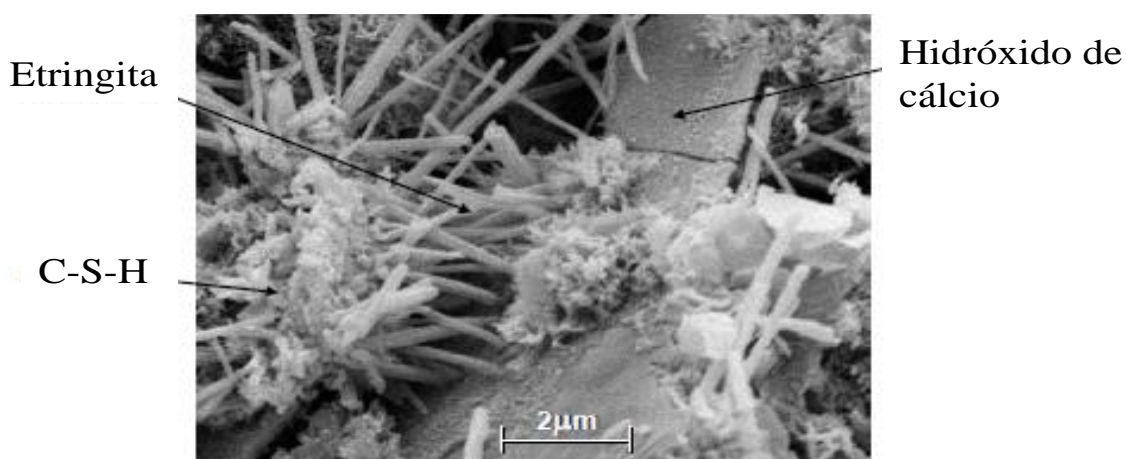


Fonte: Duarte (2010).

Cabe ressaltar que o C-S-H é o principal componente do processo de hidratação do cimento Portland e também é um dos principais contribuintes o desenvolvimento da resistência (CIACH *et al.*, 1974). Este material é formado por um conjunto de substâncias, compostas por uma associação de partículas quase amorfas que contêm cálcio, sílica e água na sua composição (DUARTE, 2010).

A Figura 19 é uma representação típica dos produtos de hidratação do cimento Portland, onde pode ser visualizado os cristais de hidróxido de cálcio, de silicato de cálcio hidratado e de etringita (ALIZADEH, 2009).

**Figura 19 - Produtos de hidratação do cimento Portland**



Fonte: ALIZADEH (2009)

A etringita tem como constituintes o cálcio, alumínio, hidrogênio, enxofre e oxigênio e é formada durante a fase de hidratação da pasta de cimento por dissolução do

aluminato tricálcico e do gesso. Normalmente tem morfologia de longos prismas hexagonais que se formam entre 8 e 20 horas de hidratação. A etringita pode apresentar diferentes configurações, pois sua cristalização se adapta ao espaço disponível (DUARTE, 2010).

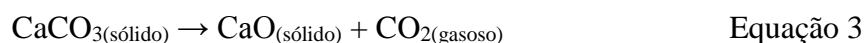
#### 2.2.4 Termogravimetria (TG)

A Termogravimetria analisa a variação da massa de uma amostra submetida a um aquecimento pré-definido. O equipamento de termogravimetria é composto de uma balança acoplada ao forno resistivo, o qual vai proporcionando o aquecimento e juntamente a este aquecimento é traçada a curva termogravimétrica. Esta curva relaciona temperatura com perda de massa em função do tempo, e a partir disso o material é caracterizado (CORDEIRO, 2006).

Uma forma comum de analisar a curva termogravimétrica é traçar os dados da perda de massa pelo aumento da temperatura ou ao longo do tempo. Conhecendo a temperatura em que ocorre a decomposição de um determinado composto químico é possível através de cálculo estequiométrico utilizar dados de perda de massa e estimar a quantidade deste composto na amostra analisada (NITA e JOHN, 2007).

Nos materiais cimentícios, uma das utilidades da termogravimetria é quantificar a quantidade de hidróxido de cálcio das reações de hidratação do cimento. De acordo com TAYLOR (1990) a decomposição do hidróxido de cálcio ocorre entre 425°C a 550°C, temperatura na qual ocorre a diminuição do pico neste intervalo de temperatura. Sendo assim, ocorre a constatação da atividade pozolânica, representando o consumo de hidróxido de cálcio.

Para a análise de materiais cimentícios com adição de bactéria, a termogravimetria é utilizada para verificar a presença de carbonato de cálcio. Quando os cristais de  $\text{CaCO}_3$  estão presentes no material de reparação, que se decompõe em  $\text{CO}_2$  e  $\text{CaO}$  após aquecimento, de acordo com a Equação 3 (VAN TITTELBOOM *et al.*, 2010).

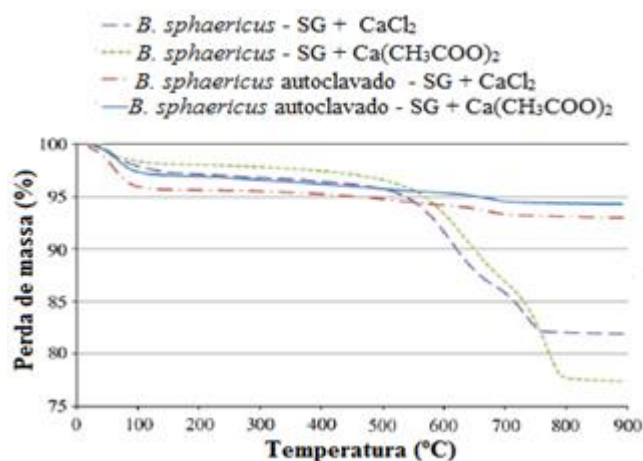


Segundo Oniyama e Wahlbeck (1995) o  $\text{CaCO}_3$  se dissocia entre temperaturas de 650 a 750°C, resultando em uma perda de massa causada pela libertação de  $\text{CO}_2$ .

Van Tittelboom *et al.* (2010) realizou análise termogravimétrica em amostras extraídas de fissuras, tratadas com *B. sphaericus* imobilizados em sílica gel (SG), presentes em uma solução equimolar de ureia e cálcio, com duas diferentes fontes de cálcio, acetato de cálcio

( $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) e cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ). Estes meios foram testados com bactérias viáveis e também com bactérias que foram autoclavadas, para avaliar se ocorria a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  nas mesmas condições, porém com as células mortas. Os resultados obtidos estão apresentados no Gráfico 10.

**Gráfico 10 – Termogravimetria das amostras contendo *B. sphaericus***



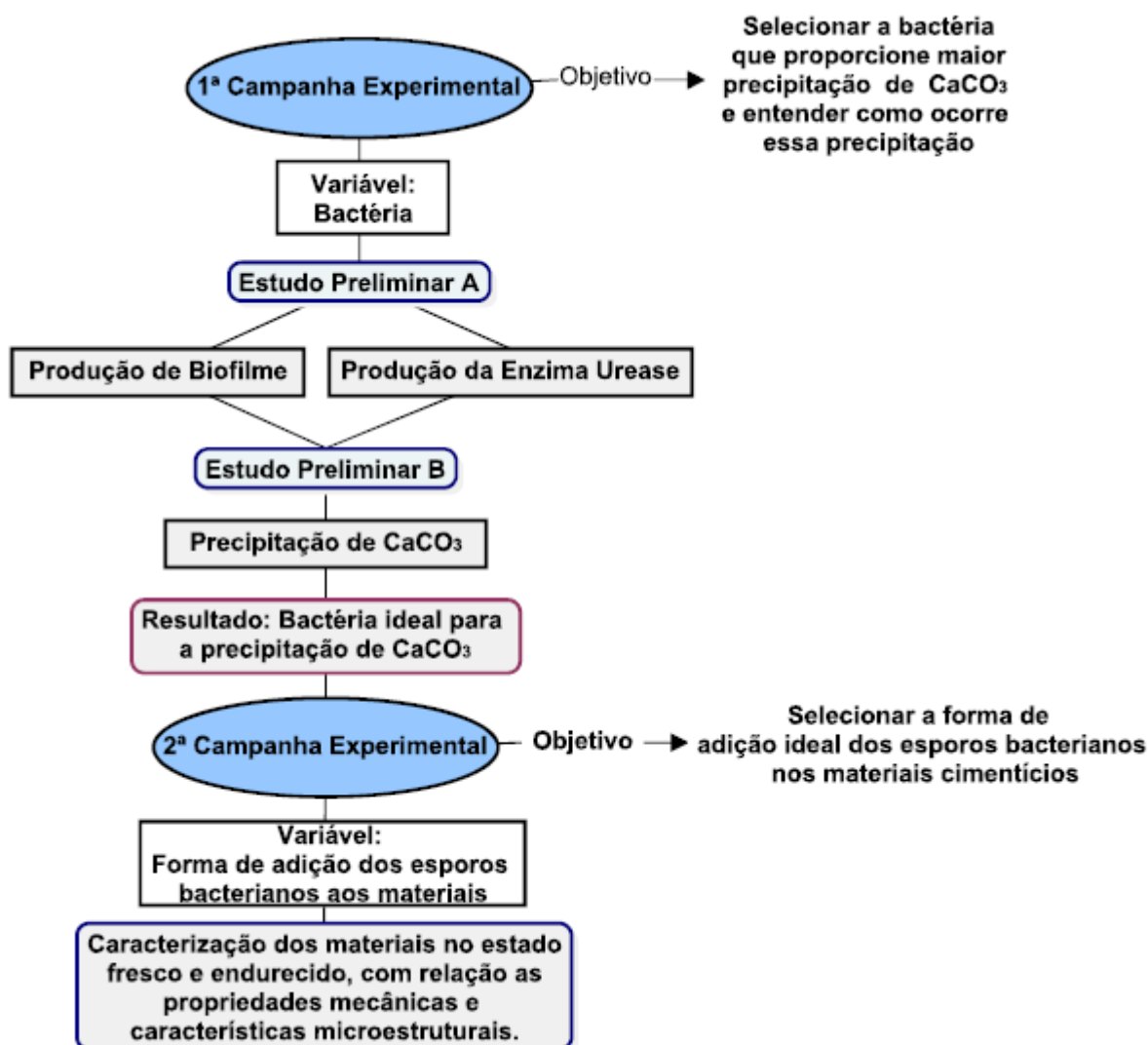
Fonte: Van Tittelboom *et al.* (2010)

Pode-se observar que houve uma pequena perda de massa até as temperaturas de 200°C em todas as amostras, material este proveniente de restos de matéria orgânica. Porém, a maior perda de massa observada foi nas amostras onde a bactéria não foi autoclavada, entre as temperaturas de 550 a 800°C, mostrando que nestas amostras houve a precipitação de cristais e os mesmos foram dissociados sob aquecimento em ensaio. Pode-se observar ainda que a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  foi maior no meio contendo acetato de cálcio, comprovando que nestas condições, a adição de acetato de cálcio proporciona maior precipitação de  $\text{CaCO}_3$  por meio da *B. sphaericus*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Frente aos objetivos da pesquisa foi realizada uma pesquisa bibliográfica contínua em artigos nacionais e internacionais, dissertações e teses, durante todas as fases do projeto, a fim de subsidiar o planejamento metodológico adequado. Sendo assim, a parte experimental foi dividida em duas campanhas experimentais, conforme apresentado na Figura 20.

**Figura 20 – Fluxograma do trabalho experimental**



Fonte: O próprio autor.

Na primeira campanha experimental define-se a bactéria que proporcione a maior precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , em meio específico. Essa escolha foi realizada a partir de análises de quantificação de  $\text{CaCO}_3$  precipitado por meio de filtração e, verificação da morfologia e

composição química dos cristais por meio de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS), respectivamente.

A partir da bactéria ideal encontrada na primeira campanha experimental se inicia a segunda, visando avaliar duas formas de adição dos esporos bacterianos a uma argamassa, na água de amassamento no momento da mistura e outra por imersão dos corpos de prova em solução contendo os esporos bacterianos.

### 3.1 PRIMEIRA CAMPANHA EXPERIMENTAL

Na primeira campanha experimental avaliou-se a eficiência da precipitação de carbonato de cálcio promovida pelas bactérias. Para tanto, tornou-se necessário entender quais os metabólicos envolvidos no processo de bioprecipitação de  $\text{CaCO}_3$ . Para isso, foram realizados testes para verificar se as bactérias *B. cereus* e *B. subtilis* AP91 produzem biofilme e enzima urease. Após estes ensaios, com as mesmas bactérias, analisou-se a morfologia do  $\text{CaCO}_3$  precipitado pela mudança de pH durante a produção de biofilme, em meio específico, simulando como ocorreria essa precipitação nos materiais cimentícios.

Cabe destacar que a bactéria *B. subtilis* AP91 foi adquirida do Instituto Biológico de São Paulo, em forma de esporos dispersa em solução salina e de acordo com informação repassada pelo pesquisador, a mesma foi isolada de folhas de arroz da variedade agulha precoce. Já a bactéria *B. cereus* foi crescida a partir de uma alíquota do medicamento Biovicerin, que contém  $5 \times 10^6$  esporos/mL.

#### 3.1.1 Estudo Preliminar A

Este estudo foi realizado para o entendimento de como as bactérias precipitam o  $\text{CaCO}_3$ . Para tanto, testou-se as bactérias quanto a produção de biofilme e da enzima urease. Ambos os testes foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada da Universidade Estadual de Londrina.

##### 3.1.1.1 Produção de Biofilme

Para avaliar a produção de biofilme das bactérias *B. cereus* e *B. subtilis* AP91, foi testada a metodologia apresentada por Kerbauy *et al.* (2016), com um meio de precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , denominado B4. Este meio simula o que acontecerá quando as bactérias forem adicionadas aos materiais cimentícios. De acordo com Bäuerlein (2003) a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  a partir do meio B4 se dá pela mudança de pH para o alcalino, o que ocorre em um pH

de em média 8,2. Cabe salientar que Marvasi *et al.* (2013) afirma que essa mudança de pH ocorre durante a formação de biofilme.

O meio B4 foi produzido na proporção de 10 mL, contendo 0,04g de extrato de levedura (Difco), 0,25mL de solução de acetato de cálcio (Sigma) a 10% e 0,17mL de glicose (Sigma) a 40%, sendo que para sua elaboração foram seguidas as prescrições descritas por Marvasi *et al.* (2013), onde para a mistura do meio, o extrato de levedura e o acetato de cálcio foram autoclavados separadamente com água destilada, para evitar a floculação do acetato de cálcio. Após permanecerem na autoclave por 15 minutos a 121°C, o meio foi homogeneizado em capela de fluxo laminar, afim de evitar qualquer contaminação.

As bactérias testadas foram a *B. subtilis* AP91 e *B. cereus* e o controle utilizado foi a bactéria *E. coli* HB101 (não produtora de biofilme). Cada bactéria foi inoculada em meio Luria-Bertani (LB), contendo 10 g/L de digestão enzimática de caseína, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de cloreto de sódio. As cepas foram mantidas em estufa a 37°C durante 24 horas para reativação das células, para posterior análise da produção de biofilme.

Para análise da produção de biofilme, colocaram-se 4 lamínulas tratadas com poli-L-lisina<sup>12</sup> em 4 poços de uma placa de 24 poços, conforme a Figura 21. Em cada um destes poços, foi colocado 1 mL de meio B4 estéril e 50 µL de solução crescida em LB durante 24 horas contendo as 3 bactérias (*B. subtilis* AP91, *B. cereus*, *E. coli* HB101). Na quarta lamínula analisou-se se o experimento estava contaminado. Para tanto, no poço contendo a última lamínula foi inserido apenas o meio de cultivo, denominado teste branco. A placa foi armazenada durante 24 horas em estufa a 37°C juntamente com o restante do meio de cultivo.

**Figura 21 - Placa com 24 poços**



**Fonte:** O próprio autor.

---

<sup>12</sup> Material utilizado para garantir uma boa aderência do material a ser fixado sobre a lamínula.

Na sequência, retirou-se a solução crescida por meio de pipetas e a mesma foi descartada. Em seu lugar foram inseridos 1 mL de solução salina 0,85% para lavar a lamínula com material fixado, este procedimento foi repetido 3 vezes. Em seguida, retirou-se o cloreto de sódio (NaCl) e foram inseridos mais 1 mL de meio de cultivo esterilizado em cada poço, para que houvesse o crescimento da bactéria e do biofilme sobre o material aderido na lamínula e a placa foi novamente armazenada em estufa à 37°C por 24 horas.

Posteriormente, as amostras foram desidratadas com solução crescente de álcool (Merck®), a 70, 80, 90 e 100%, durante 15 minutos para cada álcool e tal procedimento repetiu-se quatro vezes. Por fim, as amostras foram preparadas para análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) FEI Quanta 200 no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina.

#### 3.1.1.2 Produção de Urease

O teste de produção de urease foi realizado a partir do meio ágar ureia de Christensen e possui os constituintes apresentados no Quadro 4. O resultado desta análise se dá por diferença de coloração, onde o meio muda para cor rosa caso haja a degradação da ureia por meio da enzima urease, e fica amarelo caso não haja a produção da enzima. As bactérias testadas foram *B. subtilis* AP91 e *B. cereus*. Para a garantia de um resultado satisfatório, a análise foi realizada com um controle positivo e um controle negativo, onde no controle positivo incubou-se a bactéria *Klebsiella penoumoniae* que é produtora de urease, e no controle negativo a bactéria *E. coli* HB101 que não produz a enzima.

No Quadro 4 está apresentada a formulação do meio ágar ureia de Christensen, o qual foi diluído de acordo com a orientação do fabricante (2,4 gramas em 95mL de água destilada). Na sequência ferveu-se o meio para que se dissolvesse completamente. Então o meio foi esterilizado a 115°C por 20 minutos e esfriado até 50°C, nessa condição foi adicionado 5 mL de solução de ureia 40%. Por fim, distribuiu-se o meio em tubos estéreis, os quais foram colocados em estufa a uma temperatura de 37°C para a análise após 24 horas com o resultado do ensaio.

**Quadro 4 – Constituintes meio ágar ureia de Christensen**

Constituintes	Quantidade (g/l)
Peptona	1,000
Glicose	1,000
Cloreto de sódio	5,000
Fosfato dissódico	1,200
Fosfato monopotássico	0,800
Vermelho de fenol	0,012
Ágar	15,000
Ureia	*

\* Deve ser adicionado 5 mL de ureia em solução 40%, após o meio ser autoclavado.

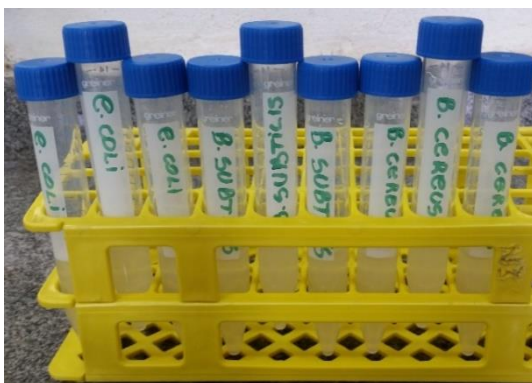
### 3.1.2 Estudo Preliminar B

Após o estudo preliminar A ser efetuado iniciou-se o estudo preliminar B, no qual foi analisada a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  a partir da mudança de pH durante a formação de biofilme. Para tanto, foram testadas as bactérias *B. cereus* e *B. subtilis* AP91, a bactéria *E. coli* HB101 foi utilizada como o controle do teste, já que não é produtora de biofilme e de cristais de  $\text{CaCO}_3$  por meio da mudança de pH. Este estudo realizou-se para verificar *in vitro* como ocorreria a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  nos materiais cimentícios. Para tanto, utilizou-se o meio de cultivo B4, conforme já descrito anteriormente.

#### 3.1.2.1 Preparação do meio B4 e inóculo da bactéria

Preparou-se o meio B4 na proporção de 60 mL, seus constituintes e procedimentos de mistura seguiram os parâmetros apresentados por Marvasi *et al.* (2013). O meio foi vertido em 9 tubos cônicos de poliestireno de 15 mL, conforme a Figura 22, e as bactérias *E. coli* HB101, *B. cereus* e *B. subtilis* AP91 foram inoculadas em triplicata e armazenadas durante 7 dias em agitador a 37°C, com agitação constante de 170 rpm, para posterior análise em MEV, EDS e quantificação dos cristais precipitados.

**Figura 22 – Tubos cônicos de 15 mL com as bactérias inoculadas**



Fonte: O próprio autor.

### 3.1.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) do CaCO<sub>3</sub> precipitado

Para avaliar a composição química do material precipitado, a morfologia e como ocorre a bioprecipitação de CaCO<sub>3</sub>, foram retirados 20 µL de solução de cada bactéria crescida por 7 dias para análise por MEV e EDS, observando se a parede celular bacteriana atua como local de nucleação dos cristais, como esquematizado por De Muynck *et al.* (2010).

Para tanto, 20 µL de cada cultura e 20 µL da solução fixadora (glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M) foram adicionadas a lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, USA). Após 30 minutos, o volume da solução fixadora foi completado para 500 µL. As amostras sofreram fixação por 18 horas e pós fixadas em tetróxido de ósmio por 1 hora. As amostras foram desidratadas em um gradiente crescente de etanol (70, 80, 90 e 100%), secas ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> (BALTEC CPSD 030), metalizadas com ouro (BALTEC SDC 050) e observadas em MEV (FEI Quanta 200).

### 3.1.2.3 Quantificação do material retido no filtro

Para quantificação do material retido no filtro, os tubos de poliestireno de 15 mL contendo 5 mL de solução crescida foram divididos em dois, contendo 2,5 mL em cada. Estes tubos foram centrifugados a uma rotação de 2500 rpm por um período de 3 minutos, para que os cristais fossem para o *pellet* e a matéria orgânica ficasse no sobrenadante, de acordo com o descrito por Perito *et al.* (2014).

Em seguida, descartou-se o sobrenadante e nos tubos de poliestireno de 15 mL foram inseridos 2 mL de hipoclorito de cálcio saturado e 2 mL de água de seringa, esta nova solução sofreu homogeneização em vórtex durante 1 minuto, para então ser filtrada por

filtro de papel com abertura de 2  $\mu\text{m}$ . Quantificou-se a massa do filtro em balança de precisão antes de ser utilizado e após a amostra ser filtrada e seca em estufa à 37°C por 24 horas.

Para a determinação da massa de  $\text{CaCO}_3$  precipitado, foi utilizada a Equação 1 já apresentada em 2.1.2.3.

## 3.2 SEGUNDA CAMPANHA EXPERIMENTAL

Para selecionar a forma de adição ideal dos esporos bacterianos aos materiais cimentícios, foram necessários estudos do comportamento desses materiais no estado fresco e endurecido, assim como uma avaliação da sua microestrutura.

Para tanto, testaram-se duas formas de adição dos esporos da bactéria *B. subtilis* AP91 a uma argamassa básica, na água de amassamento no momento da mistura e por imersão dos corpos de prova em solução contendo os esporos da bactéria, após a desmoldagem dos mesmos.

Esta campanha experimental foi realizada para verificar qual forma de adição dos esporos bacterianos proporciona melhores desempenhos em uma argamassa básica, com relação às propriedades mecânicas e características microestruturais.

### 3.2.1 Materiais

Os materiais necessários para a realização desta campanha experimental foram:

- Cimento Portland CII E-32;
- Areia quartzosa, proveniente do Rio Paraná;
- Água potável, proveniente da rede de distribuição da SANEPAR.
- Solução tampão fosfato, com 1,05 g/l de Fosfato de Sódio (bibásico-anidro), correspondente a 0,07% em relação à massa de cimento, 0,36 g/l de Fosfato de Sódio (monobásico), correspondente a 0,02% em relação à massa de cimento, e 8,17 g/l de NaCl, correspondente a 0,51%, em relação à massa de cimento.
- Esporos da bactéria *B. subtilis* AP91, pois de acordo com os resultados obtidos na primeira campanha experimental, o uso da bactéria *B. subtilis* AP91 foi mais satisfatório do que a *B. cereus*, já que a mesma teve capacidade de precipitar um número maior de cristais e por não gerar amônio como subproduto. Essa bactéria foi

adicionada na concentração de  $10^5$  esporos/mL, de acordo com os resultados apresentados na revisão bibliográfica.

### 3.2.2 Método

Nesta campanha experimental foram estudadas quatro argamassas, afim de avaliar a melhor forma de adição dos esporos de *B. subtilis* AP91 a uma argamassa básica de traço 1:3 (cimento: areia), em massa, com relação a/c de 0,63. Cabe ressaltar que não foi objetivo do trabalho estudar o traço adotado, e sim analisar a biocimentação promovida pelos esporos em um material cimentício. Sendo assim, o traço adotado foi conforme apresentado por Abo-El-Enien *et al.* (2013), Ghosh *et al.* (2009), Achal *et al.* (2013) e Xu e Yao (2014).

As argamassas e suas respectivas nomenclaturas adotadas estão apresentadas no Quadro 5.

**Quadro 5 – Nomenclatura das argamassas**

Nomenclatura adotada	Descrição das argamassas
ARG_REF	Argamassa de referência sem nenhuma adição.
ARG_CTF	Argamassa com adição de tampão fosfato no lugar da água da mistura.
ARG_ESP_IM	Argamassa com adição de solução de $10^5$ esporos/mL de <i>B. subtilis</i> AP91 suspensos em solução tampão fosfato por imersão na água de cura.
ARG_ESP_AM	Argamassa com adição de solução de $10^5$ esporos/mL de <i>B. subtilis</i> AP91 suspensos em tampão fosfato, os quais foram adicionados no lugar da água de amassamento da mistura.

**Fonte:** O próprio autor.

#### 3.2.2.1 Preparo dos esporos bacterianos

Para obter uma solução de  $10^5$  esporos de *B. subtilis* AP91/mL, as bactérias foram inoculadas em 100 mL de meio LB (Luria-Bertani), o qual foi armazenado sob agitação de 170 rpm e temperatura de 37°C durante 48 horas. Após as 48 horas, verteu-se o meio em tubos de poliestireno de 15 mL, os quais foram centrifugados a 4.000 rpm, à temperatura de 23°C durante 3 minutos.

Na sequência, os tubos foram retirados da centrífuga, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* contendo as células bacterianas foi ressuspendido em solução tampão fosfato, homogeneizado e centrifugado novamente, afim de retirar das células toda matéria orgânica do meio em que as mesmas foram crescidas. Este procedimento foi repetido 4 vezes.

Ao final da última lavagem das células, as mesmas foram diluídas em solução tampão e quantificadas a partir de espectrofotômetro, com leitura de 600 nanômetros (nm). A

concentração de células foi obtida a partir da aplicação da Equação 4 (RAMACHANDRAN *et al.*, 2001):

$$X=8,59*10^7*Y^{1,3627} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

- X: É a concentração em células/mL;
- Y: é a leitura do espectrofotômetro, a 600 nm.

A partir da concentração encontrada, foram realizados os cálculos de diluição, até atingir a concentração desejada, de  $10^5$  células/mL, em quantidade suficiente para a confecção dos materiais cimentícios, que foi de 7000 mL. A solução foi dividida em recipientes, conforme ilustra Figura 23.

**Figura 23 – Recipientes com a solução de  $10^5$  células de *B. subtilis* AP91/mL**



Fonte: O próprio autor.

Esses recipientes com as solução de  $10^5$  células de *B. subtilis* AP91/mL foram armazenados em câmara fria à temperatura de 8°C durante dois dias, para que houvesse a esporulação das células. Em seguida foram retirados da câmara fria até que atingissem a temperatura de 18°C, para serem utilizados na confecção das argamassas.

### 3.2.2.2 Caracterização do agregado miúdo

As características do agregado miúdo empregado foram determinadas de acordo com as normas descritas no Quadro 6.

**Quadro 6 – Ensaio de caracterização do agregado miúdo**

Ensaio	Norma
Análise granulométrica	NBR NM 248/2003
Massa específica	NBR NM 52/2009
Massa unitária	NBR NM 45/2006

Fonte: O próprio autor.

### 3.2.2.3 Elaboração das argamassas

O traço adotado para a elaboração das argamassas foi de 1:3, em massa, com relação água/cimento (a/c) de 0,63. Os consumos de materiais empregados em cada argamassa dessa campanha estão apresentados no Quadro 7, assim como o procedimento de cura de cada argamassa dosada.

Quadro 7 – Consumo de materiais 2ª Campanha Experimental

Argamassas	Cimento (g)	Areia (g)	Água (mL)	Tampão fosfato (mL)	Esporos de <i>B. subtilis</i> /mL	Cura
ARG_REF	2362,5	7087,5	1488	0	0	Em água saturada com cal
ARG_CTF	2362,5	7087,5	0	1488	0	Em água saturada com cal
ARG_ESP_AM	2362,5	7087,5	0	1488	10 <sup>5</sup> (1)	Em água saturada com cal
ARG_ESP_IM	2362,5	7087,5	1488	0	10 <sup>5</sup> (1)	Em solução contendo 10 <sup>5</sup> esporos/mL saturada com cal

(1) A concentração de 10<sup>5</sup> foi dispersa nos 1488 ml de solução tampão fosfato.

**Fonte:** O próprio autor.

Padronizou-se o procedimento de mistura todas as argamassas, sendo estas preparadas em misturador planetário. Primeiramente, o cimento e a areia foram misturados, em seguida misturou-se por 30 segundos em velocidade baixa a metade da mistura de cimento e areia com a metade da água de amassamento. Na sequência acrescentou-se o restante do material e da água, ligando o misturador por 30 segundos em velocidade baixa. Cabe salientar que a cada tempo, a cuba do misturador era rasada afim de que não ficasse material aderido a ela.

Após esse período, a velocidade passou a ser rápida durante 30 segundos e depois foi reduzida durante 30 segundos. Na sequência homogeneizou-se a mistura por mais dois minutos, sendo um em velocidade alta e outro em velocidade baixa. Posteriormente foram realizados os ensaios no estado fresco: índice de consistência (NBR 13276/2005) e a massa específica (NBR 9833/2009).

Após esses ensaios os corpos de prova foram moldados, sendo que:

- Os corpos de prova cilíndricos, Figura 24(a), foram adensados em 4 camadas com 30 golpes em cada, conforme prevê a NBR 7215/1997;
- Os prismáticos de 10x10x130 mm utilizados para análise de microtomografia computadorizada de raios X e PIM, Figura 24 (b), foram adensados com 10 golpes em

duas camadas, sendo que para este foi confeccionado um soquete, o qual está representado na Figura 24 (c);

- Os corpos de prova para análise termogravimétrica foram moldados em tubos de ensaio de vidro com 1,0 cm de diâmetro por 7,5 cm de altura, apresentado na Figura 24 (d), os quais foram compactados com 10 golpes em duas camadas. Após a moldagem dos tubos de ensaio, os mesmos foram selados com papel filme afim de não terem contato com o CO<sub>2</sub>.

**Figura 24– Formas utilizadas na 2ª Campanha Experimental, onde em (a) estão apresentados os corpos de prova cilíndricos, de 50x100mm; em (b) os prismáticos, de 10x10x130 mm; em (c) o soquete utilizado para a compactação dos corpos de prova prismáticos e em (d) os tubos de ensaio utilizados para moldagem das amostras para termogravimetria.**



Fonte: O próprio autor.

Cabe ressaltar que em cada um dos moldes prismáticos, havia um corpo de prova no qual foi induzida abertura de 0,8 mm, que segundo a Norma Básica para Perícias de Engenharia do IBAPE/SP (2015) é classificada como trinca. Induziu-se a trinca a partir de um fio de nylon, conforme ilustra a Figura 25. O fio de nylon foi colocado logo após a moldagem e retirado após 3 horas e meia. Utilizou-se o corpo de prova trincado para análise em MEV e em lupa, afim de verificar se o CaCO<sub>3</sub> precipitado teria capacidade de fechar a trinca induzida.

**Figura 25 – Corpos de prova prismáticos moldadas com a trinca induzida**



**Fonte:** O próprio autor.

Os quatro corpos de prova restantes, sem trinca, foram moldadas para análise em microtomógrafo e porosímetro de intrusão de mercúrio.

A desmoldagem dos corpos de prova ocorreu após 48 horas. Os corpos de prova prismáticos trincados foram cortados em 5 partes iguais, conforme a Figura 26. Devido as imperfeições, descartou-se as extremidades. Na sequência os corpos de prova foram submetidos a cura submersa em tanque saturado com cal para as argamassas de referência, com tampão fosfato e com adição de esporos bacterianos na água de amassamento. Já a argamassa com adição de esporos por imersão foi curada em um tanque com concentração de  $10^5$  esporos/mL dispersos em solução tampão e saturado com cal.

**Figura 26 – Amostras prismáticas fatiadaos**



**Fonte:** O próprio autor.

As amostras moldadas nos tubos de ensaio permaneceram seladas até as idades de ensaio, com exceção da ARG\_ESP\_IM, a qual foi desmoldada após 48 horas e foi imersa em solução tampão saturada com cal contendo  $10^5$  esporos de *B. subtilis* AP91/mL.

### 3.2.2.4 Ensaios realizados no estado endurecido

No Quadro 8 estão apresentando os ensaios realizados no estado endurecido, com as dimensões dos corpos de prova (cp's), o número de cp's por idade, as idades de ensaio e as normas que regem estes ensaios.

**Quadro 8 – Ensaios no estado endurecido**

Ensaio	Dimensão dos cp's	Número de cp's por idade	Idades de ensaio (dias)	Norma
Resistência à compressão	50x100mm	5	7 e 28	NBR 7215/1997
Resistência à tração por compressão diametral	50x100mm	2	7 e 28	NBR 7222/2011
Módulo de elasticidade	50x100mm	4	7 e 28	NBR 15630/2008
Absorção de água e índice de vazios	50x100mm	3	28	NBR 9778/2009
Porosimetria por microtomografia computadorizada de raios-X	10x10x100mm	3	7 e 28	-
Microscópio Eletrônico de Varredura	10x10x10mm	1	7 e 28	-
Análise das trincas por meio de lupa	10x10x20mm	1	2, 7, 14, 21, 28 e 56	-
Porosimetria por intrusão de mercúrio	10x10x10mm	1	7 e 28	-
Termogravimetria	17 mg	1	7, 14 e 28	-

**Fonte:** O próprio autor.

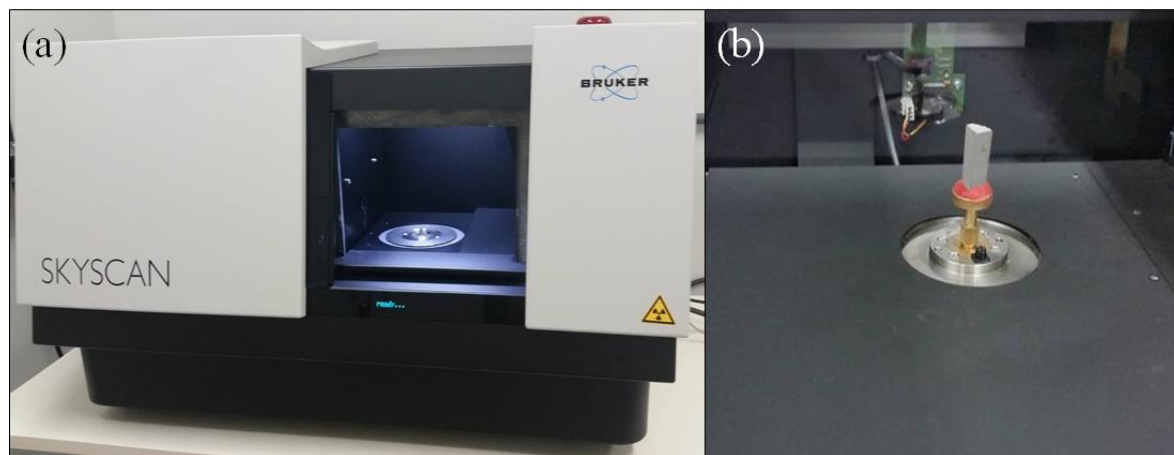
Cabe salientar que, ao se moldar os corpos de prova de absorção de água e índice de vazios, não foi utilizado nenhum tipo de desmoldante, para que não houvesse influência nos resultados, conforme previsto em norma.

Na sequência, estão descritos os ensaios realizados no estado endurecido que não estão normatizados.

### 3.2.2.5 Porosimetria por microtomografia computadorizada de raios-X ( $\mu$ -CT)

Os ensaios de porosidade por  $\mu$ -CT foram realizados no Laboratório de Análises por Técnicas de Raios-X (LARX), por meio de um microtomógrafo computadorizado de raios-X da marca Skyscan 1173, apresentado na Figura 27. A  $\mu$ -CT utiliza várias radiografias obtidas em passos angulares específicos para reconstruir a imagem 3D da amostra através do empilhamento de várias seções 2D. Desse modo, é possível determinar a porosidade total (porosidade aberta + porosidade fechada) e as distribuições de tamanho de poros da amostra.

**Figura 27 – Microtomógrafo Skyscan (a) com o corpo de prova dentro do equipamento (b)**



**Fonte:** O próprio autor.

Para este ensaio, foram utilizadas amostras de 10x10x100 mm em triplicata, aos 7 e 28 dias. Sendo que a porcentagem de poros foi calculada na parte central das amostras, equivalente a  $\frac{1}{4}$  de sua altura e as suas bordas não foram descartadas.

Optou-se por analisar uma amostra de 10x10x100 mm porque a resolução espacial definida na  $\mu$ -CT depende do tamanho da amostra medida. Quanto menor a amostra, menor a resolução espacial que se pode utilizar. Desse modo, quanto menor a resolução espacial, poros menores serão observado na amostra, a menos que não exista poros menores que a resolução espacial do aparelho utilizado. No caso da amostra de 10x10x100 mm foi utilizada uma resolução espacial de 14  $\mu\text{m}$ , o que limitou a leitura da porosidade abaixo de 28  $\mu\text{m}$ , ou seja, o ensaio foi sensível a poros iguais ou maiores que 28  $\mu\text{m}$ .

#### 3.2.2.6 Porosimetria por intrusão de mercúrio (PIM)

A porosimetria por intrusão de mercúrio foi realizada no Porosímetro Micromeritics Autopore IV, apresentado na Figura 28. Sendo que as amostras tinham dimensão de 10x10x10 mm e foram ensaiadas nas idades de 7 e 28 dias. Para as análises, as amostras foram secas em estufa à temperatura de 70°C até atingirem constância de massa. Sendo que após isto foram seladas até que atingissem a temperatura ambiente, para em seguida serem ensaiadas no porosímetro.

**Figura 28 – Porosímetro Micromeritics Autopore IV**



**Fonte:** O próprio autor.

### 3.2.2.1 Termogravimetria (TG)

A termogravimetria permite analisar a perda de massa, com o aumento da temperatura, fornecendo informações sobre as faixas limites de temperatura de uso das mesmas. A análise térmica foi realizada em um analisador termogravimétrico da marca Shimadzu modelo TGA-50, apresentado na Figura 29.

**Figura 29 – Analisador termogravimétrico**



**Fonte:** O próprio autor.

As amostras foram obtidas dos corpos de prova moldados em tubos de ensaio de 1 cm de diâmetro por 7,5 cm de altura, os quais foram moídos a partir do uso de martelo de borracha e não foram secos em estufa antes da análise. Para a análise, utilizou-se em média 17

mg de cada amostra, as quais sofreram aquecimento de 30°C à 900°C sob taxa de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>, em atmosfera de nitrogênio. As análises ocorreram nas idades de 7, 14 e 28 dias.

### 3.2.2.2 Análise Microestrutural no Microscópio Eletrônico de Varredura

A análise microestrutural foi realizada no Microscópio Eletrônico de Varredura em todas as argamassas estudadas, aos 7 e 28 dias de cura. As amostras utilizadas tinham dimensão de 10x10x10 mm, as quais foram extraídas dos corpos de prova de 10x10x130 mm. As amostras foram secas em estufa à temperatura de 70°C até atingirem constância de massa.

Esta análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Micro Análise – LMEN, da Universidade Estadual de Londrina – UEL, no Microscópio Eletrônico de Varredura modelo FEI Quanta 200. Sendo que as amostras foram cobertas com uma película de ouro para a aquisição de imagens de qualidade.

**Figura 30 – Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)**

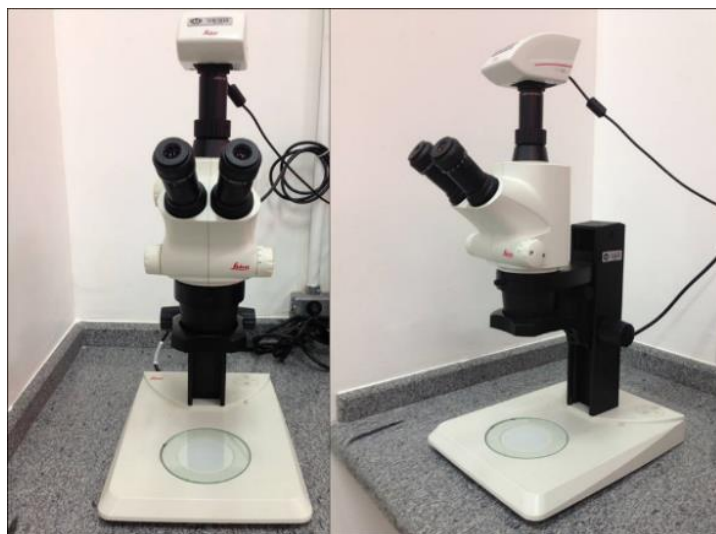


Fonte: O próprio autor.

### 3.2.2.3 Análise das trincas por meio de lupa

Para esta análise foi utilizada a Lupa Leica, apresentada na Figura 31, com ampliação de 40 vezes em amostras de 10x10x30mm, com a trinca induzida de 0,8 mm, conforme já apresentado na Figura 25. As trincas foram demarcadas para que sempre fosse analisado o mesmo local e para que houvesse o acompanhamento das mesmas ao longo do período de cura, que foi nas idades de 2, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.

**Figura 31 – Lupa Leica**



**Fonte:** O próprio autor.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo estão apresentados os resultados e discussões provenientes das campanhas experimentais realizadas.

### 4.1 PRIMEIRA CAMPANHA EXPERIMENTAL

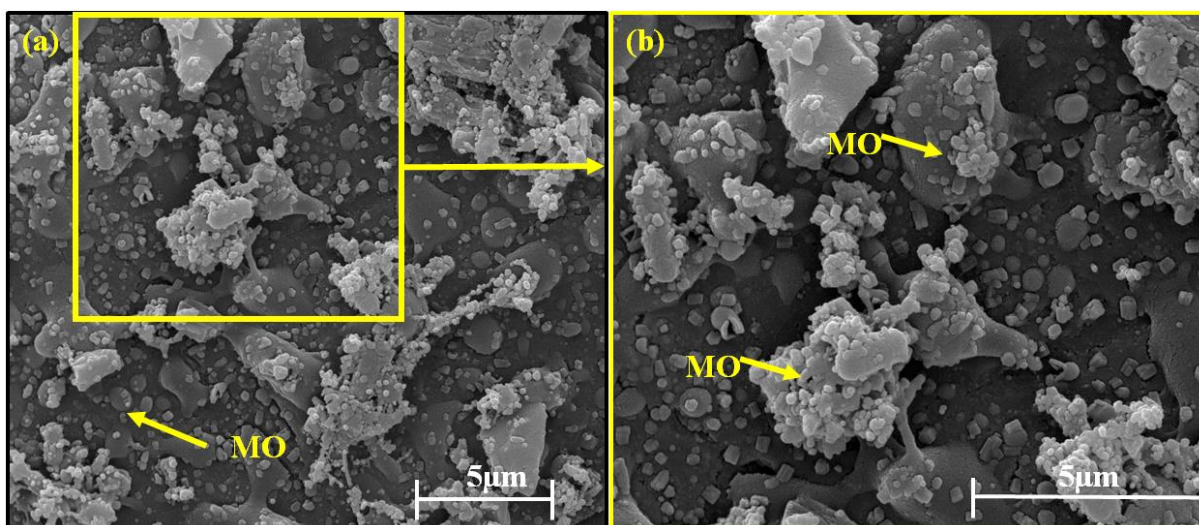
A primeira campanha experimental se ateve em entender como ocorre o processo de precipitação de  $\text{CaCO}_3$  por vias metabólicas bacterianas, portanto, estão apresentados na sequência os resultados dos estudos preliminares A e B, onde foram testadas a produção de biofilme, da enzima urease e a precipitação *in vitro* de  $\text{CaCO}_3$ .

#### 4.1.1 Produção de biofilme

A produção de biofilme foi testada após 48 horas de incubação, a partir da análise de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Quatro amostras foram avaliadas: o teste branco (apenas o meio de cultivo, para garantir que não houve contaminação), a bactéria *E. coli* HB101 (controle negativo do teste, pois não produz biofilme) e as bactérias *B. cereus* e *B. subtilis* AP91.

Na sequência estão as imagens obtidas por MEV de todas as amostras, para facilitar a visualização as setas estão indicando a matéria orgânica (MO) e o biofilme produzido pelas bactérias. Na Figura 32 estão apresentados os resultados do meio de cultivo sem o inóculo da bactéria, com aumentos de 12.000 e 20.000 x.

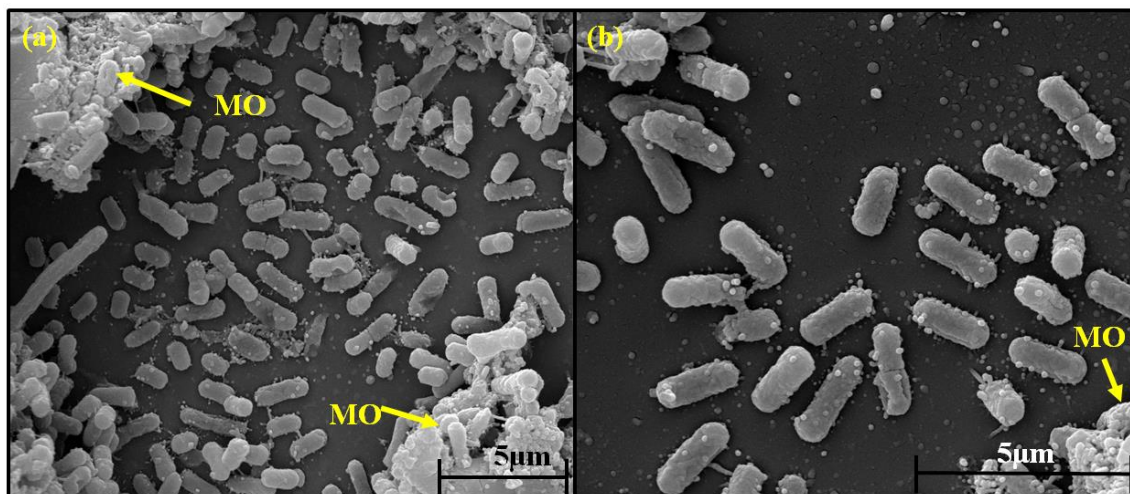
**Figura 32 – MEV apenas do meio de cultivo, com aumentos de (a) 12.000 x e (b) 20.000 x, com as setas apontando para a matéria orgânica (MO).**



Fonte: O próprio autor.

A partir da análise da Figura 32, pode-se observar que o experimento não foi contaminado, pois não foram visualizadas bactérias sobre a lamínula, apenas restos de matéria orgânica do meio de cultivo. Na sequência, estão apresentadas as imagens obtidas a partir do crescimento da bactéria *E. coli* HB101, com aumentos de 12.000 e 20.000 x.

**Figura 33 – MEV do inóculo da bactéria *E. coli* HB101, com aumentos de (a) 12.000 e (b) 20.000 x, com as setas apontando para a matéria orgânica (MO).**

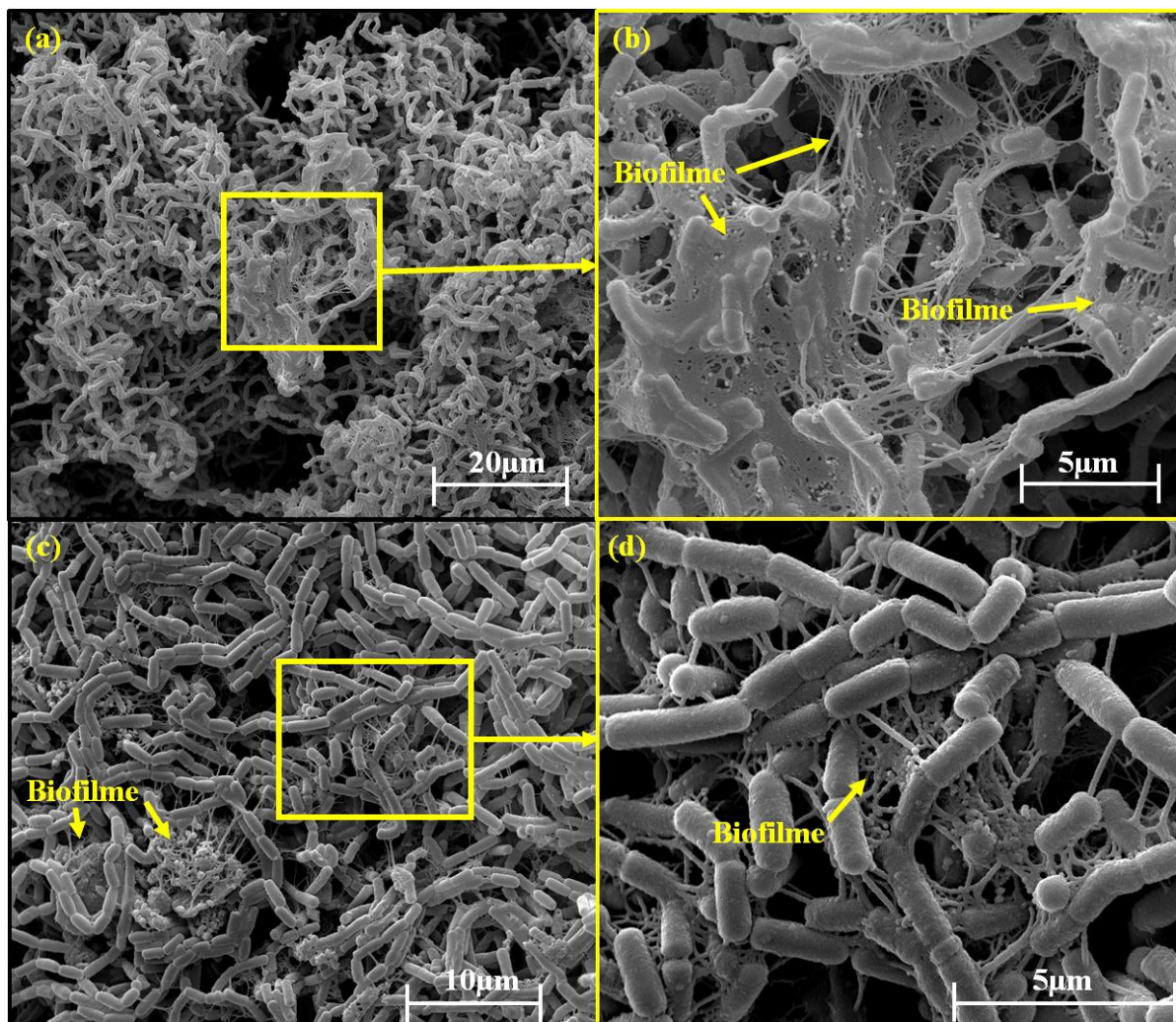


Fonte: O próprio autor.

Na Figura 33 pode-se visualizar que a bactéria *E. coli* HB101 não apresentou produção de biofilme, já que sob a lamínula haviam apenas as células bacterinas e restos de matéria orgânica, com a mesma morfologia do visualizado na Figura 32. Estes resultados eram previstos, já que a bactéria *E. coli* HB101 possui apenas o mínimo necessário para sua sobrevivência e era o controle negativo do teste.

Na sequência, a Figura 34 ilustra os resultados do MEV com o inóculo da bactéria *B. cereus* com aumentos de 3.000, 6.000, 12.000 e 20.000 x.

Figura 34 - MEV do inóculo da bactéria *B. cereus*, com aumentos de (a) 3.000, (b) 12.000, (c) 6.000 e (d) 20.000 x, com as setas apontando para o biofilme formado.

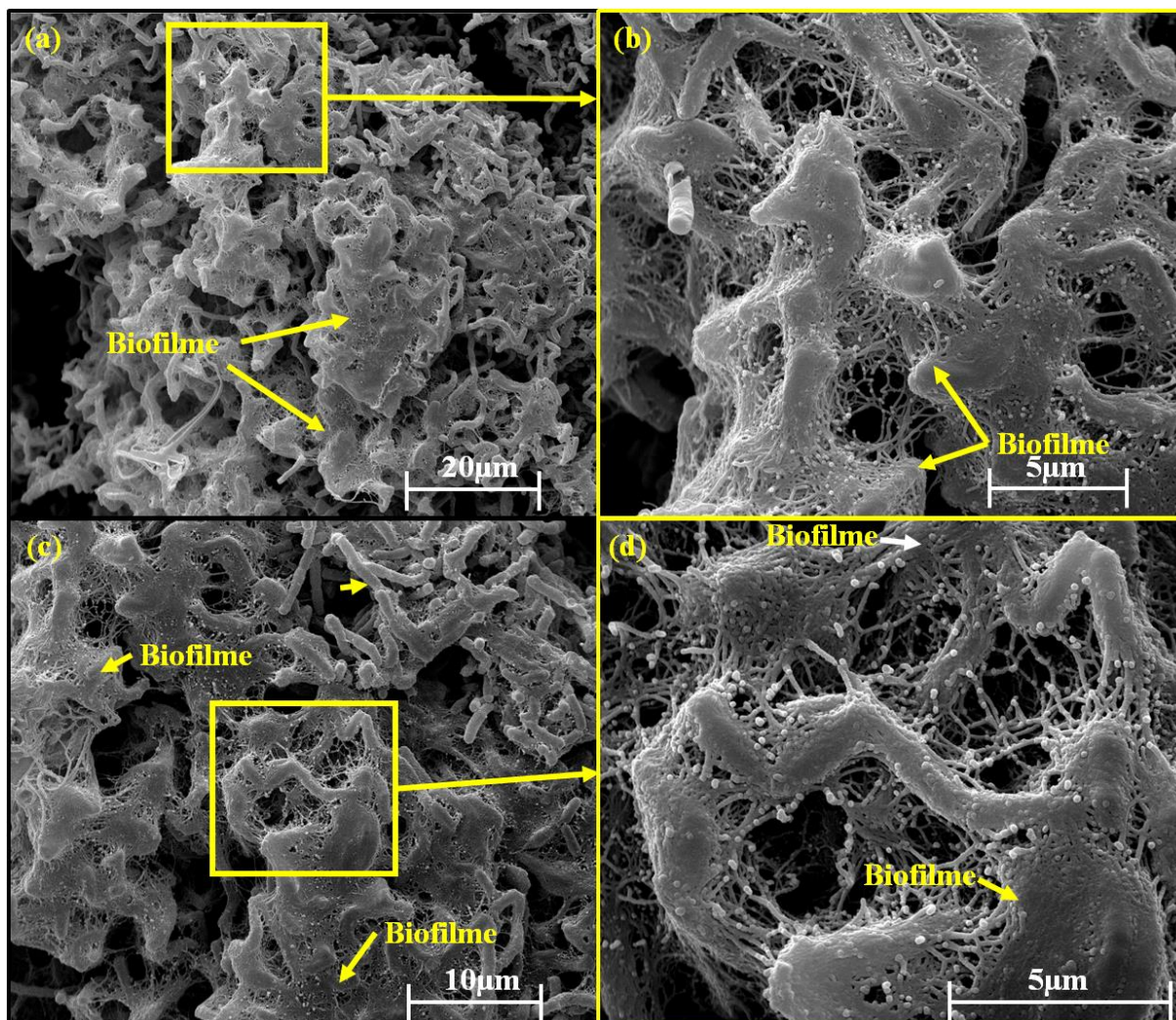


Fonte: O próprio autor.

A partir da análise da Figura 34, pode-se verificar que a bactéria *B. cereus* tem capacidade de produzir biofilme, sendo que foi possível visualizar locais com biofilmes mais densos, Figura 34(a e b), e outros ainda em formação Figura 34(c e d).

Por fim, na Figura 35 estão os resultados obtidos pelo crescimento da bactéria *B. subtilis* AP91, com aumentos de 3.000, 6.000, 12.000 e 20.000 x.

Figura 35 - MEV do inóculo da bactéria *B. subtilis* AP91 com ampliações de (a) 3.000, (b) 12.000, (c) 6.000 e (d) 20.000 x, com as setas apontando para o biofilme formado.



Fonte: O próprio autor.

Assim como a bactéria *B. cereus*, a *B. subtilis* apresentou produção de biofilme. Porém, pode-se observar que o biofilme formado pela *B. subtilis* envolveu grande parte das células, enquanto no formado pela *B. cereus* não, ainda sendo visível uma grande massa celular não envolta por biofilme, conforme o apresentado na Figura 34(c e d).

O biofilme formado pela bactéria *B. subtilis* é construído por uma matriz que contém EPS e proteínas (Branda *et al.*, 2006). A morfologia do biofilme formado pelo isolado *B. subtilis* AP91 foi semelhante ao apresentado por Branda *et al.* (2006), Priester *et al.* (2007), Bridier *et al.* (2013) e Pan *et al.* (2014). Além disso, pesquisas realizadas por Xu *et al.* (2013) indicam que a precipitação de cristais de  $\text{CaCO}_3$  em materiais cimentícios pode ocorrer tanto sobre o biofilme como no interior dos poros desses materiais. De acordo com Bäuerlein (2003)

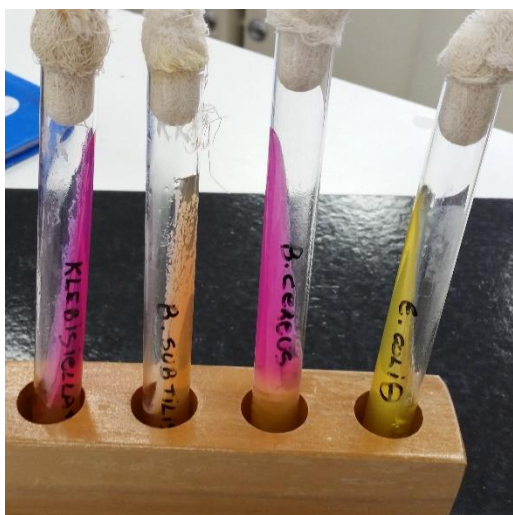
biofilmes e esporos dormentes podem atuar como locais de absorção de íons carbonato e de nucleação do  $\text{CaCO}_3$ .

#### 4.1.2 Produção da enzima urease

A produção da enzima urease foi efetuada a partir do meio ágar ureia de Christensen, no qual o resultado se dá por mudança de coloração. Se houver a produção da enzima, a coloração do meio muda para rosa e caso não houver, permanece amarelo.

O resultado deste ensaio está representado na Figura 36, onde o controle positivo foi a bactéria *Klebsiella penoumoniae*, produtora de urease e o controle negativo foi a bactéria *E. coli* HB101, não produtora da enzima. As bactérias testadas foram o *B. cereus* e o *B. subtilis* AP91.

**Figura 36 – Resultado teste urease**



Fonte: O próprio autor

A mudança da coloração para o rosa foi visível no meio do controle positivo, bactéria *Klebsiella*, e na *B. cereus*, acusando que estas duas bactérias produzem a enzima urease. O meio com a incubação da bactéria *E. coli* HB101 apresentou uma coloração amarela, evidenciando que não houve a produção da enzima, o que já era esperado. Porém, a bactéria *B. subtilis* AP91 ficou em uma coloração intermediária entre o rosa e o amarelo, apresentando um resultado inconclusivo.

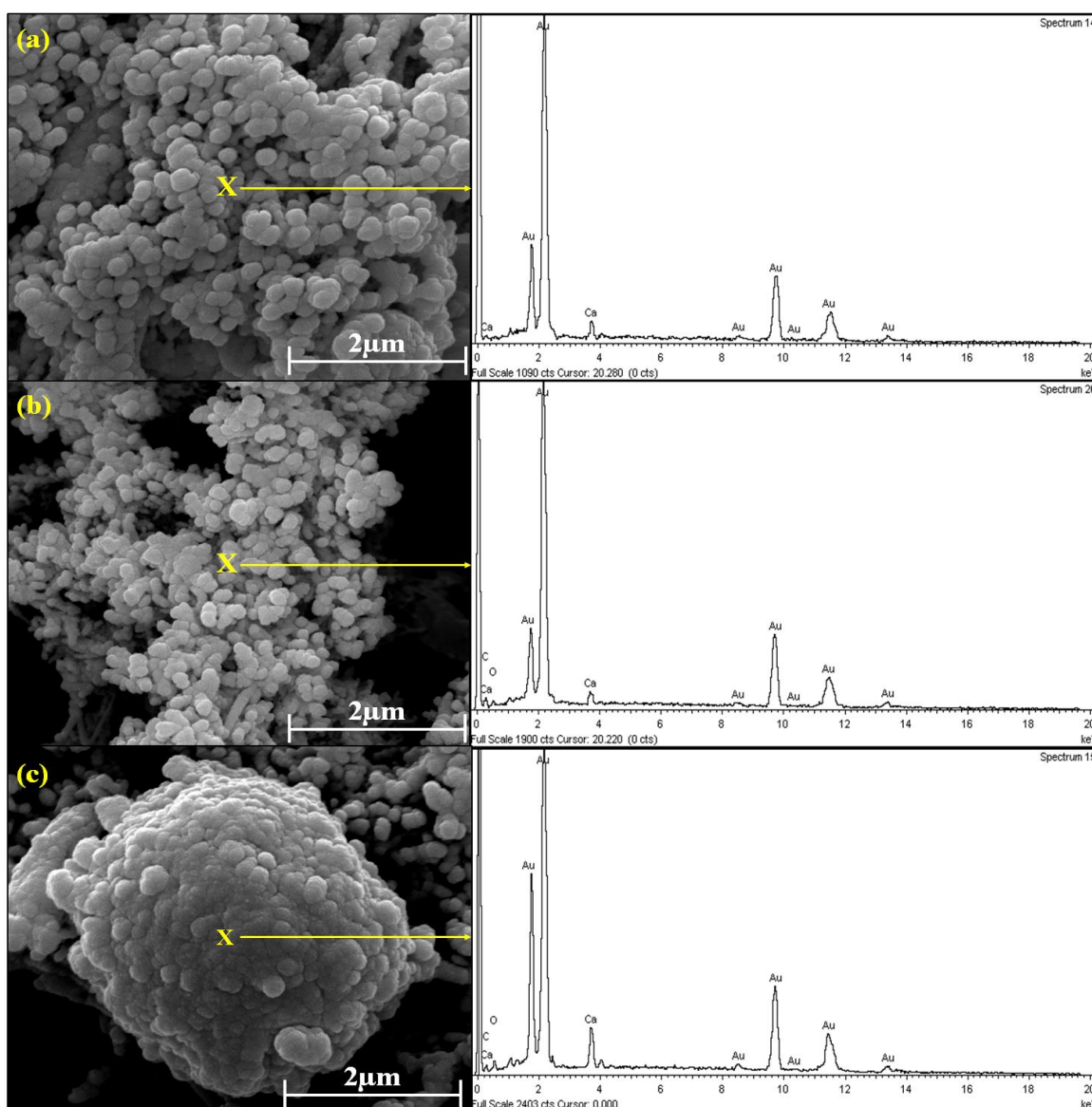
O ensaio foi repetido três vezes e também deixado por mais de 24 horas em estufa para o crescimento das células bacterianas, para verificar se a degradação da ureia por meio da enzima urease não era mais lenta na bactéria *B. subtilis* AP91. Porém a coloração do meio permaneceu com a mesma tonalidade em todos os experimentos.

Para tanto, partiu-se para última análise desta campanha experimental, a precipitação *in vitro* de  $\text{CaCO}_3$ , a partir de uma metodologia que simula o que ocorrerá quando as bactérias forem adicionadas aos materiais cimentícios, pela mudança de pH do meio.

#### 4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) do material precipitado

As imagens obtidas por MEV do meio B4 crescido por 7 dias com inóculo de *E. coli* HB101, *B. cereus* e *B. subtilis* AP91 podem ser visualizadas na Figura 37, juntamente com os espectros de EDS mostrando os elementos químicos presentes em cada amostra.

**Figura 37 – MEV com aumentos de 50.000x e espectros de EDS das culturas crescidas durante 7 dias de *E. coli* HB101 (a), *B. cereus* (b) e *B. subtilis* AP91 (c).**



Fonte: O próprio autor

Cabe salientar que os picos de ouro (Au) apresentados nos difratômetros são provenientes do tratamento de superfície realizado para aquisição das imagens. Normalmente os estudos apresentados na bibliografia analisam o EDS com um revestimento de carbono e após a obtenção dos difratômetros cobrem a amostra com ouro para aquisição de imagens de maior qualidade. Porém, apenas com o revestimento de carbono não é possível obter uma imagem de qualidade, impossibilitando o cruzamento de uma imagem de uma área específica com sua composição química obtida pelo EDS.

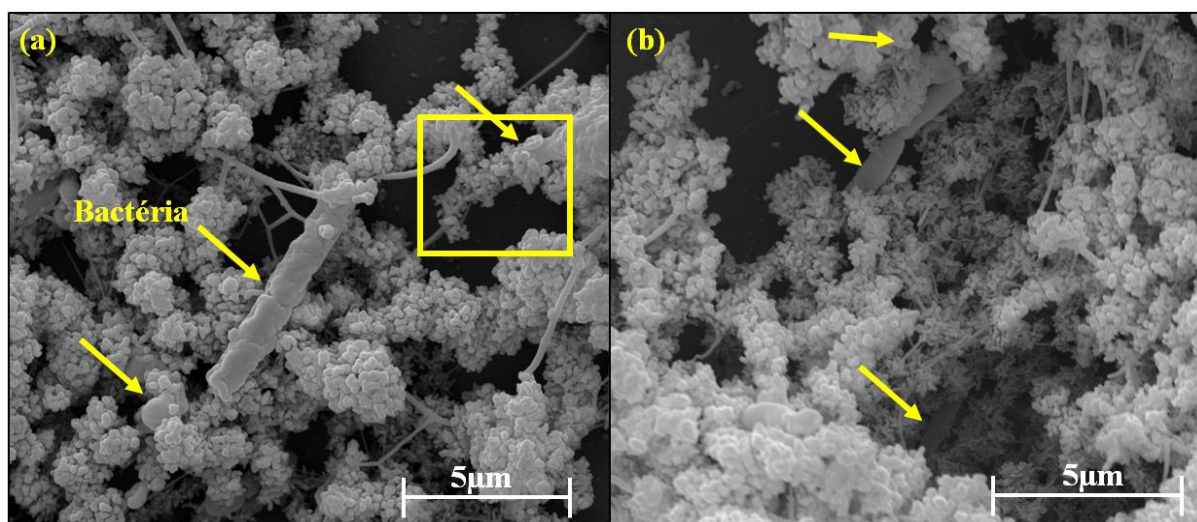
A partir da análise das imagens juntamente com os difratômetros, pode-se observar que na amostra contendo a bactéria *E. coli* HB101 o pico de cálcio (Ca) foi muito pequeno, quando comparado ao *B. cereus* e *B. subtilis* AP91. Apontando que o cálcio encontrado naquela amostra não era de cristais de  $\text{CaCO}_3$  e sim do acetato de cálcio, presente no meio de cultivo B4.

O maior e mais definido cristal foi encontrado a partir da precipitação da bactéria *B. subtilis* AP91 (Figura 37c). Observou-se ainda que a morfologia deste material é semelhante ao precipitado do *B. cereus*, porém o precipitado pelo *B. subtilis* estava agrupado em uma única estrutura mais densa, enquanto no *B. cereus*, estava em uma rede de cristais, da mesma maneira que o apresentado por Braissant *et al.* (2003).

A morfologia dos cristais precipitados pelas bactérias *B. subtilis* AP91 e *B. cereus* é semelhante aos resultados obtidos por Park *et al.* (2012) (Figura 13 item 2.2.3.1), com estruturas arredondadas. Porém, na pesquisa, observou-se visualmente que o volume dos cristais precipitados foi maior do que no apresentado por Park *et al.* (2012), fato este que pode ser justificado pela diferença de tempo entre as análises, onde Park *et al.* (2012) cultivou a bactéria no meio B4 por 5 dias, para efetuar a análise e na pesquisa este tempo foi de 7 dias.

Além disso, pode-se observar na Figura 38 que as próprias células bacterianas atuam como local de nucleação dos cristais, corroborando com o estudo realizado por Hammes e Verstraete (2002) e De Mynck *et al.* (2010).

Figura 38 – MEV das amostras contendo *B. cereus* (a) e de *B. subtilis*, com ampliação de 15.000 x, com as setas apontando para as células bacterianas.



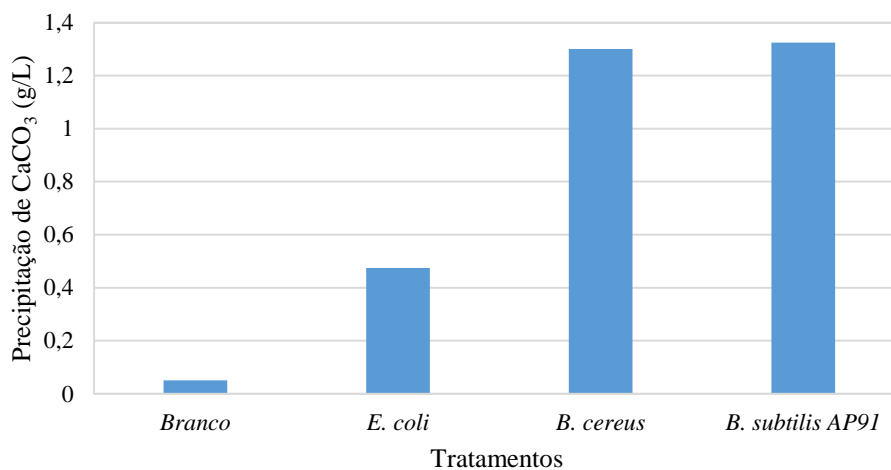
Fonte: O próprio autor.

O quadrado destacado da Figura 38(a) ilustra que a bactéria está praticamente toda encapsulada pelos cristais de  $\text{CaCO}_3$ . Além disso, pode-se observar que as estruturas indicadas pelas setas tem o formato das bactérias, as quais podem estar completamente envoltas pelo  $\text{CaCO}_3$ .

#### 4.1.4 Quantificação dos cristais de $\text{CaCO}_3$

O resultado da quantificação média de  $\text{CaCO}_3$  está representado no Gráfico 11, onde foram analisadas 6 amostras de cada bactéria.

Gráfico 11 – Precipitação média de  $\text{CaCO}_3$



Fonte: O próprio autor.

Pode-se observar que o teste branco apresentou pouco material retido no filtro, 0,100 g/mL, o que pode ser resultado de retenção de matéria orgânica. Na sequência a bactéria a *E. coli* HB101 reteve 0,475 g/mL, a qual também não é produtora de CaCO<sub>3</sub>, resultado proveniente da retenção de células e matéria orgânica.

As bactérias *B. cereus* e *B. subtilis* AP 91, que são produtoras de CaCO<sub>3</sub>, obtiveram maior quantidade de material retido no filtro, proveniente da produção de CaCO<sub>3</sub>. A bactéria *B. cereus* produziu 1,291 g/mL e a bactéria *B. subtilis* 1,325 g de CaCO<sub>3</sub> para cada mL de meio de cultivo.

Para esta etapa do experimento, foi realizado um delineamento estatístico inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos (referência sem bactéria e as bactérias *E. coli* HB101, *B. cereus* e *B. subtilis* AP91) e 6 repetições, utilizando o *software* *sisvar*. A análise de variância está representada no Quadro 9.

**Quadro 9 – Análise de Variância**

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	6,4125	2,1375	23,0980	0,0000
Erro	20	1,8508	0,0925		
Total corrigido	23	8,2633			
CV (%)	37,25				
Média Geral	0,8167		Número de observações:24		

Fonte: O próprio autor.

Um coeficiente de variação (CV) alto era esperado, pois a análise foi realizada com duas bactérias produtoras de cristais de CaCO<sub>3</sub>, uma bactéria não produtora e apenas o meio de cultivo como referência.

No Quadro 10 está representado o resultado do teste Tukey, confirmando que a bactéria *E. coli* HB101 não é produtora de cristais, pois não diferiu significativamente da referência (a nível de 1% de probabilidade).

**Quadro 10 – Resultado do teste Tukey**

Tratamento	Médias	Teste Tukey
Referência	0,100	b
<i>E. coli</i> HB101	0,550	b
<i>B. cereus</i>	1,292	a
<i>B. subtilis</i> AP91	1,325	a

Fonte: O próprio autor.

Pode-se observar que em média a bactéria *B. subtilis* AP91 precipitou mais  $\text{CaCO}_3$  do que a *B. cereus*, mas elas não diferiram significativamente a nível de 1% de probabilidade de acordo com o teste Tukey. Porém, ambas diferiram com significância da referência e da bactéria *E. coli*, corroborando com Ghosh *et al.* (2005), Park *et al.* (2012), Pei *et al.* (2013) e Al-Salloum *et al.* (2016), que demonstraram que a bactéria *E. coli* não produz cristais de  $\text{CaCO}_3$ .

A bactéria escolhida então para ser adicionada à argamassa da segunda campanha experimental foi a *B. subtilis* AP91, pois a mesma apresentou cristais maiores e mais densos na análise por MEV quando essa bactéria foi utilizada, além de apresentar um maior pico de cálcio.

## 4.2 SEGUNDA CAMPANHA EXPERIMENTAL

Neste item são apresentados os resultados e discussões da segunda campanha experimental. Nesta etapa foram feitas a caracterização do agregado miúdo, ensaios no estado fresco e endurecido das argamassas estudadas.

### 4.2.1 Caracterização do agregado miúdo

Foi realizada a análise granulométrica do agregado miúdo utilizado para a confecção das argamassas, o resultado está apresentado na Tabela 1 e na sequência está plotada a curva granulométrica do agregado em questão, assim como os limites estabelecidos pela norma 7211/2009.

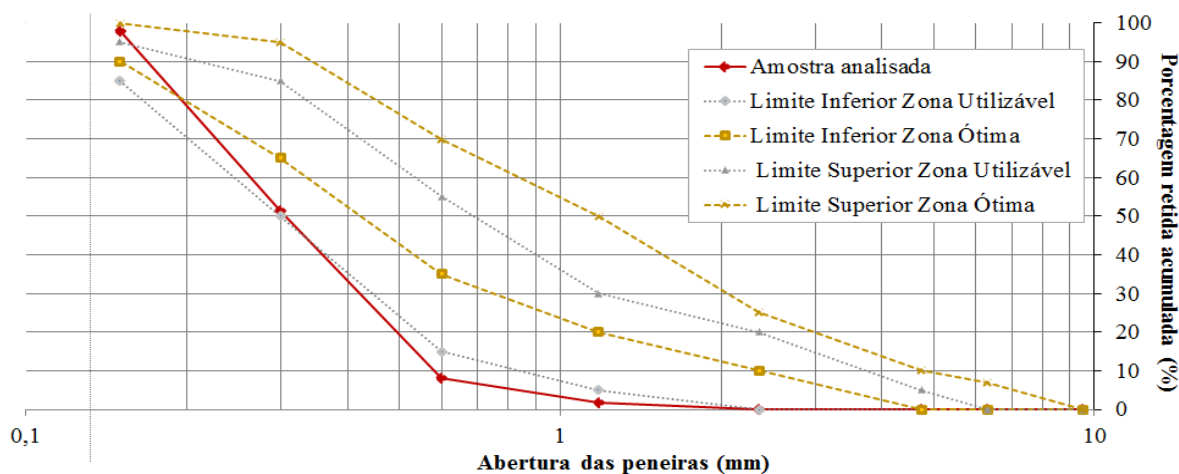
Tabela 1 – Composição granulométrica da areia

Abertura da malha das peneiras (mm)	Massa retida (g)	Percentual retido (%)	Percentual retido acumulado (%)
4,75	0,000	0	0
2,36	0,000	0	0
1,18	0,016	2	2
0,6	0,064	6	8
0,3	0,434	43	51
0,15	0,464	46	98
Fundo	0,020	2	100

Fonte: O próprio autor.

De acordo com os resultados da Tabela 1, pode-se verificar que o módulo de finura da areia é 1,51 e a dimensão máxima característica é de 1,18 mm, o que a caracteriza como areia fina. Além do ensaio de granulometria, foram feitos ensaios de massa específica e massa unitária compactada, os resultados obtidos foram 2,604 e 1,570  $\text{g/cm}^3$ , respectivamente.

Gráfico 12 – Curva granulométrica da areia



Fonte: O próprio autor.

A partir da análise da curva granulométrica, verificou-se que a areia ensaiada está fora da zona utilizável, estabelecida pela norma.

#### 4.2.2 Propriedades da argamassa no estado fresco

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da massa específica e do índice de consistência das argamassas no estado fresco.

**Tabela 2 – Resultados dos ensaios das argamassas em fresco**

Argamassas	Massa específica (g/cm <sup>3</sup> )	Índice de consistência (mm)
ARG_REF	1,63	231
ARG_CTF	1,73	230
ARG_ESP_IM	1,64	232
ARG_ESP_AM	1,70	238

Fonte: O próprio autor.

Pode-se observar que em ambas as análises houve pouca variação nas quatro argamassas, sendo que para a massa específica a maior variação foi de 0,1 g/cm<sup>3</sup> e 8 mm no índice de consistência.

Cabe lembrar que no estado fresco não haviam diferenças entre as amostras ARG\_REF e ARG\_ESP\_IM, pois a adição dos esporos bacterianos nessa argamassa foi por imersão durante o período de cura.

Já a argamassa ARG\_CTF e ARG\_ESP\_AM, que continham adição de solução tampão no lugar da água potável, apresentaram uma variação maior quando comparadas com as argamassas sem essa solução.

### 4.2.3 Propriedades da argamassa no estado endurecido

#### 4.2.3.1 Resistência à compressão

Os resultados obtidos no ensaio de resistência à compressão para os 7 e 28 dias podem ser visualizados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente, sendo que cada uma contém os valores das resistências individuais de cada corpo de prova, a resistência média, o desvio padrão e o desvio máximo relativo de cada argamassa nas idades analisadas.

O desvio relativo máximo foi calculado de acordo com a NBR 7215/1997, sendo que este desvio é calculado dividindo-se o valor absoluto da diferença entre a resistência média e a resistência individual que mais se afaste desta média, para mais ou para menos, pela resistência média e multiplicando este quociente por 100, arredondando-se a porcentagem obtida ao décimo mais próximo. Quando o desvio relativo máximo superou 6%, foi calculado uma nova média, um novo desvio padrão e outro desvio relativo máximo, desconsiderado o valor discrepante, identificando o valor com um asterisco.

**Tabela 3 – Resultados de resistência à compressão aos 7 dias**

Argamassas	Resistência (MPa)	Resistência Média (MPa)	Desvio Padrão (MPa)	Desvio máximo Relativo (%)	Coefficiente de Variação (%)
ARG_REF	9,56	9,45	0,43	5,8	4,5%
	9,93				
	9,40				
	7,97 *				
	8,90				
ARG_CTF	9,97 *	9,01	0,38	5,3	4,2%
	9,40				
	8,91				
	9,19				
	8,53				
ARG_ESP_IM	8,80	8,89	0,48	5,8	5,4%
	12,89 *				
	9,52				
	8,37				
	8,85				
ARG_ESP_AM	14,57	14,45	0,45	3,9	3,1%
	15,01				
	14,29				
	10,87 *				
	13,95				

\* Valor excluído para repetição do cálculo do desvio máximo relativo, conforme prevê a NBR 7215/1997.

**Fonte:** O próprio autor.

Observou-se que aos 7 dias a única argamassa que teve um aumento de resistência à compressão em relação à referência foi a ARG\_ESP\_AM e esse aumento foi de

53,0%, enquanto a ARG\_CTF e ARG\_ESP\_IM apresentaram diminuição da resistência em proporções de 4,7 e 5,9%, respectivamente.

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da resistência à compressão aos 28 dias de cura.

Tabela 4 – Resultados de resistência à compressão aos 28 dias

Argamassas	Resistência (MPa)	Resistência Média (MPa)	Desvio Padrão (MPa)	Desvio máximo Relativo (%)	Coefficiente de Variação (%)
ARG_REF	14,90	14,87	0,54	4,9	3,6%
	15,60				
	14,34				
	14,62				
	16,25 *				
ARG_CTF	12,94	12,28	0,92	5,4	7,5%
	11,20				
	18,66 *				
	11,82				
	13,15				
ARG_ESP_IM	16,36	15,98	0,50	4,3	3,1%
	16,36				
	16,47				
	15,41				
	15,29				
ARG_ESP_AM	19,89	19,52	0,71	5,0	3,7%
	18,54				
	20,39				
	19,10				
	19,66				

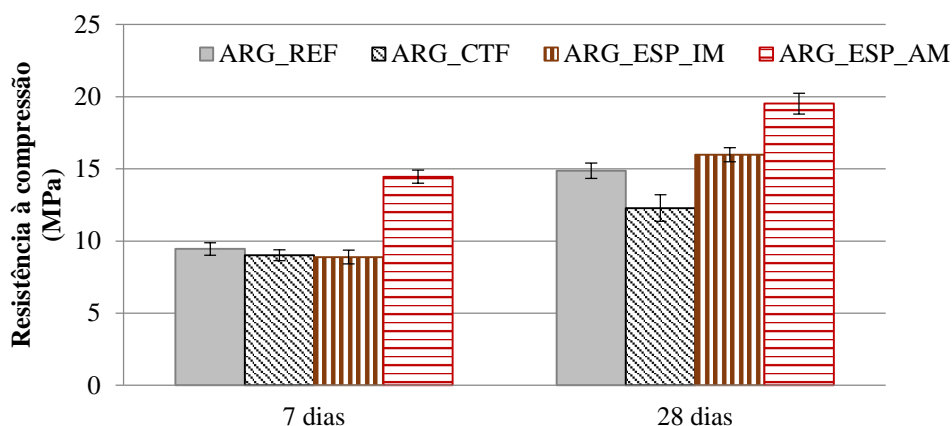
\* Valor excluído para repetição do cálculo do desvio máximo relativo, conforme prevê a NBR 7215/1997.

Fonte: O próprio autor.

De acordo com os resultados de resistência à compressão, pode-se observar que aos 28 dias, apenas a ARG\_CTF teve uma redução da resistência quando comparada com a referência, em 17,4%. Enquanto as duas argamassas com adição dos esporos bacterianos (ARG\_ESP\_IM e ARG\_ESP\_AM) apresentaram um melhor desempenho, com aumentos de 7,5% e 31,3%, respectivamente.

Para a melhor visualização dos resultados, no Gráfico 13 estão apresentados os resultados de resistência à compressão para as idades de 7 e 28 dias, as barras de erro representam os desvios padrão de cada argamassa.

**Gráfico 13 – Resultados de resistência à compressão aos 7 e 28 dias**



Fonte: O próprio autor.

Com a análise dos resultados foi verificado que todas as argamassas apresentaram um aumento da resistência à compressão dos 7 para os 28 dias, o que era esperado. Quando foi adicionada a solução tampão fosfato na argamassa (ARG\_CTF) verificou-se uma diminuição da resistência à compressão, quando comparada a ARG\_REF.

Além disso, pode-se observar que as maiores resistências foram obtidas na ARG\_ESP\_AM, fato este, que pode ter ocorrido pela maior efetividade da precipitação de  $\text{CaCO}_3$  mediante a adição de esporos da bactéria *B. subtilis* AP91 na água de amassamento da argamassa.

Cabe salientar que esses resultados corroboram com o apresentado na literatura por Ghosh *et al.* (2009), Reddy *et al.* (2010), Chahal *et al.* (2012) e Chahal e Siddique (2013), os quais adicionaram a concentração de  $10^5$  células/mL de diferentes bactérias e obtiveram um aumento na resistência à compressão em todas as idades analisadas.

Além disso, a resistência da referência (ARG\_REF) aos 28 dias foi um pouco menor do que os resultados obtidos por Ghosh *et al.* (2009) e Abo-El-Enien *et al.* (2013), que também analisaram uma argamassa de traço 1:3 e obtiveram resistências de 26 e 20 MPa, com relações a/c de 0,40 e 0,46, respectivamente. Essa diferença de resistência provavelmente se deu pelo aumento da relação a/c na pesquisa, que foi de 0,63 e pela diferença no tipo de cimento utilizado.

#### 4.2.3.2 Resistência à tração por compressão diametral

Os resultados obtidos no ensaio de resistência à tração por compressão diametral aos 7 e 28 dias estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Cada uma das

tabelas contém os valores das resistências individuais de cada corpo de prova, a resistência média, desvio padrão de cada argamassa e seu coeficiente de variação.

**Tabela 5 – Resistência à tração por compressão diametral aos 7 dias**

Argamassas	Resistência (MPa)	Resistência média (MPa)	Desvio Padrão (MPa)	CV (%)
ARG_REF	1,11 1,05	1,08	0,04	4,04%
ARG_CTF	1,26 1,14	1,20	0,09	7,25%
ARG_ESP_IM	1,23 1,19	1,21	0,03	2,70%
ARG_ESP_AM	1,46 1,37	1,42	0,07	4,61%

Fonte: O próprio autor.

Observou-se que aos 7 dias todas as argamassas apresentaram um aumento da resistência à tração por compressão diametral quando comparadas com a referência, sendo que os aumentos foram de 11,4, 12,1, 31,4% para as argamassas ARG\_CTF, ARG\_ESP\_IM e ARG\_ESP\_AM, respectivamente.

Na Tabela 6 estão exibidos os resultados da resistência à tração por compressão diametral aos 28 dias de cura.

**Tabela 6 - Resistência à tração por compressão diametral aos 28 dias**

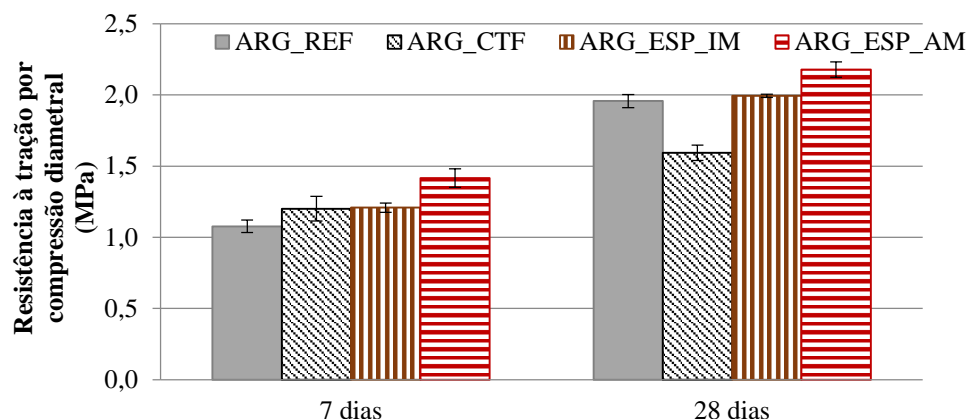
Argamassas	Resistência (MPa)	Resistência média (MPa)	Desvio Padrão (MPa)	CV (%)
ARG_REF	1,92 1,99	1,96	0,05	2,39%
ARG_CTF	1,55 1,63	1,59	0,05	3,42%
ARG_ESP_IM	1,99 2,00	1,99	0,01	0,55%
ARG_ESP_AM	2,14 2,22	2,18	0,05	2,50%

Fonte: O próprio autor.

Aos 28 dias o comportamento foi o mesmo do que o verificado na resistência à compressão, onde apenas a argamassa ARG\_CTF apresentou uma redução da resistência à compressão quando comparada com a referência, de 18,6%. Os aumentos da ARG\_ESP\_IM e ARG\_ESP\_AM foram de 1,8 e 11,3%, respectivamente.

Para a melhor visualização dos resultados, no Gráfico 14 estão apresentados os resultados de resistência à tração por compressão diametral, tanto aos 7 quanto aos 28 dias para todas as argamassas, onde as barras de erro representam os desvios padrão.

**Gráfico 14 - Resistência à tração por compressão diametral aos 7 e 28 dias**



Fonte: O próprio autor.

Cabe salientar, que os resultados da resistência à tração por compressão diametral em ambas as idades retrataram as mesmas tendências que os resultados da resistência à compressão, tendo seus valores correspondentes em média a 10% da resistência à compressão, corroborando com o apresentado na bibliografia.

#### 4.2.3.3 Módulo de Elasticidade Dinâmico

O módulo de elasticidade foi calculado a partir da velocidade de propagação da onda ultrassônica, a partir de transmissão direta, através da equação descrita na NBR 15630/2008. Para este ensaio, foram utilizados quatro corpos de prova de cada argamassa. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 7 e 8, sendo que cada uma contém as velocidades de propagação da onda ultrassônica, a massa específica, o módulo de elasticidade, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) de cada argamassa nas idades analisadas.

**Tabela 7 – Módulo de Elasticidade Dinâmico aos 7 dias**

Argamassas	Velocidade (m/s)	Massa específica (g/cm <sup>3</sup> )	Módulo de Elasticidade (GPa)	Módulo de Elasticidade Médio (GPa)	Desvio Padrão (GPa)	CV (%)
ARG_REF	3204	2,1	19,5	19,6	0,60	3,0%
	3279	2,1	20,2			
	3204	2,0	18,8			
	3271	2,0	19,9			
ARG_CTF	3447	2,0	21,6	21,0	1,02	4,8%
	3447	2,1	22,1			
	3297	2,0	20,1			
	3297	2,1	20,3			
ARG_ESP_IM	3394	2,1	21,8	21,1	0,70	3,3%
	3358	2,1	21,5			
	3333	2,1	20,9			
	3262	2,1	20,2			
ARG_ESP_AM	3514	2,0	22,8	22,0	1,00	4,5%
	3485	2,0	21,9			
	3485	2,1	22,6			
	3358	2,0	20,6			

Fonte: O próprio autor.

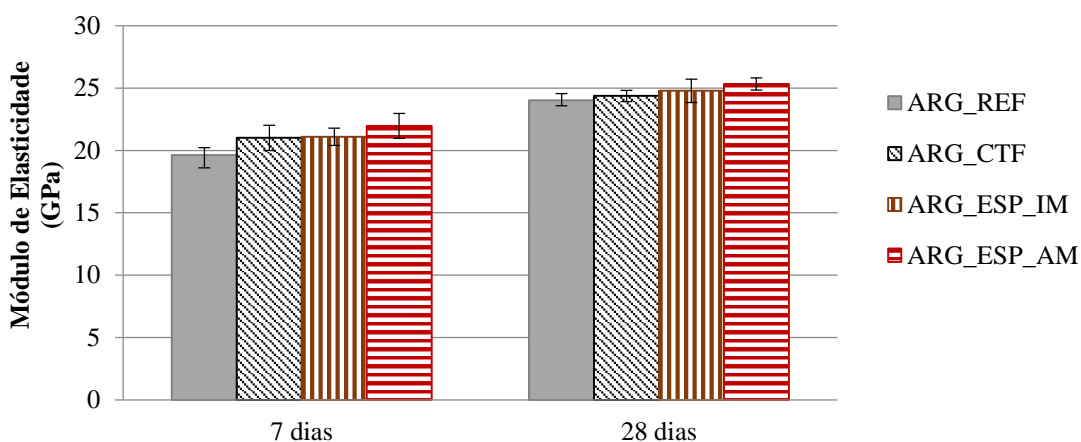
**Tabela 8 - Módulo de Elasticidade Dinâmico das argamassas aos 28 dias**

Argamassas	Velocidade (m/s)	Massa específica (g/cm <sup>3</sup> )	Módulo de Elasticidade (GPa)	Módulo de Elasticidade Médio (GPa)	Desvio Padrão (GPa)	CV (%)
ARG_REF	3591	2,1	24,6	24,0	0,54	2,2%
	3574	2,1	24,2			
	3552	2,0	23,3			
	3574	2,1	24,0			
ARG_CTF	3630	2,0	24,2	24,4	0,44	1,8%
	3630	2,1	25,0			
	3591	2,1	24,3			
	3583	2,1	24,0			
ARG_ESP_IM	3661	2,1	25,6	24,8	0,93	3,7%
	3609	2,0	23,8			
	3661	2,1	25,5			
	3629	2,0	24,2			
ARG_ESP_AM	3655	2,1	25,1	25,3	0,49	1,9%
	3704	2,1	26,1			
	3655	2,1	25,1			
	3655	2,1	25,0			

Fonte: O próprio autor.

No Gráfico 15 estão apresentados os módulos de elasticidade médios das argamassas, onde as barras de erros representam os desvios padrão.

**Gráfico 15 – Módulo de elasticidade dinâmico aos 7 e 28 dias**



Fonte: O próprio autor.

Verificou-se que houve um pequeno aumento gradativo no módulo de elasticidade das argamassas quando a elas foram adicionadas a solução tampão (ARG\_CTF) e também com a adição dos esporos bacterianos por imersão (ARG\_ESP\_IM) e na água de amassamento (ARG\_ESP\_AM). Esses aumentos foram de 7,1, 7,5 e 11,9% para 7 dias de cura, respectivamente, quando comparados com a referência. Já os 28 dias, os aumentos foram menores, na proporção de 1,4, 3,1 e 5,4%, para as argamassas ARG\_CTF, ARG\_ESP\_IM e ARG\_ESP\_AM, respectivamente. Cabe salientar ainda, que as argamassas com os maiores módulos de elasticidade corresponderam também as maiores resistências, tanto à tração quanto à compressão.

#### 4.2.3.4 Absorção de água e índice de vazios

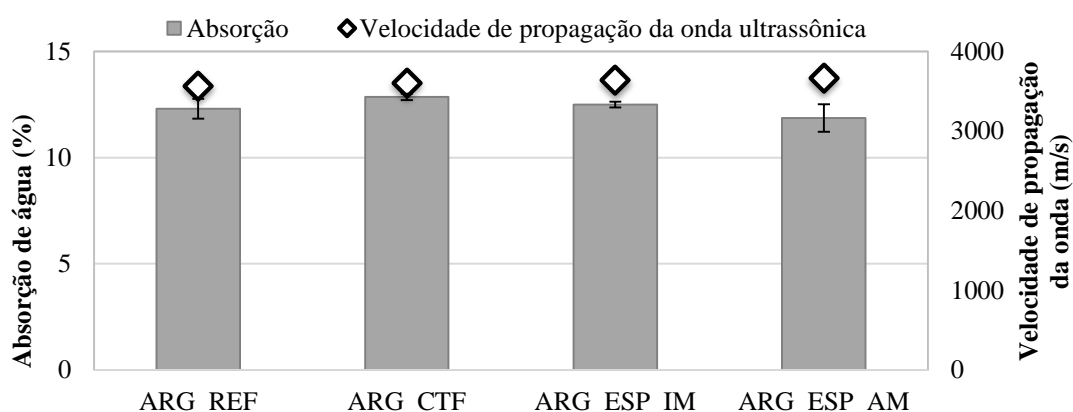
Os ensaios de absorção de água e índice de vazios foram feitos com os mesmos corpos de prova, sendo que foram utilizadas três repetições para cada argamassa, conforme prevê a NBR 9778/2009. Os resultados obtidos no ensaio absorção de água estão representados na Tabela 9, cabe salientar que os corpos de prova foram levados à fervura.

**Tabela 9 – Absorção de água aos 28 dias**

Argamassas	Absorção de água (%)	Absorção de água média (%)	Desvio Padrão (%)	CV (%)
ARG_REF	11,76	12,30	0,47	3,8
	12,50			
	12,64			
ARG_CTF	12,77	12,87	0,15	1,2
	13,04			
	12,79			
ARG_ESP_IM	12,64	12,50	0,14	1,1
	12,36			
	12,50			
ARG_ESP_AM	11,11	11,87	0,66	5,5
	12,21			
	12,28			

Fonte: O próprio autor.

No Gráfico 16 podem ser visualizados os resultados de absorção de água médio dos corpos de prova aos 28 dias, assim como os pontos referentes a velocidade de propagação da onda ultrassônica, afim de se verificar a relação entre essas duas análises.

**Gráfico 16 – Absorção de água aos 28 dias de cura**

Fonte: O próprio autor.

Foi verificado um aumento na absorção de água de 4,6 e 1,6% nas argamassas ARG\_CTF e ARG\_ESP\_IM. Porém a ARG\_ESP\_AM apresentou uma diminuição da absorção de água em 3,5%, quando comparada com a referência. Tal resultado pode ser consequência do fechamento de poros nesta argamassa, o que corrobora com os resultados de resistência à compressão e resistência à tração por compressão diametral. A velocidade de propagação da onda ultrassônica também valida estes dados, onde a maior velocidade de propagação de onda ultrassônica foi obtida nas argamassas com adição de esporos de *B. subtilis* AP91 na água de amassamento (ARG\_ESP\_AM).

Segundo Mehta e Monteiro (2014) quanto menor a taxa de absorção de água maior é a durabilidade do material, principalmente quando exposto a ambientes agressivos, pois os íons agressivos terão dificuldade de penetrar nos materiais cimentícios. Além disso, pesquisas indicam que os valores e absorção de água diminuem com a redução da relação a/c, o aumento no tempo de cura e no grau de hidratação.

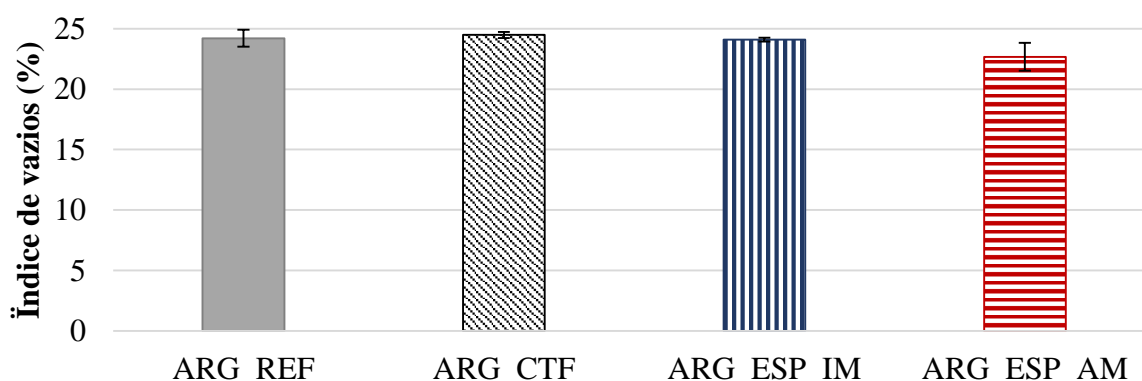
Na Tabela 10 e no Gráfico 17 estão apresentados estes resultados do índice de vazios aos 28 dias.

Tabela 10 – Índice de vazios aos 28 dias

Argamassas	Índice de vazios (%)	Índice de vazios médio (%)	Desvio Padrão (%)	CV (%)
ARG_REF	23,40	24,20	0,70	2,90
	24,49			
	24,72			
ARG_CTF	24,24	24,48	0,25	1,03
	24,74			
	24,44			
ARG_ESP_IM	24,18	24,09	0,15	0,63
	23,91			
	24,18			
ARG_ESP_AM	21,35	22,67	1,15	5,05
	23,33			
	23,33			

Fonte: O próprio autor.

Gráfico 17 – Índice de vazios aos 28 dias



Fonte: O próprio autor.

Quanto ao índice de vazios, observou-se uma tendência semelhante aos resultados de absorção de água, onde houve um aumento no índice de vazios de 1,1% na argamassa com tampão fosfato (ARG\_CTF) e a diminuição do índice de vazios nas argamassas com adição de bactéria (ARG\_ESP\_IM e ARG\_ESP\_AM) de 0,5 e 6,3%, respectivamente.

Observou-se que a ARG\_ESP\_IM apresentou pequena diferença em relação a referência, podendo este valor não ser significativo estatisticamente.

Os resultados referentes a absorção de água e índice de vazios podem apresentar um indicativo da porosidade, observou-se nestes resultados que a adição de esporos de *B. subtilis* AP91 promoveu uma diminuição mais significativa quando adicionados na água de amassamento das argamassas (ARG\_ESP\_AM). Esses resultados corroboram com o apresentado na literatura por Chahal *et al.* (2012) e Chahal e Siddique (2013), com a mesma concentração de  $10^5$  células/mL.

#### 4.2.3.5 Porosimetria por microtomografia computadorizada de raios-X ( $\mu$ -CT)

Os resultados da porosidade total dos corpos de prova de 10x10x100 mm estão apresentadas na Tabela 11, sendo que a resolução utilizada foi de 14  $\mu$ m, considerando as bordas das amostras.

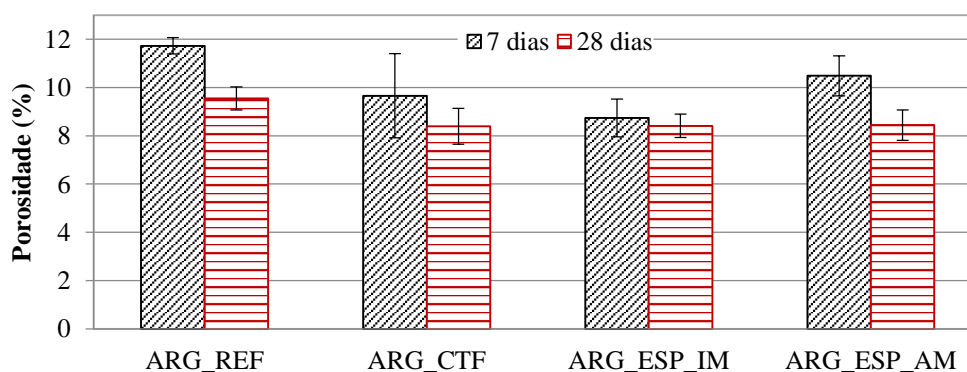
**Tabela 11 – Porosidade total por  $\mu$ -CT nos corpos de prova de 10x10x100mm, com resolução de 14  $\mu$ m**

Amostra	Porosidade total aos 7 dias (%)	Desvio Padrão (%)	Porosidade total aos 28 dias (%)	Desvio Padrão (%)
ARG_REF	11,42	0,34	9,55	0,20
ARG_CTF	9,66	1,74	8,39	0,74
ARG_ESP_IM	8,74	0,78	8,41	0,48
ARG_ESP_AM	10,48	0,83	8,44	0,63

Fonte: O próprio autor.

No Gráfico 18 estão apresentados os resultados da porosidade total das amostras aos 7 e 28 dias.

**Gráfico 18 – Porosidade total aos 7 e 28 dias**

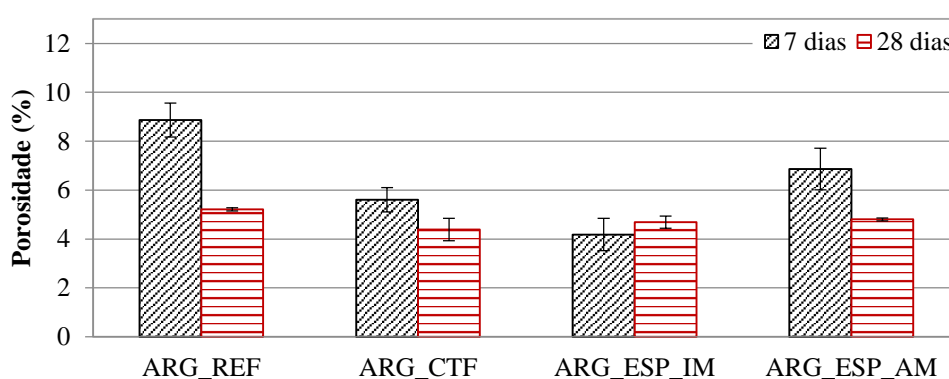


Fonte: O próprio autor.

Observou-se que houve uma diminuição da porosidade total de todas as amostras, dos 7 para os 28 dias. A maior redução foi de 2,04% na ARG\_ESP\_AM, seguida da ARG\_REF, com 1,87%, a ARG\_CTF, com 1,27% e a ARG\_ESP\_IM com 0,33%. Porém, observando os desvios padrão, essa diminuição foi apenas significativa nas amostras ARG\_REF e ARG\_ESP\_AM.

A porosidade total das amostras no ensaio de microtomografia é resultado do somatório da porosidade aberta e fechada das mesmas. No Gráfico 19 está apresentada a porosidade aberta aos 7 e 28 dias de todas as amostras.

Gráfico 19 – Porosidade aberta aos 7 e 28 dias

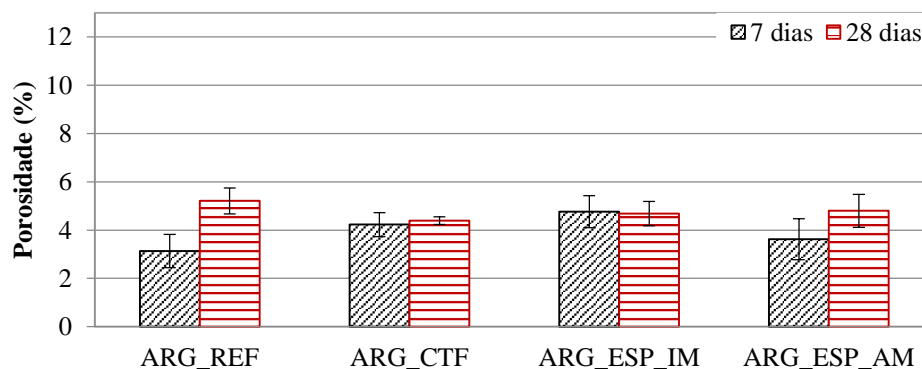


Fonte: O próprio autor.

Na porosidade aberta não se observou a mesma tendência em todas as amostras, pois na amostra ARG\_ESP\_IM, houve um aumento da porosidade aberta, mas se os desvios padrão forem considerados, esse aumento foi insignificante. Nas demais amostras houve uma diminuição significativa da porosidade dos 7 para os 28 dias, de 4,52% para a ARG\_REF, 1,74% para ARG\_CTF e 3,21% para ARG\_ESP\_AM.

Por fim, no Gráfico 20 está apresentada a porosidade fechada das argamassas.

Gráfico 20 – Porosidade fechada aos 7 e 28 dias



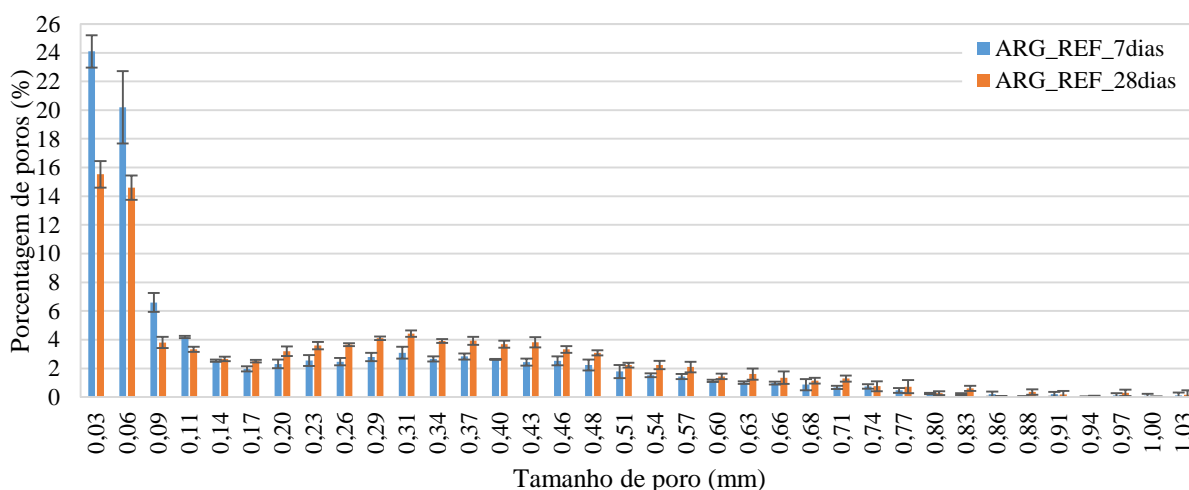
Fonte: O próprio autor.

Na porosidade fechada observou-se o mesmo comportamento na ARG\_REF e na ARG\_ESP\_AM, onde as duas apresentaram um aumento dessa porosidade dos 7 para os 28 dias (2,08 e 1,17%, respectivamente), possivelmente pelo fechamento de capilares que interligavam poros, os quais se apresentavam como porosidade aberta aos 7 dias e pelo fechamento desses capilares, diminuíram a porosidade aberta aos 28 dias e aumentaram a porosidade fechada nesta mesma idade. Porém, as amostras ARG\_CTF e ARG\_ESP\_IM não apresentaram diferenças significativas na porosidade fechada.

Afim de comparar esses dados com o já apresentado na bibliografia, verificou-se um estudo de Jr Mattana e Costa (2012), os quais estudaram uma argamassa 1:3 com consistência fixada em 250 mm e encontraram uma porosidade total por microtomografia de 5%, sendo destes 0,7% de poros abertos e 4,3% de poros fechados, avaliando poros de 10 a 1100 $\mu$ m. Apesar da diferença de cerca de 6% na porosidade total, observou-se a mesma tendência quanto a porosidade aberta e fechada, onde a maior parte dos poros analisados foi na porosidade fechada. Cabe salientar que essa diferença entre as amostras pode ter se dado pela diferença na consistência das argamassas e pela diferença na leitura do tamanho dos poros.

Para complementar a análise, foram realizados estudos do percentual de poros em cada tamanho de poro, aos 7 e 28 dias. No Gráfico 21 estão apresentados os resultados dos poros presentes na ARG\_REF.

**Gráfico 21 – Percentual de poros da ARG\_REF**



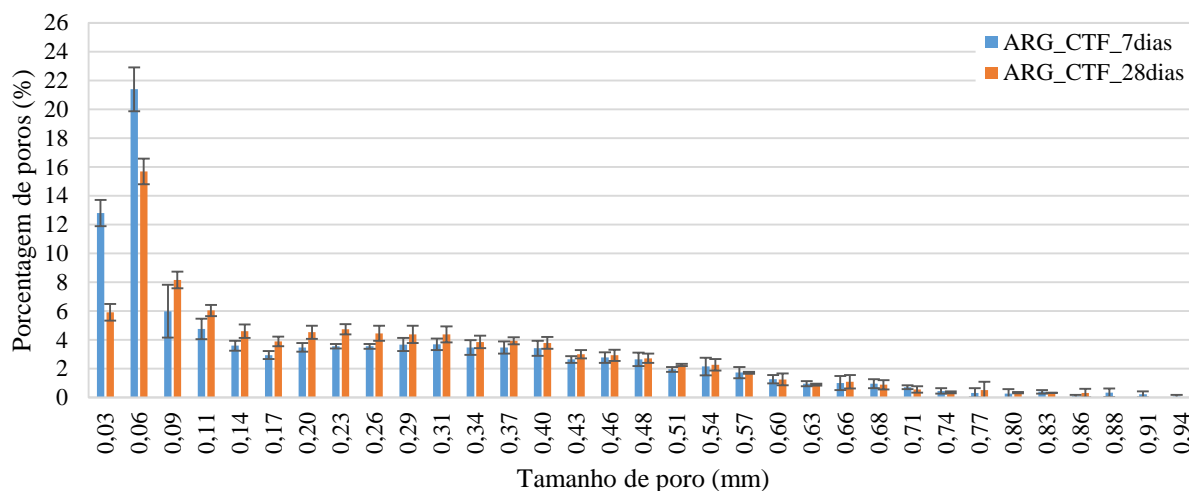
**Fonte:** O próprio autor.

Para a ARG\_REF, notou-se que houve uma diminuição significativa do percentual de poros dos 7 para os 28 dias, em tamanhos de 0,03 até 0,11 mm, provavelmente

ocasionado pela hidratação do cimento. Os poros maiores do que 0,11 mm não apresentaram diferenças significativas entre os 7 e 28 dias de cura.

No Gráfico 22 pode-se visualizar os resultados da ARG\_CTF.

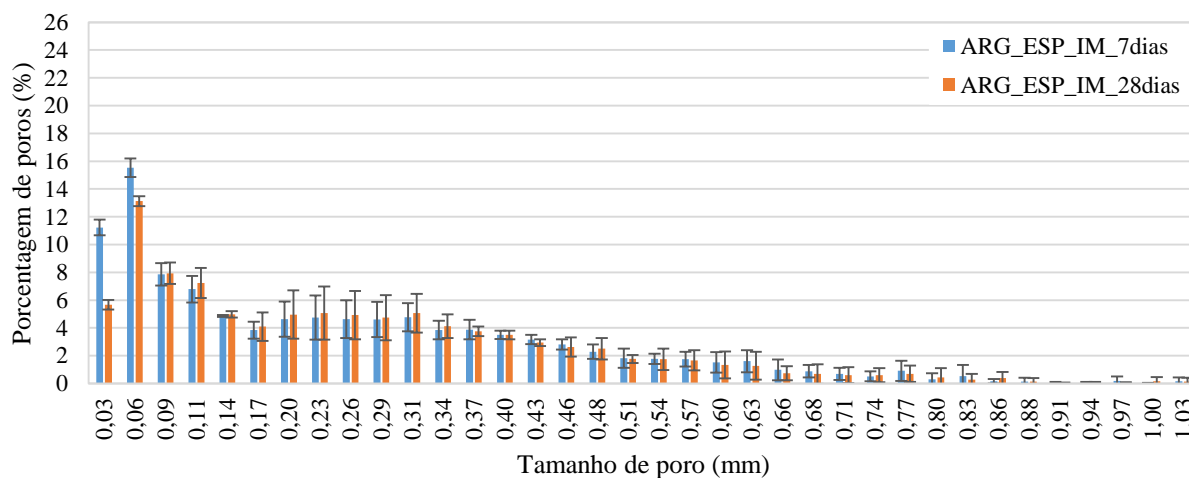
**Gráfico 22 – Percentual de poros da ARG\_CTF**



Fonte: O próprio autor.

A porosimetria da ARG\_CTF apresentou a mesma tendência do que a ARG\_REF, pois houve uma diminuição significativa de poros pequenos (de 0,03 a 0,06 mm) e nos poros maiores não houveram diferenças significativas entre os 7 e 28 dias. Na sequência pode-se visualizar os resultados da ARG\_ESP\_IM, no Gráfico 23, o qual apresentou o mesmo comportamento da ARG\_CTF.

**Gráfico 23 - Percentual de poros da ARG\_ESP\_IM**

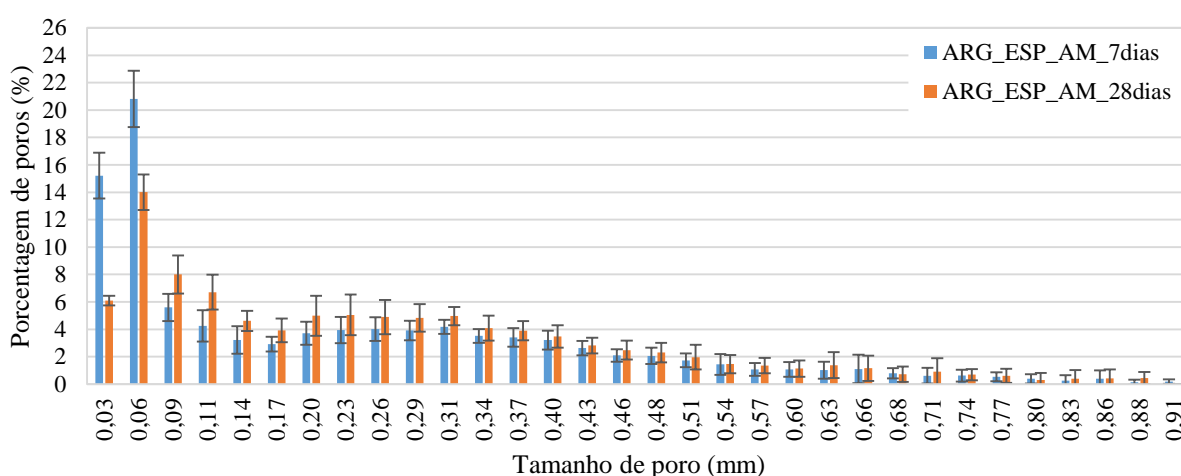


Fonte: O próprio autor.

Na ARG\_ESP\_IM é possível verificar que a porcentagem de poros no tamanho de 0,03 a 0,06 é menor do que na ARG\_REF e na ARG\_CTF, tanto aos 7 quanto aos 28 dias. Na ARG\_REF se tinha em média 24% de poros no tamanho de 0,03 mm e 20% no tamanho de 0,06 mm, já na ARG\_ESP\_IM essas porcentagens são de em média 11 e 15,5%, respectivamente. O que pode ter ocorrido devido ao fechamento de poros pela precipitação de  $\text{CaCO}_3$  antes dos 7 dias de cura.

Por fim, no Gráfico 24 estão apresentados os resultados da porosimetria da ARG\_ESP\_AM.

**Gráfico 24 – Percentual de poros da ARG\_ESP AM**



**Fonte:** O próprio autor.

Na ARG\_ESP\_AM, também observou-se uma diminuição do percentual de poros nos tamanhos de 0,03 a 0,06 mm, os quais podem ser resultado da hidratação do cimento e/ou da precipitação de  $\text{CaCO}_3$  promovida pelos esporos de *B. subtilis*. Sendo que nos demais tamanhos analisados não houveram diferenças significativas na porosidade entre os 7 e 28 dias. Os percentuais de poros desta argamassa nos tamanhos de 0,03 e 0,06 também apresentam diferenças com relação a referência.

Cabe abordar que nos poros a partir de 0,085 mm verificou-se um pequeno aumento da porosidade, dos 7 para os 28 dias em todas as amostras. Porém esse aumento não foi significativo quando se consideram as barras de erro que representam os desvios padrão. Isso pode ter ocorrido por vários fatores interferem na determinação da porosidade por  $\mu$ -CT, entre eles, efeito de volume parcial, resolução espacial, limiarização, flutuações na eletrônica do sistema, etc. Apesar de haver um rigoroso controle desses fatores, os mesmos são minimizados mas não eliminados.

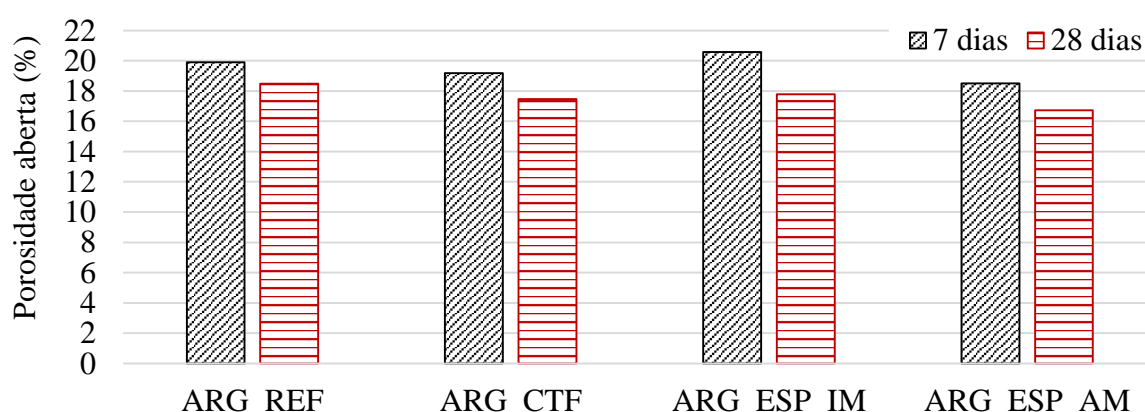
Por fim, verificou-se que o fechamento de poros se deu em poros de pequena magnitude, fazendo com que essa diminuição seja pequena na porosidade total, conforme foi verificado. Cabe ressaltar que o fechamento dos poros pela precipitação do  $\text{CaCO}_3$  se dá da superfície dos poros para dentro. O que pode ter acontecido nos poros maiores das amostras com adição de bactérias é que o  $\text{CaCO}_3$  começou a ser precipitado nas paredes dos mesmos, e como em poros maiores esses cristais não foram suficientes para fechar os mesmos, o  $\text{CaCO}_3$  pode ter sido considerado como volume parcial (volume da parede do poro que está em contato com a argamassa), não diminuindo o tamanho do poro e/ou a porosidade da amostra.

Além disso, observou-se que nos menores poros analisados (0,03 e 0,06 mm) houve uma diminuição significativa do percentual de poros dos 7 para os 28 dias. Sendo assim, foram realizados ensaios de porosimetria por intrusão de mercúrio (PIM) afim de se avaliar poros menores, para verificar se a bactéria tem capacidade de atuação apenas em poros menores dos que os analisados na  $\mu$ -CT.

#### 4.2.3.6 Porosimetria por intrusão de mercúrio (PIM)

A porosimetria por intrusão de mercúrio foi realizada em amostras de em média 10x10x10 mm, nas idades de 7 e 28 dias. O primeiro resultado analisado foi quanto a porosidade total das argamassas, a qual está apresentada no Gráfico 25. Cabe lembrar que a porosidade analisada neste ensaio é a porosidade permeável.

**Gráfico 25 – Porosidade total aos 7 e 28 dias**



Fonte: O próprio autor.

A partir da análise do Gráfico 25 verificou-se que em todas as amostras houve uma redução da porosidade dos 7 para os 28 dias, sendo que a maior diminuição foi na ARG\_ESP\_IM, de 2,8%, seguido da ARG\_ESP\_AM com 1,8% de diminuição, a ARG\_CTF

com 1,7% e por fim, a ARG\_REF com 1,4% de redução da porosidade. Observou-se que a diminuição da porosidade ao longo do período de cura foi de pequena magnitude, possivelmente por 28 dias serem poucos dias para que a bactéria precipitasse mais carbonato de cálcio.

Sendo assim, buscou-se analisar os demais resultados do ensaio de PIM. Na Tabela 12 está apresentada a pressão necessária para o mercúrio adentrar em cada tamanho de poro de todas as argamassas.

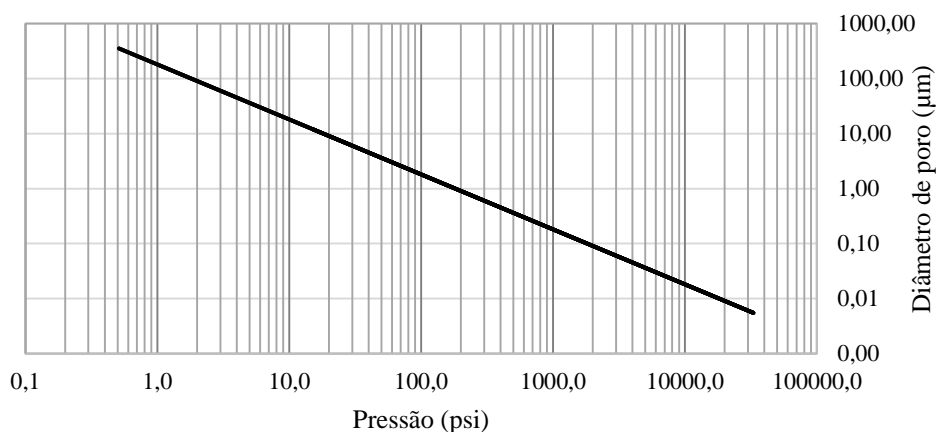
**Tabela 12 – Pressão necessária para adentrar em cada tamanho de poro**

Pressão (psi)	Diâmetro de poro ( $\mu\text{m}$ )
1	182,78
10	19,770
100	1,835
1000	0,171
10000	0,016
30000	0,006

Fonte: O próprio autor.

Além disso, o Gráfico 26 ilustra que quanto maior a pressão menor é o poro em que o mercúrio é capaz de adentrar.

**Gráfico 26 – Diâmetro de poro *versus* pressão**



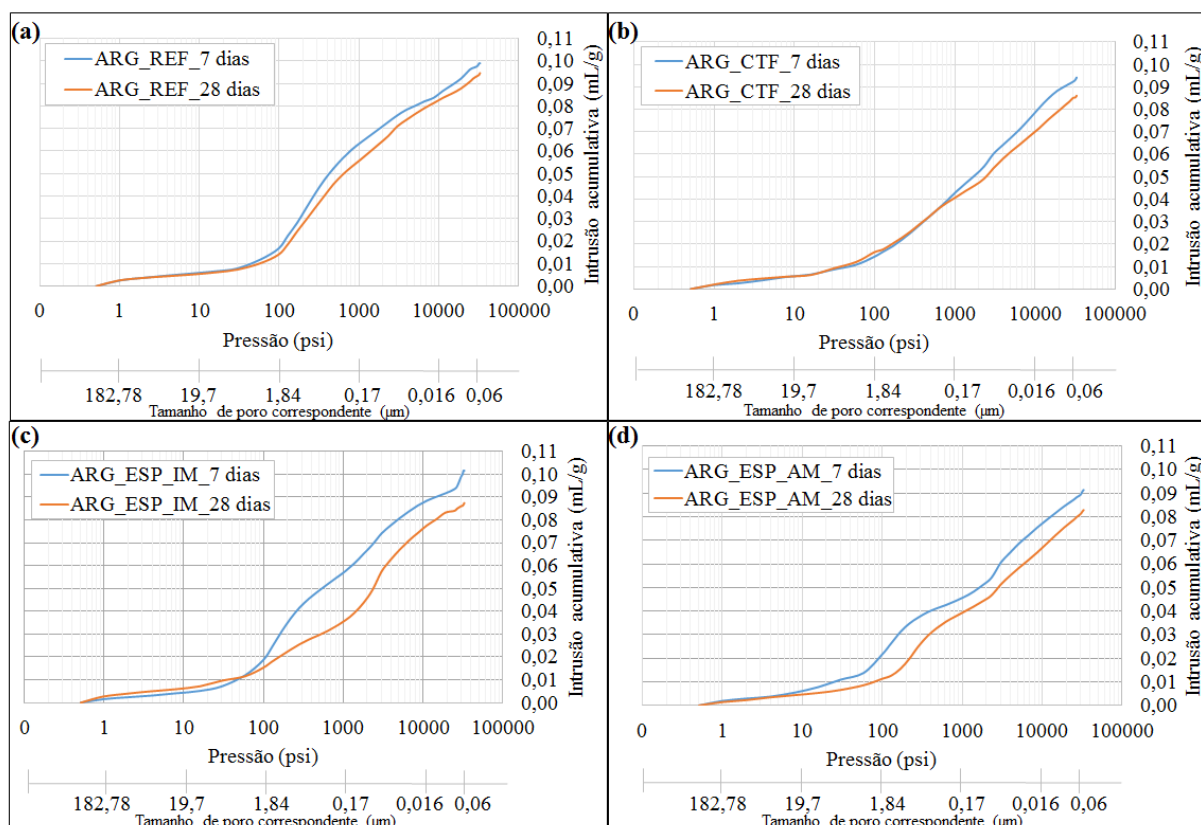
Fonte: O próprio autor.

Os poros analisados no ensaio variaram de 350  $\mu\text{m}$  até 0,006  $\mu\text{m}$ , para todas as amostras, tanto aos 7 como aos 28 dias. Sendo assim, neste ensaio é possível quantificar poros menores do que a análise de Microtomografia computadorizada de raios-X, o qual foi realizado com resolução de 14  $\mu\text{m}$ , limitando a leitura dos poros a 28  $\mu\text{m}$ .

Para avaliar a diminuição da porosidade ao longo do período de cura de cada tipo de argamassa, foram traçados gráficos da pressão *versus* intrusão acumulativa de mercúrio,

pois quanto maior for a intrusão acumulativa em uma determinada pressão, maior será o percentual de poros em que aquela pressão adentra, em cada tamanho de poro. Sendo assim, tem-se um indicativo se a porosidade diminuiu dos 7 para os 28 dias, em cada tamanho de poro. Os resultados estão apresentados no Gráfico 27.

**Gráfico 27 – Intrusão acumulativa versus pressão das argamassas (a) ARG\_REF, (b) ARG\_CTF, (c) ARG\_ESP\_IM e (d) ARG\_ESP\_AM**



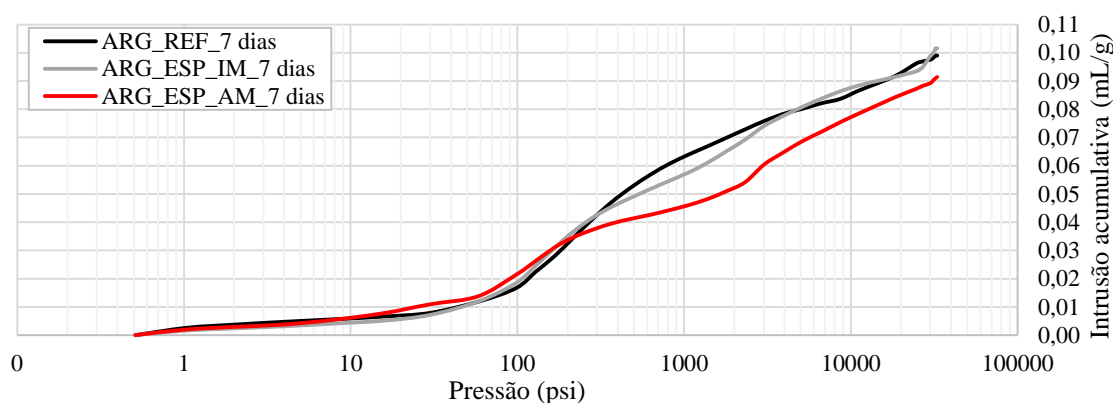
**Fonte:** O próprio autor.

A partir da análise dos gráficos verificou-se que em todas as amostras houve uma redução da intrusão acumulativa de mercúrio dos 7 para os 28 dias, o que reflete em uma diminuição da porosidade de todas as amostras. Porém na ARG\_CTF observou-se a menor diferença entre os 7 e 28 dias, refletindo em uma redução menor da porosidade ao longo da cura.

Na ARG\_ESP\_IM verificou-se uma redução na intrusão acumulativa de mercúrio maior nas pressões de 100 a 30.000 psi, refletindo em uma diminuição maior da porosidade em tamanhos de poro de 1,84 até 0,006 µm. Já na ARG\_ESP\_AM observou-se uma diminuição de poros maiores, pois houve uma redução da intrusão acumulativa de mercúrio a partir da pressão de 10 psi, refletindo em poros entre 19,7 e 0,006 µm.

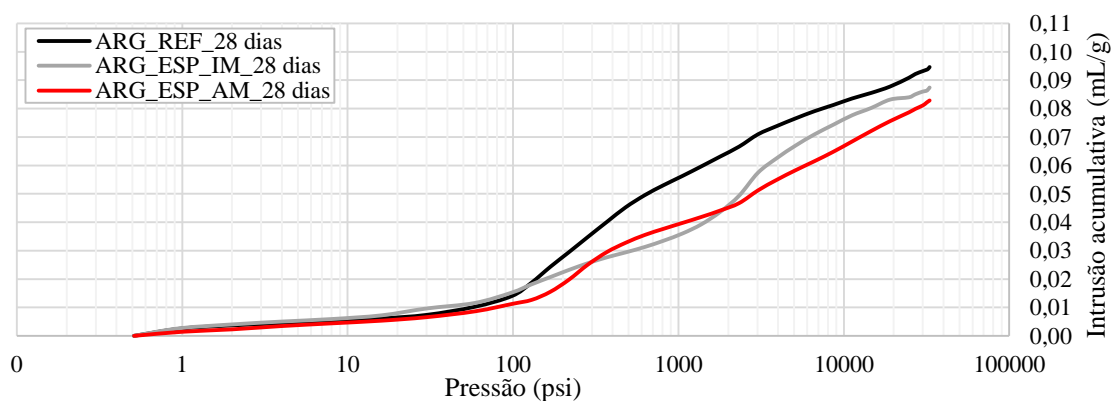
Nos Gráficos 28 e 29 estão apresentadas as análises comparativas entre as argamassas ARG\_REF, ARG\_ESP\_IM e ARG\_ESP\_AM aos 7 e aos 28 dias, respectivamente. A ARG\_CTF não foi incluída nessa análise pois conforme apresentado no Gráfico 27 (b) ela não apresentou diferenças significativas entre a intrusão acumulativa dos 7 aos 28 dias de cura.

**Gráfico 28 – Pressão *versus* Intrusão acumulativa das argamassas aos 7 dias de cura.**



Fonte: O próprio autor.

**Gráfico 29 – Pressão *versus* Intrusão acumulativa de todas as argamassas aos 28 dias de cura.**



Fonte: O próprio autor.

Verificou-se que tanto aos 7, quanto aos 28 dias houve uma diminuição da intrusão acumulativa das argamassas com adição de bactérias quando comparadas com a referência. Aos 7 dias, essa diferença se dá a partir da pressão de 300 psi, o que reflete em poros menores do que  $0,64 \mu\text{m}$ , sendo que percebe-se uma diferença mais expressante entre a ARG\_REF e a ARG\_ESP\_AM, o que pode indicar uma maior precipitação de  $\text{CaCO}_3$  na argamassa com adição de esporos na água de amassamento.

Aos 28 dias ocorreu uma diminuição mais expressiva da intrusão acumulativa de mercúrio da ARG\_ESP\_IM do que aos 7 dias, sendo que seu comportamento nesta idade é

semelhante a ARG\_ESP\_AM. Além disso, verificou-se que as pressões para que houvesse uma diminuição da intrusão acumulativa de mercúrio em relação a referência foram menores, em torno de 100 psi, refletindo que aos 28 dias a bactéria foi capaz de fechar poros maiores do que aos 7 dias, sendo estes poros iguais ou menores a 1,84  $\mu\text{m}$ . Isso nos faz refletir que com o passar do tempo poros ainda maiores poderiam ser fechados com a precipitação do  $\text{CaCO}_3$ .

É interessante ressaltar a diferença do fechamento de poros entre as formas de adição dos esporos bacterianos. Aos 7 dias de cura verificou-se que quando os esporos bacterianos foram adicionados por imersão (ARG\_ESP\_IM), eles não fecharam poros de forma significativa, quando comparados a referência (ARG\_REF). Apontando que nas primeiras idades a adição de esporos de *B. subtilis* na água de amassamento (ARG\_ESP\_IM) se tornou mais eficaz para o fechamento de poros. Porém aos 28 dias o comportamento das duas formas de adição foi semelhante, sendo que o fechamento de poros foi maior quando os esporos foram adicionados na água de amassamento.

Outro fator relevante é que a diferença entre a porosidade total dos 7 para os 28 dias a partir do ensaio de PIM se deu em pequena escala, porém, quando se observa a tendência da diminuição dos poros em diferentes tamanhos, pode-se verificar que a diminuição da porosidade pela precipitação de  $\text{CaCO}_3$  se dá em poros pequenos (menores do que 20  $\mu\text{m}$ ), fazendo com que a influencia desse fechamento de poros seja refletido em pequena magnitude na porosidade total das argamassas.

Buscou-se resultados do ensaio de PIM na literatura para comparação dos dados, porém a maioria dos dados deste ensaio que estão apresentados na literatura são referentes a análises em pastas cimentícias, sendo que são escassos os estudos que apresentem resultados de PIM em concretos e argamassas (KULAKOWSKI, 2002). Além de que a maioria dos estudos que avaliam a PIM em argamassas, são em argamassas de cimento e cal, o que não foi analisado na pesquisa e impossibilita a comparação dos dados.

O resultado mais próximo da argamassa de referência encontrado foi de traço 1:2 com relação água/cimento de 0,6, sem adição de qualquer microrganismo, onde os autores verificaram que a maior parte dos poros das amostras eram menores do que 0,05  $\mu\text{m}$ , corroborando com o encontrado na pesquisa (ABELL *et al.*, 1998).

Além desses autores De Muyneck *et al.* (2010) estudou a PIM em pedras calcárias imersos na cultura de *B. sphaericus* crescidas durante um dia e não verificou mudanças na PIM com tratamento com bactérias. O autor justifica que o ensaio pode não ter sido sensível

por causa das grandes variações na porosidade e na distribuição do tamanho de poro, pois a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  foi comprovada a partir de análise em MEV.

Para finalizar a análise dos resultados de porosidade das argamassas, é interessante enfatizar a diferença entre os ensaios realizados, considerando suas particularidades. No Quadro 11 estão apresentadas as principais diferenças entre os de absorção de água, microtomografia computadorizada de raios-X ( $\mu$ -CT) e Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM).

**Quadro 11 – Diferenças entre os ensaios de porosidade**

Ensaio	Tamanho de poro	Poros analisados
Absorção de água	*	Poros permeáveis
$\mu$ -CT	28 $\mu\text{m}$	Poros permeáveis e impermeáveis
PIM	0,006 $\mu\text{m}$	Poros permeáveis

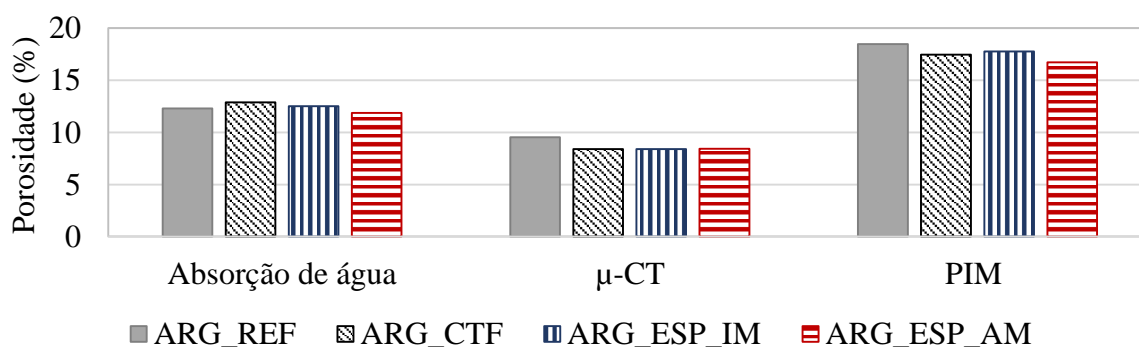
\* A norma não relata o tamanho de poros analisados neste ensaio.

Fonte: O próprio autor.

A absorção de água quantifica poros permeáveis a água, quando submetida a condição de fervura, sendo que não foi encontrados estudos que apresentassem os tamanhos de poro que este ensaio é capaz de quantificar. Já a microtomografia computadorizada de raios-X quantifica poros dependendo da resolução da amostra, pois quanto menor a amostra, menor a resolução e o ensaio é sensível a poros menores. No caso da pesquisa realizada, utilizou-se uma resolução de 14  $\mu\text{m}$ , o que limitou a porosidade em 28  $\mu\text{m}$ . Além disso, neste ensaio se consegue quantificar poros impermeáveis, ou seja, os poros fechados da amostra. Por fim, a PIM detecta apenas os poros permeáveis, porém, diferente da microtomografia e da absorção de água, este ensaio é sensível a poros pequenos, com menos de 1  $\mu\text{m}$ .

O Gráfico 30 ilustra os valores de porosidade média aos 28 dias dos ensaios de absorção de água,  $\mu$ -CT e PIM.

**Gráfico 30 – Porosidades dos diferentes ensaios aos 28 dias.**



Fonte: O próprio autor.

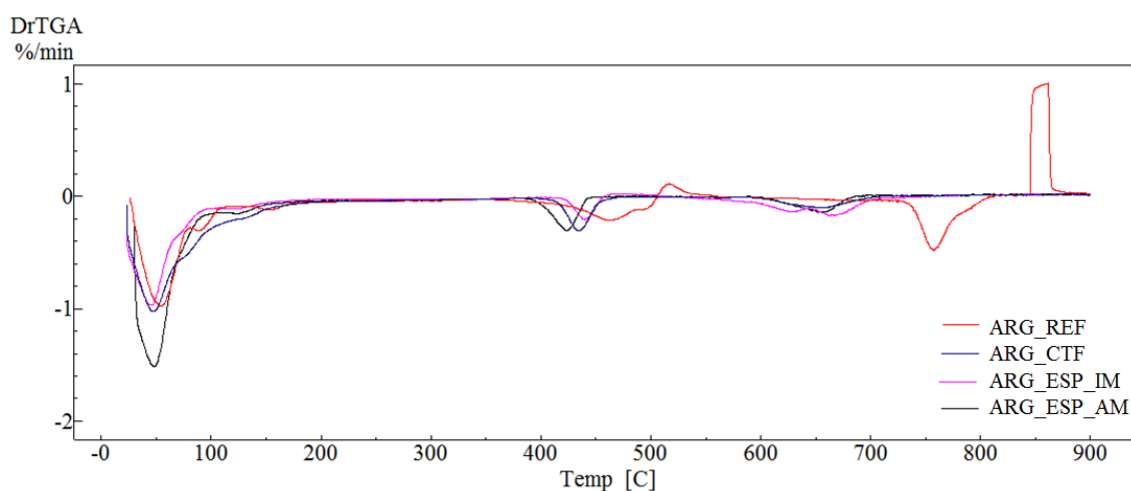
A partir da análise do Gráfico 30 verificou-se uma maior porosidade nas análises de PIM, mesmo o ensaio não sendo sensível a porosidades fechadas, devido a sua sensibilidade a poros menores, ele apresentou uma porosidade maior que os demais ensaios. Além de que o ensaio no estudo em questão mostrou resultados que comprovam que o maior número de poros se encontra nos menores tamanhos.

A microtomografia apresentou valores de porosidade menores do que na absorção de água, o que não era esperado, pois a microtomografia analisa a porosidade fechada. Esse comportamento também foi observado por Pessôa *et al.* (2014), o qual estudou a porosidade de um concreto e observou que os valores encontrados a partir dos cálculos da NBR 9778 foram em média o dobro da porosidade por microtomografia computadorizada de raios X. Segundo os autores, um fator que contribuiu para que houvesse diferença nos resultados entre os métodos foi a presença de ruído no processamento das imagens. Como as intensidades do contraste e a binarização necessitam da intervenção do usuário do programa, alguns poros podem ter sido perdidos no corte ou algum ruído pode ter sido contado como poro.

#### 4.2.3.7 Termogravimetria

O ensaio de termogravimetria foi realizado aos 7, 14 e 28 dias de cura, visando quantificar o  $\text{CaCO}_3$  precipitado pelas bactérias em amostras moídas, com em média 17 mg. Essas amostras foram aquecidas de 30 a 900°C sob uma taxa de aquecimento de 10°C/min. Os resultados da derivada da perda de massa aos 7 dias estão apresentados no Gráfico 31.

**Gráfico 31 – Derivada da perda de massa das amostras aos 7 dias**



Fonte: O próprio autor.

A partir da análise do Gráfico 31 verificou-se uma perda de massa em todas as amostras nas faixas de temperatura de 425 a 550°C, que de acordo com Taylor (1990) correspondem a decomposição do hidróxido de cálcio. Além disso, verificou-se que a partir dos 600°C também houve uma perda de massa em todas as amostras, decorrente da decomposição do carbonato de cálcio, de acordo com a Equação 3 (item 2.2.4) (HOPPE FILHO, 2008; DWECK *et al.*, 1999). Sendo assim, a perda de massa quantificada é decorrente da liberação de CO<sub>2</sub>, a qual corresponde a 44% da massa total do CaCO<sub>3</sub>.

Verificou-se ainda que houve um aumento da massa na temperatura de 850 a 875°C, esse aumento de massa pode ter se dado pela oxidação do ferro presente na escória do próprio cimento (CP II E-32), já que este teve contato com o ar no momento da desmoldagem e na colocação da amostra no equipamento ou por alguma contaminação. Esse aumento de massa também foi verificado por Dweck *et al.* (1999).

A ARG\_REF provavelmente sofreu uma contaminação, por apresentar uma perda de massa expressiva na temperatura de 750°C e logo em seguida um aumento da massa, após os 850°C. Não foi encontrado nenhum resultado semelhante na literatura.

Na Tabela 13 é possível observar os percentuais de perda de massa nas temperaturas de 425 a 550°C e 600 a 750°C, aos 7 dias idade e também o cálculo do percentual de CaCO<sub>3</sub> presente naquela amostra.

**Tabela 13 – Perda de massa aos 7 dias**

Amostra	Perda de massa (%) (425-550°C)	Perda de massa (%) (600-750°C)	Percentual de CaCO <sub>3</sub> (%)
ARG_REF	0,96	0,74	1,68
ARG_CTF	0,72	0,66	1,50
ARG_ESP_IM	0,45	1,26	2,86
ARG_ESP_AM	0,84	0,63	1,43

Fonte: O próprio autor.

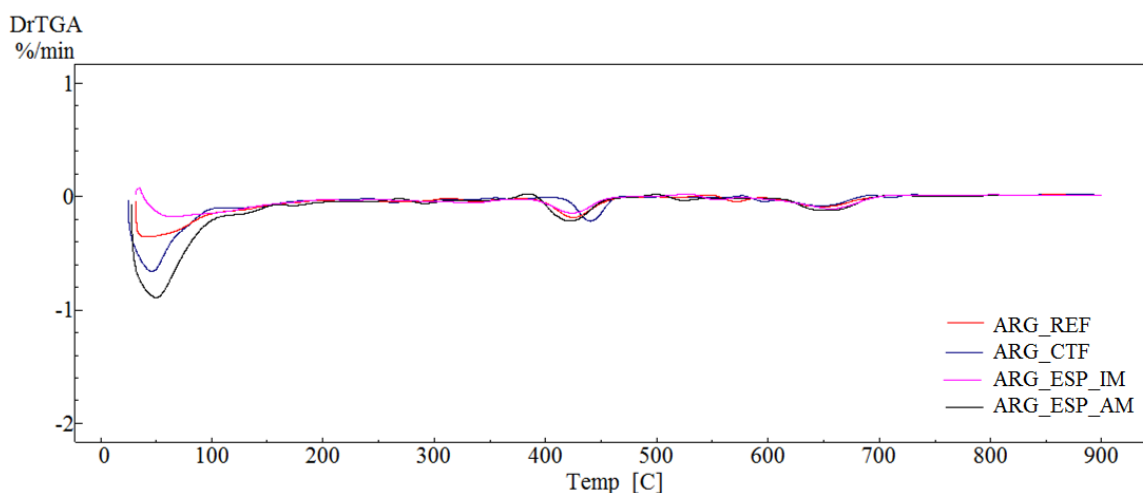
Conforme o observado no Gráfico 31 e confirmado na Tabela 13, verificou-se que na amostra ARG\_ESP\_IM houve uma maior precipitação de CaCO<sub>3</sub>, que possivelmente se deu pela ação das bactérias. Na amostra com adição de esporos bacterianos na água de amassamento (ARG\_ESP\_AM) essa precipitação não foi verificada, provavelmente por ter sido curada selada (sem contato com CO<sub>2</sub> e água), mostrando que somente o cálcio presente no hidróxido de cálcio não foi suficiente para que houvesse a bioprecipitação de CaCO<sub>3</sub>.

Cabe lembrar que a argamassa com adição de esporos por imersão foi desmoldada após 48 horas e imersa solução tampão saturada com cal com 10<sup>5</sup> esporos/ml e as

demais amostras (ARG\_REF, ARG\_CTF e ARG\_ESP\_AM) foram seladas após a moldagem e só foram desmoldadas nos dias de ensaio.

Na sequência estão apresentados o Gráfico 32 e a Tabela 14 com os resultados da derivada da perda de massa aos 14 dias.

**Gráfico 32 – Derivada da perda de massa das amostra aos 14 dias**



Fonte: O próprio autor.

**Tabela 14 – Perda de massa aos 14 dias**

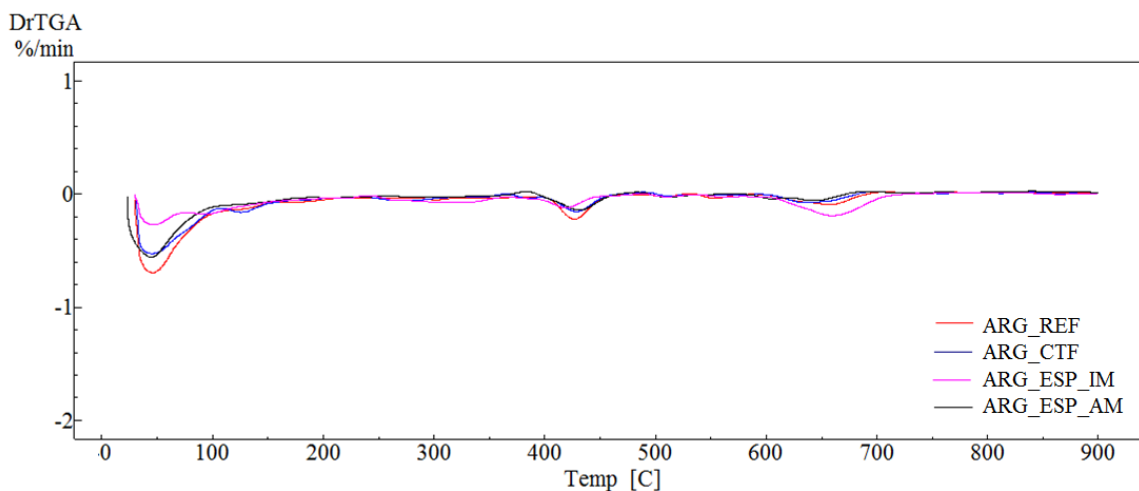
AMOSTRA	Perda de massa (%) (425-550°C)	Perda de massa (%) (600-750°C)	Percentual de CaCO <sub>3</sub> (%)
ARG_REF	0,77	0,49	1,11
ARG_CTF	0,59	0,42	0,95
ARG_ESP_IM	0,26	0,83	1,91
ARG_ESP_AM	0,50	0,68	1,55

Fonte: O próprio autor.

Aos 14 dias se observou a mesma tendência dos 7 dias de cura, onde a maior quantidade de CaCO<sub>3</sub> verificada foi na ARG\_ESP\_IM, porém essa diferença é de pequena magnitude, quando comparada com a referência (menos de 1%), não sendo significativa. Existe um problema quanto a representatividade deste ensaio, pois o limite de massa utilizado no ensaio é de 20 mg, sendo que esses 20 mg são extraídos de uma amostra de 1 cm de diâmetro por 2 cm de altura, por mais que se tente manter a homogeneidade da amostra, ela é muito pequena.

Por fim, no Gráfico 33 e na Tabela 15 estão apresentados os resultados das amostras aos 28 dias.

Gráfico 33 – Derivada da perda de massa das amostra aos 28 dias



Fonte: O próprio autor.

Tabela 15 – Perda de massa aos 28 dias

AMOSTRA	Perda de massa (%) (425-550°C)	Perda de massa (%) (600-750°C)	Percentual de CaCO <sub>3</sub> (%)
ARG_REF	0,51	0,45	1,02
ARG_CTF	0,37	0,30	0,68
ARG_ESP_IM	0,26	1,24	2,82
ARG_ESP_AM	0,42	0,34	0,77

Fonte: O próprio autor.

Aos 28 dias também se observou uma maior presença de CaCO<sub>3</sub> na ARG\_ESP\_IM, sendo que nesta idade houve uma diferença de quase 2% desta em relação à referência. As amostras ARG\_REF, ARG\_CTF e ARG\_ESP\_AM não apresentaram diferenças significativas entre si.

A literatura ainda é escassa quanto a análise termogravimétrica do CaCO<sub>3</sub> precipitado por ação bacteriana. Abo-El-Enein *et al.* (2012) estudou os resultados da termogravimetria de uma argamassa de traço 1:3 com adição de *S. pasteurii* (antigamente conhecido como *B. pasteurii*) na água de amassamento com adição de cloreto de cálcio, acetato de cálcio e nitrato de cálcio. Os autores observaram que quando as células bacterianas foram adicionadas com cloreto de cálcio houve uma perda de massa de 12,6%, com acetato de cálcio de 10,4% e com nitrato de cálcio 6,7%, atribuindo maiores quantidades de CaCO<sub>3</sub> quando as bactérias foram adicionadas com cloreto de cálcio.

Estes valores são bastante diferentes dos encontrados na pesquisa, principalmente pelo fato de Abo-El-Enein *et al.* (2012) analisar a precipitação de CaCO<sub>3</sub> pela

hidrólise da ureia, que é mais eficiente quanto a precipitação do  $\text{CaCO}_3$ , porém libera uma elevada carga de nitrogênio nessa precipitação, podendo ocasionar problemas aos materiais cimentícios.

Além disso, a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  pode ter ocorrido em pequena escala pelo tempo de análise, de 28 dias. Afim de visualizar essa precipitação foram separadas amostras para análise em Microscópio Eletrônico de Varredura.

#### 4.2.3.8 Análise microestrutural no MEV

Por fim, as amostras foram submetidas a análise microestrutural no MEV, afim de verificar os produtos de hidratação do cimento e se a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  de fato ocorreu nas argamassas com adição de esporos de *B. subtilis* AP91. Sendo que nas imagens, foi adotada a nomenclatura apresentada no Quadro 12.

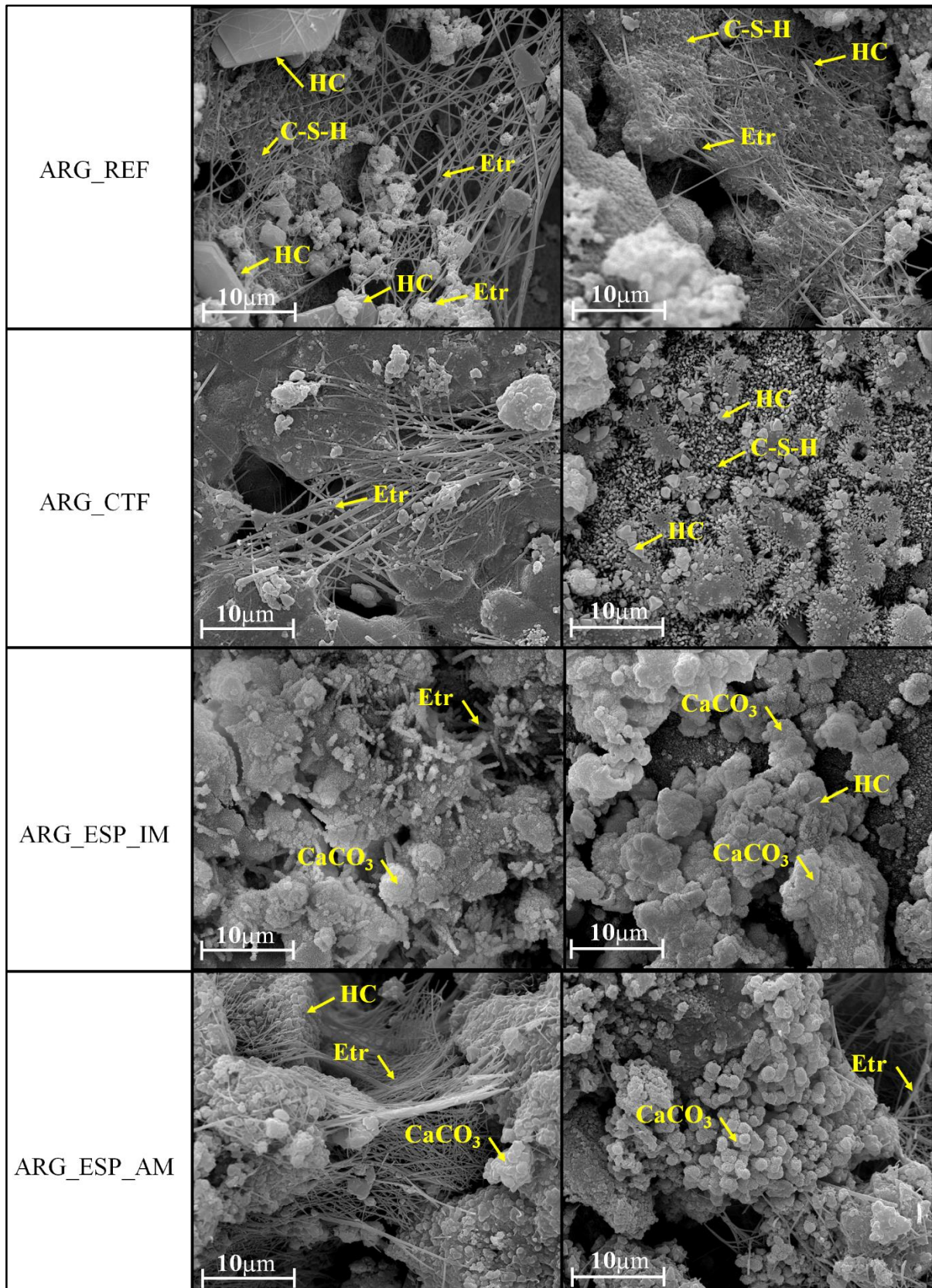
**Quadro 12 – Nomenclatura adotada**

<b>Nomenclatura</b>	<b>Descrição</b>
Etr	Etringita
C-S-H	Silicato de Cálcio Hidratado
$\text{CaCO}_3$	Carbonato de cálcio

**Fonte:** O próprio autor.

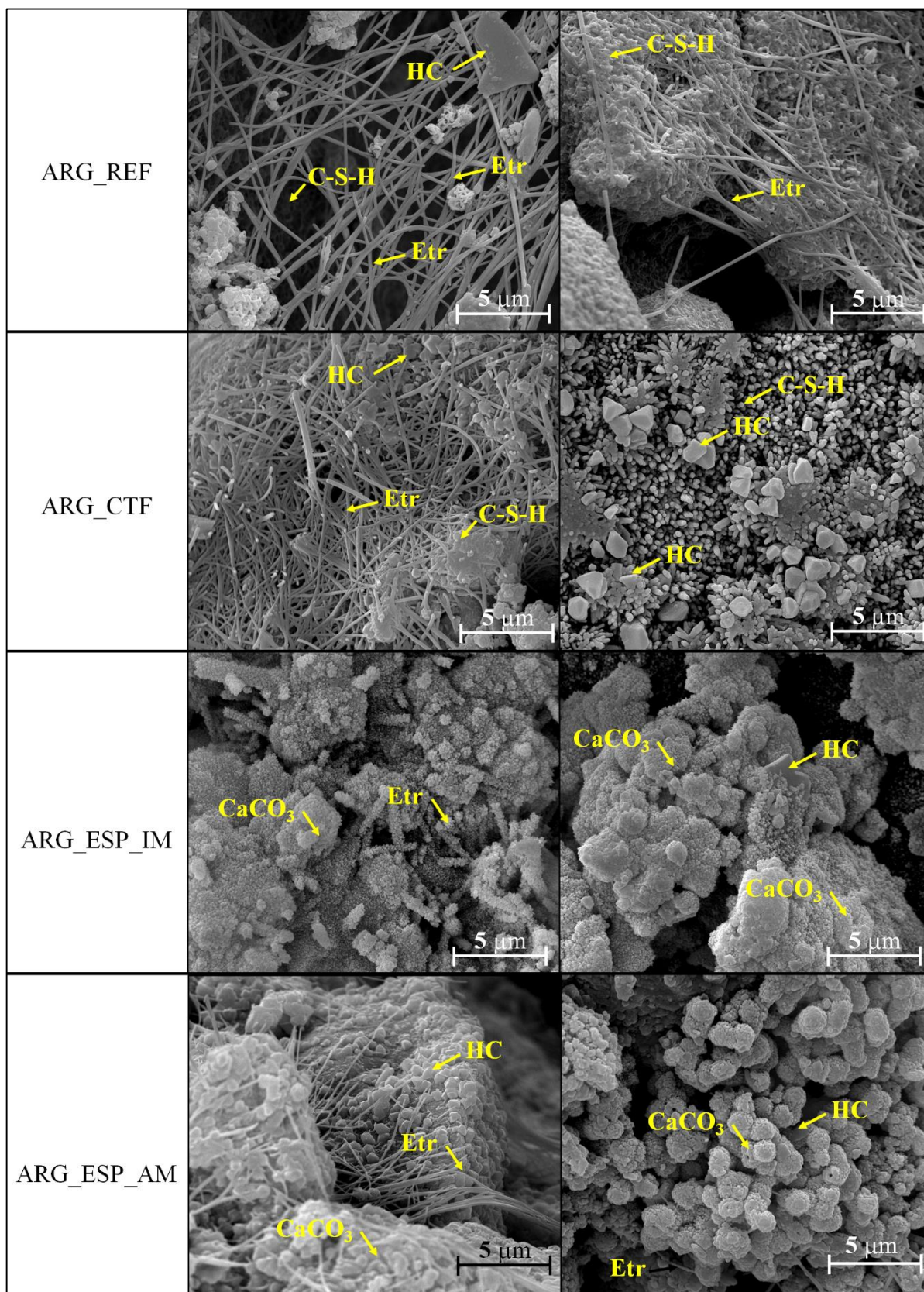
Os resultados obtidos aos 7 dias de cura estão apresentados nas Figuras 39 e 40, com ampliações de 6.000 e 12.000 x, respectivamente. Também indica-se os produtos de hidratação encontrados em todas as amostras e o  $\text{CaCO}_3$  precipitado pelas bactérias, quando as mesmas foram adicionadas.

Figura 39 – MEV das amostras aos 7 dias com ampliação de 6.000 x.



Fonte: O próprio autor.

Figura 40 – MEV das amostras aos 7 dias com ampliação de 12.000 x.

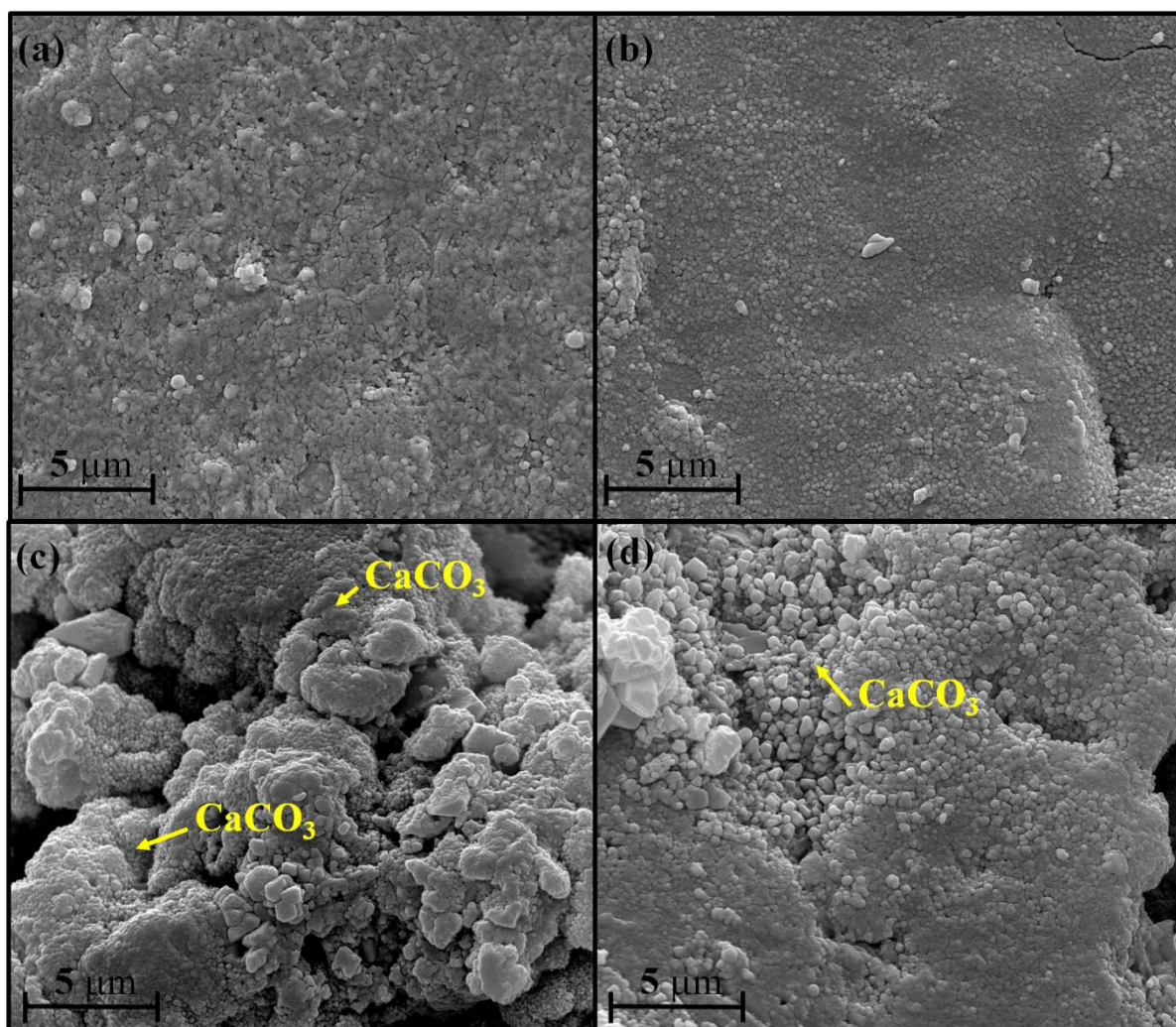


Fonte: O próprio autor.

Pode-se observar a partir da análise das imagens de MEV que as amostras analisadas aos 7 dias apresentaram a formação dos produtos de hidratação do cimento, como silicato de cálcio hidratado (C-S-H), hidróxido de cálcio (HC) e etringita (Etr). A presença do carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) foi visível apenas nas amostras com adição de esporos de *B. subtilis* AP91 e corroboram com os resultados obtidos na primeira campanha experimental, onde a morfologia dos cristais de  $\text{CaCO}_3$  encontrados na precipitação *in vitro* da bactéria (Figura 37 item 4.1.3) tem a mesma morfologia dos precipitados nas argamassas.

A Figura 41 ilustra as imagens obtidas pelo MEV aos 28 dias em todas as argamassas, observa-se que apenas as argamassas com adição de esporos continham cristais de  $\text{CaCO}_3$ , enquanto as amostras de referência não pode-se visualizar essas estruturas.

**Figura 41 – MEV das amostras aos 28 dias com ampliação de 12.000 x, sendo (a) a ARG\_REF, (b) a ARG\_CTF, (c) a ARG\_ESP\_IM e (d) ARG\_ESP\_AM**

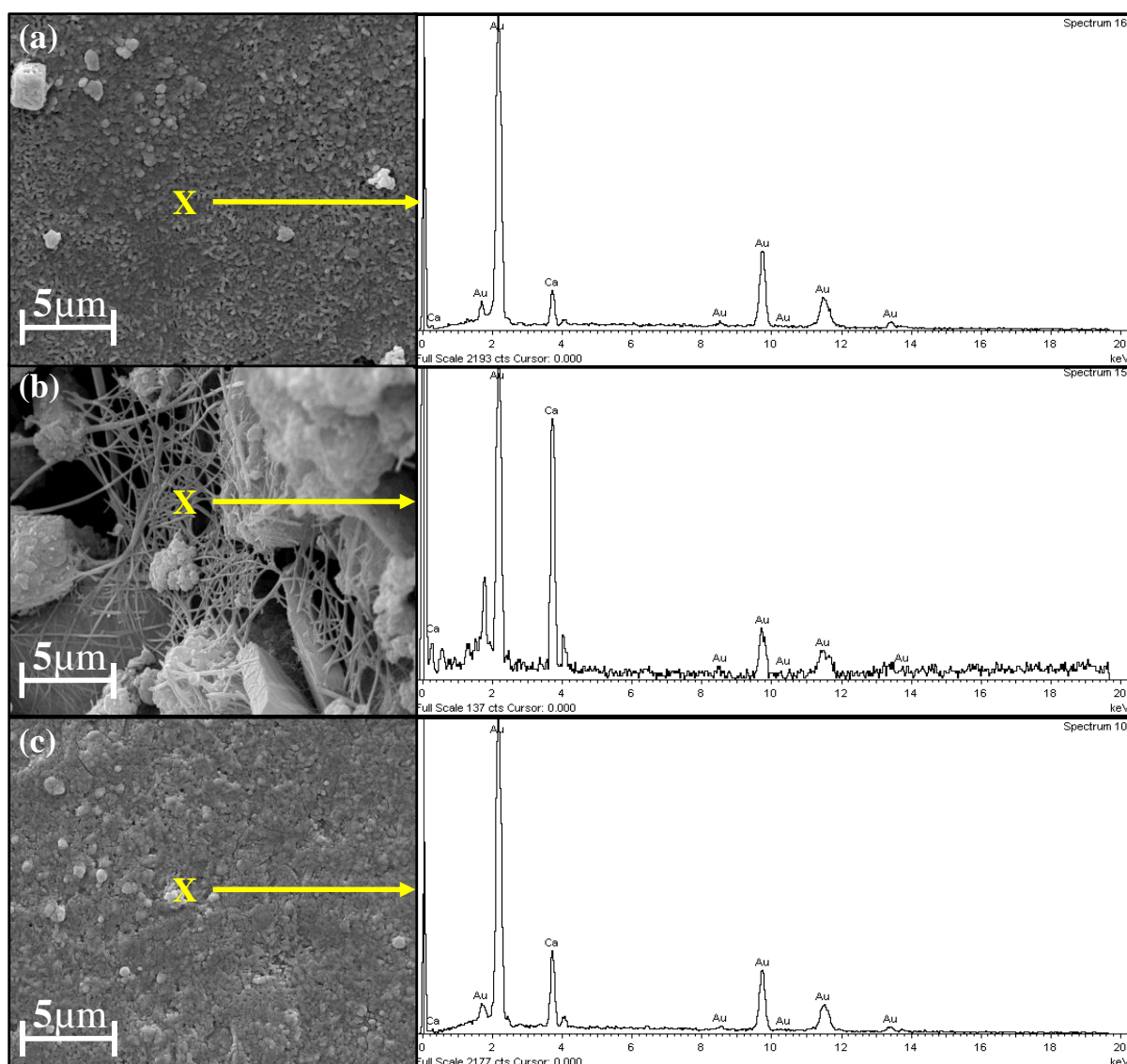


Fonte: O próprio autor.

Para complementar a análise, as amostras foram submetidas ao ensaio de energia dispersiva (EDS), onde o resultado apresenta um gráfico de picos com os elementos químicos presentes naquele ponto analisado. A seguir serão apresentados os espectros das argamassas aos 7 e 28 dias, assim como as imagens de MEV do ponto analisado no ensaio de difração de raios-X, demarcado pelo “X” nas figuras.

Cabe ressaltar que os picos de ouro presente em todas as amostras são devido ao recobrimento das mesmas, para que se pudesse obter imagens de alta resolução.

**Figura 42 – Espectro de EDS da ARG\_REF aos 7 dias (a e b) e aos 28 dias (c).**



Fonte: O próprio autor.

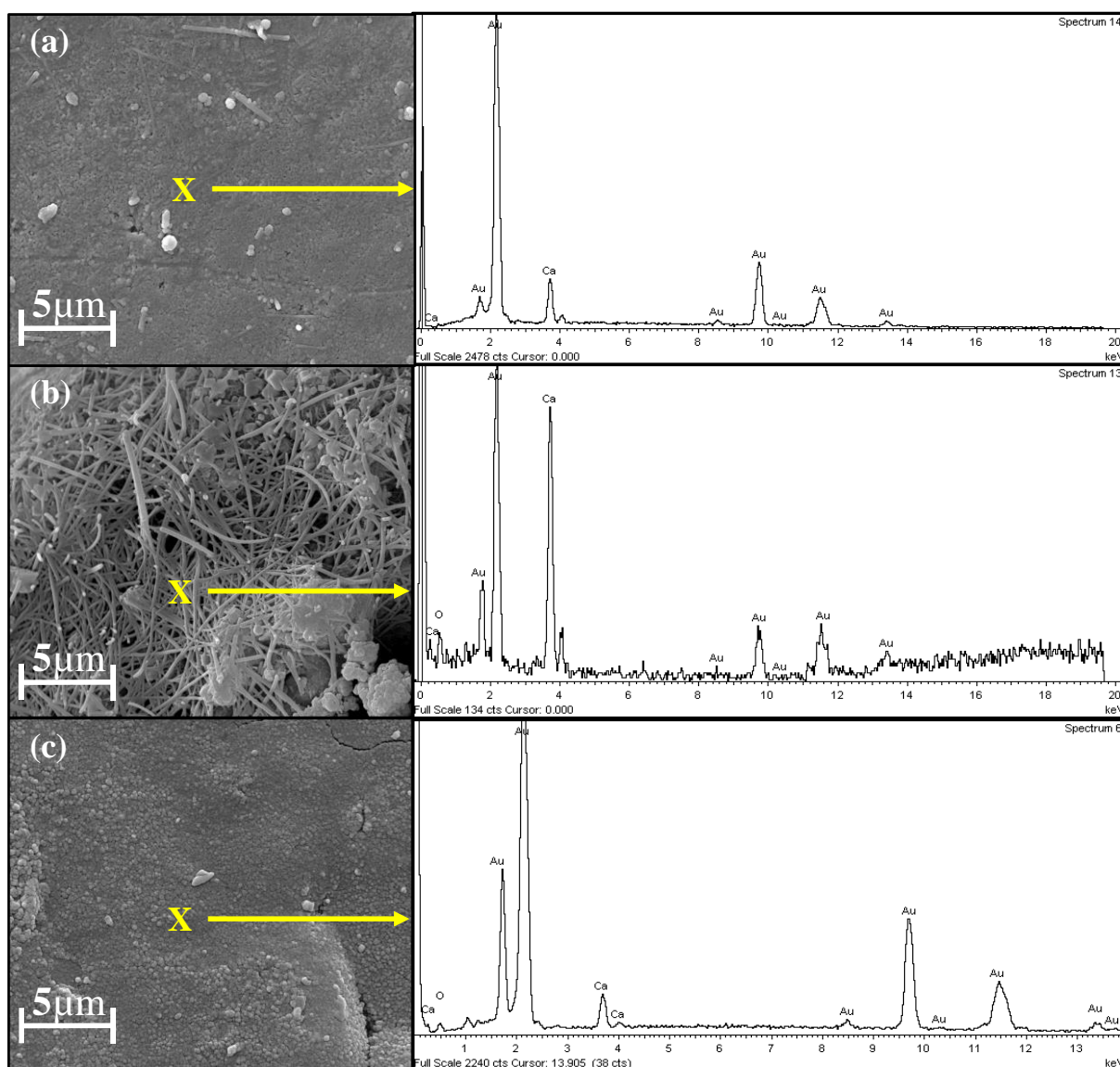
A Figura 42 mostrou os difratômetros da ARG\_REF, onde nas duas primeiras imagens (a e b) são referente a idade de 7 dias. Pode-se visualizar duas características distintas, uma superfície mais lisa e outra com a presença dos produtos de hidratação do cimento.

Verificou-se que em (a) havia um pequeno pico de cálcio, quando comparado as demais amostras, em (b) foi analisada a área contendo etringita, que é rica em cálcio. O espectro da Figura 42 (b) apresentou ruídos porque a amostra analisada estava dentro da trinca da amostra, dificultando a transmissão dos elétrons para a realização do ensaio.

Aos 28 dias, observou-se que não havia mais cristais de etringita, o que era esperado e a superfície era homogênea em sua grande parte, como representado na Figura 42 (c), apresentando também um pequeno pico de cálcio.

A Figura 43 ilustra os espectros da argamassa com tampão fosfato (ARG\_CTF), aos 7 e 28 dias.

**Figura 43 – Espectros da ARG\_CTF aos 7 dias (a e b) e aos 28 dias (c).**

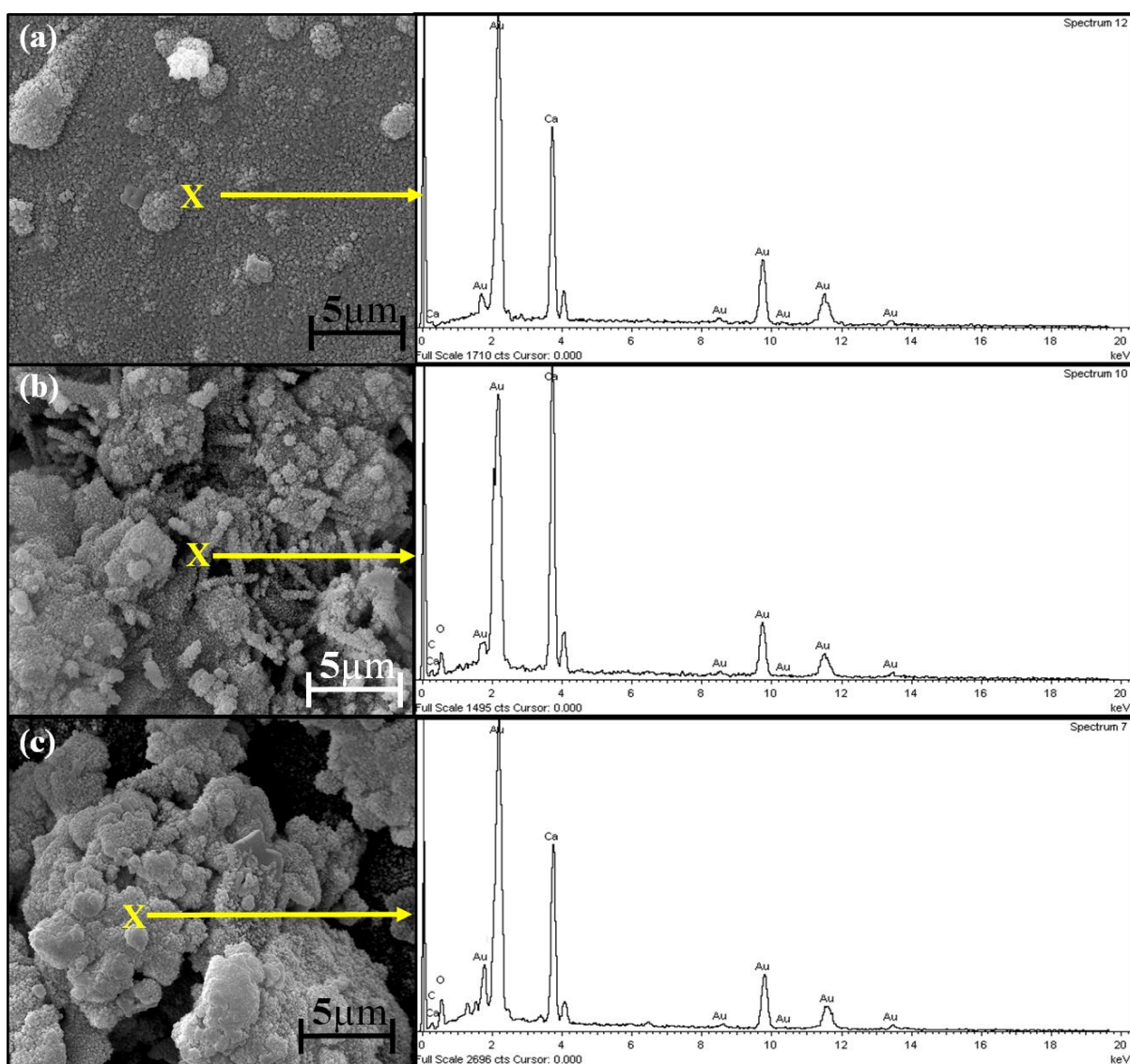


Fonte: O próprio autor.

Os resultados obtidos na ARG\_CTF apresentaram a mesma tendência da argamassa de referência, onde houve um elevado pico de cálcio na Figura 43 (b), na área onde haviam cristais de etringita. O difratômetro desta análise também apresentou ruídos por estar localizado dentro da trinca da amostra analisada.

Na sequência está apresentada a Figura 44 com os espectro da amostra com adição de esporos de *B. subtilis* AP91 por imersão.

**Figura 44 – Espectro de EDS da ARG\_ESP\_IM aos 7 dias (a e b) e aos 28 dias (c).**

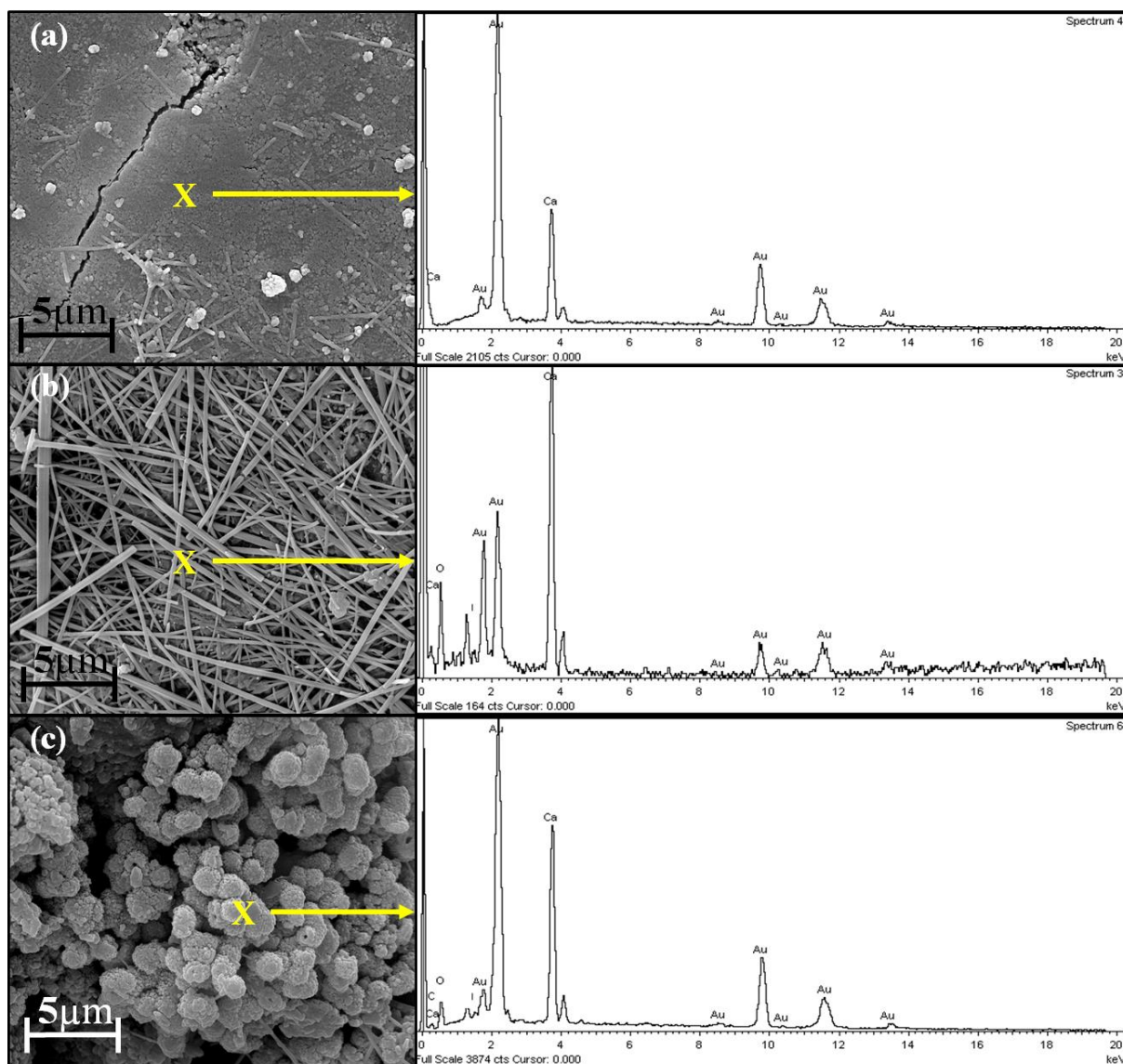


Fonte: O próprio autor.

Diferente das amostras anteriores, na ARG\_ESP\_IM foi verificado um pico maior de cálcio em todos os pontos, sendo que em (b) e (c), a presença de moléculas de carbono e oxigênio é visível, comprovando que nestas amostras havia a presença de cristais de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ).

O mesmo foi apresentado na ARG\_ESP\_AM, Figura 45.

**Figura 45 – Espectro de EDS da ARG\_ESP\_AM aos 7 dias (a e b) e aos 28 dias (c).**



Fonte: O próprio autor.

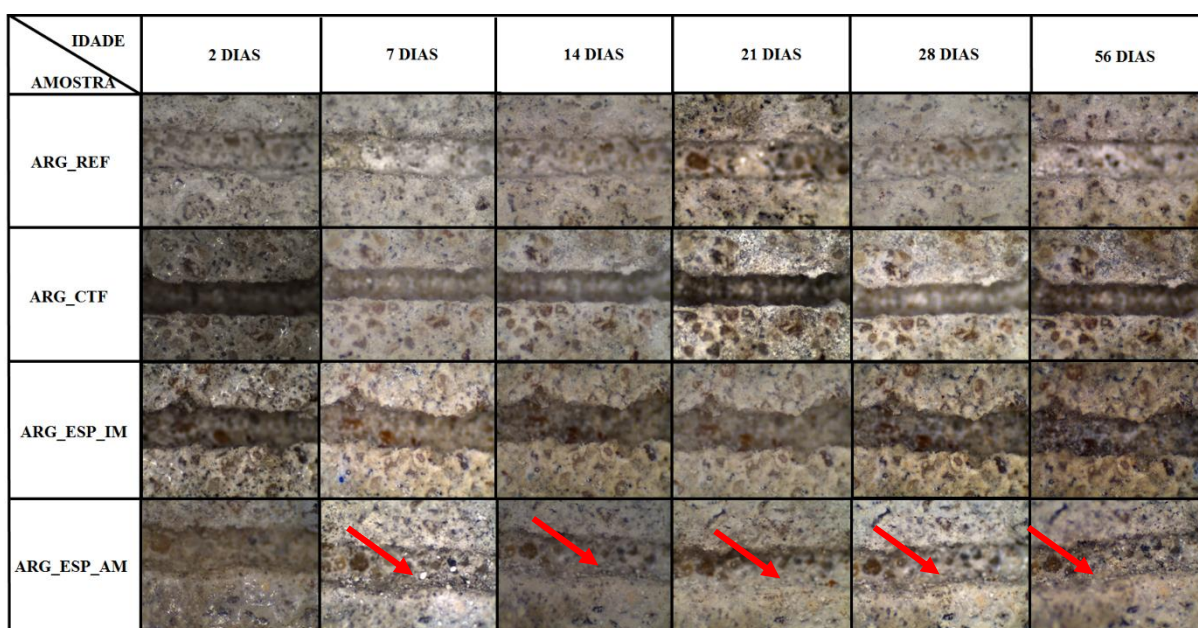
Verificou-se a partir das análises de MEV e EDS que apenas as argamassas com adição de bactérias apresentaram a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  e a morfologia destes cristais condiz com estudos relatados pelos autores Muynck *et al.* (2008), Park *et al.* (2012), Chahal e Siddique (2013), Abo-El-Enien *et al.* (2013) e Xu e Yao (2014) e também com a morfologia obtida na precipitação *in vitro* do  $\text{CaCO}_3$  na primeira campanha experimental.

O  $\text{CaCO}_3$  tem capacidade de fechamento de poros e fissuras em materiais cimentícios, por esse motivo, foi realizado um último ensaio, em relação ao fechamento desses poros e também de trincas induzidas, a partir do acompanhamento de imagens obtidas por lupa.

#### 4.2.3.9 Análise das trincas por meio de lupa

O acompanhamento das trincas de aproximadamente 0,8 mm, por lupa, iniciou-se ao segundo dia de cura e foi efetuado semanalmente até os 28 dias. Após os 28 dias, a análise foi repetida apenas aos 56 dias de cura. Os resultados podem ser visualizados na Figura 46, sendo o aumento utilizado de 40 x em todas as imagens.

**Figura 46 – Acompanhamento das trincas por meio de lupa de todas as amostras analisadas**

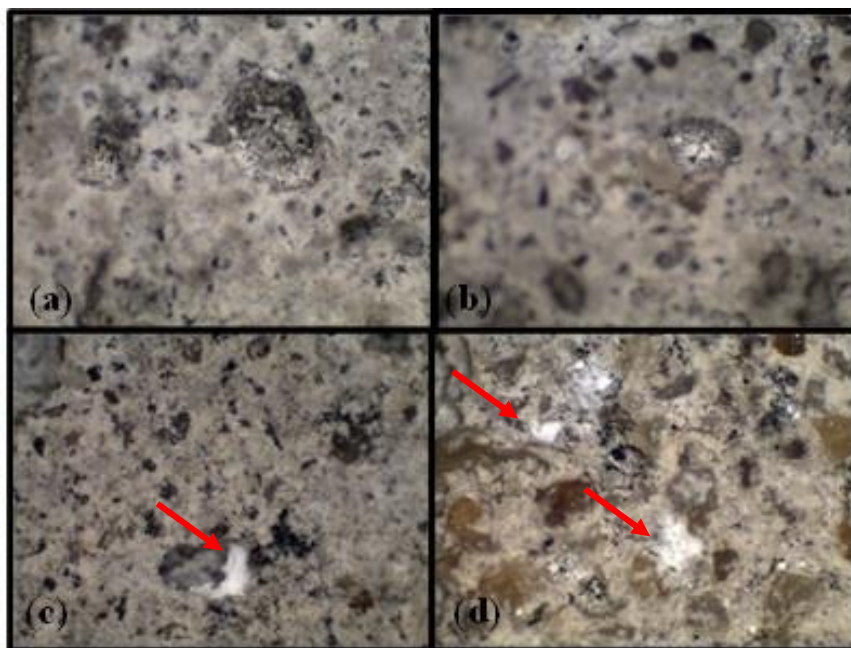


Fonte: O próprio autor.

A partir da análise dos resultados apresentados na Figura 46, visualizou-se que as trincas não foram fechadas em nenhuma das amostras, mas observou-se que na ARG\_ESP\_AM uma fase celular foi induzida nas paredes das trincas, verificada pela presença de pequenos cristais indicados pelas setas.

Com isso, verificou-se que a trinca induzida de 0,8 mm deveria ser de menor dimensão, para que as bactérias conseguissem fechá-la no período analisado. Por esse motivo, aos 56 dias de cura foram procurados poros, para verificar se houve o fechamento dos mesmos. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 47, onde em (a) estão poros da ARG\_REF, em (b) da ARG\_CTF, em (c) da ARG\_ESP\_IM e por fim, em (d) da ARG\_ESP\_AM.

**Figura 47 – Análise dos poros das argamassas aos 56 dias de cura.**



**Fonte:** O próprio autor.

A precipitação de cristais de  $\text{CaCO}_3$  pode ser verificada nos poros das argamassas com adição dos esporos de *B. subtilis* AP91, como foi observado na Figura 47, sendo que na ARG\_ESP\_IM o poro não está totalmente selado, enquanto na ARG\_ESP\_AM os poros estão totalmente fechados pela bioprecipitação do cristal.

## 5 CONCLUSÃO

Diante da delimitação de pesquisa verificou-se que a adição dos esporos bacterianos nas condições analisadas são capazes de promover a biocimentação de poros a partir da precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , mantendo uma resposta adequada na resistência à compressão, à tração por compressão diametral, no módulo de elasticidade e na porosidade.

Com os resultados obtidos na primeira campanha experimental conclui-se que a bactéria *B. subtilis* AP91 se apresentou mais viável quanto a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  a partir da mudança de biofilme, quando comparada com a *B. cereus*.

Quanto à aplicação dos esporos bacterianos nas argamassas, realizado na segunda campanha experimental, observou-se uma melhoria mais efetiva nas propriedades da argamassa com a adição dos esporos de *B. subtilis* AP91 na água de amassamento (ARG\_ESP\_AM). A ARG\_ESP\_AM apresentou uma maior resistência à compressão, quando comparada à de referência, tanto aos 7 quanto aos 28 dias. Além disso, observou-se uma diminuição da absorção de água e do índice de vazios, o que pode ter sido ocasionado pela bioprecipitação de  $\text{CaCO}_3$  por ação dos esporos de *B. subtilis* AP91.

Para a avaliação da porosimetria, foram realizados ensaios de microtomografia de raios X, o qual limitou a análise em poros maiores que 28  $\mu\text{m}$ . A partir da análise dos dados deste ensaio, verificou-se que não houveram diferenças significativas da porosidade total (aberta + fechada) entre as argamassas ensaiadas. Porém, quando a porosimetria foi analisada observou-se uma diminuição mais significativa da porosidade dos 7 para os 28 dias nos tamanhos de 28 e 57  $\mu\text{m}$ , para todas as argamassas.

Com o intuito de analisar poros menores do que 28  $\mu\text{m}$  as argamassas foram ensaiadas quanto à porosimetria por intrusão de mercúrio, que analisou poros abertos de até 0,006  $\mu\text{m}$ . É interessante mencionar que a PIM mostrou que houve uma diferença entre os tamanhos de poros colmatados aos 7 e 28 dias, quando as amostras com adição dos esporos bacterianos foram comparadas com a referência. Aos 7 dias, foram colmatados poros iguais ou menores que 0,64  $\mu\text{m}$ , já aos 28 dias foram fechados poros de até 1,84  $\mu\text{m}$ . Apontando que quanto maior o tempo de cura, os esporos têm capacidade de fechar poros maiores, porém, ainda não há um estudo que apresente até que idade ocorre a biocimentação e que tamanho de poros esses esporos são capazes de fechar.

Além disso, a PIM mostrou que a adição dos esporos bacterianos na água de amassamento foi capaz de diminuir a porosidade dos 7 para os 28 em poros menores que 19,7  $\mu\text{m}$ , enquanto a adição por imersão foi capaz de diminuir poros menores do que 1,84  $\mu\text{m}$ .

Por fim, conclui-se que, dentro das condições analisadas que os esporos da bactéria *B. subtilis* AP91 são capazes de biocimentar poros em materiais cimentícios. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que a adição dos esporos na água de amassamento resultou em melhores resultados do que quando os mesmos foram adicionados por imersão.

## 5.1 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Como a presente pesquisa é de inovação tecnológica e ainda são escassos os trabalhos neste âmbito no Brasil, muitas das variáveis que interferem na precipitação de  $\text{CaCO}_3$  ainda não são claras e precisam ser estudadas. Desta forma, estão descritas na sequência as sugestões para trabalhos futuros.

- Avaliar como a biocimentação se comportará ao longo do tempo e qual a espessura de fissura que ela é capaz de fechar;
- Analisar a biocimentação em matérias cimentícios submetidos a diferentes tipos de cura, pois como apresentado nesta pesquisa, existem diversas variáveis que podem interferir no processo de precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , as quais ainda não são claras e definidas.
- Estudar os genes envolvidos neste processo e, se possível e necessário, realizar a transferência genética de bactérias que também tenham a capacidade de precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , afim de potencializar a precipitação.
- Determinar o tipo de carbonato de cálcio precipitado, a partir de ensaios de difração de raios X (DRX), para o cruzamento do tipo de carbonato de cálcio encontrado no DRX com as imagens de Microscópio Eletrônico de Varredura.
- Quantificar quanto  $\text{CaCO}_3$  pode ser precipitado ao longo de um determinado período e por meio de vias estequiométricas, estimar a quantidade de  $\text{CO}_2$  reabsorvido da atmosfera no processo de biocimentação.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABELL, A. B.; WILLIS, K. L.; LANGE, D. A. **Mercury intrusion porosimetry and image analysis of cement-based materials**. Journal of colloid and interface science, v. 211, n. 1, p. 39-44, 1999.
- ABO-EL-ENEIN, S. A.; ALI, A. H.; TALKHAN, F. N.; ABDEL-GAWWAD, H. A. **Application of microbial biocementation to improve the physico-mechanical properties of cement mortar**. HBRC Journal, v. 9, p. 36-40, 2013.
- ACHAL, V.; MUKHERJEE, A.; KUMARI, D.; ZHANG, Q. **Biomining for sustainable construction—A review of processes and applications**. Earth-Science Reviews, V. 148, p. 1-17, 2015.
- ACHAL, V.; MUKHERJEE, A.; REDDY, M.S. **Biocalcification by Sporosarcina pasteurii using Corn steep liquor as nutrient source**. Ind. Biotechnol, v. 6, p. 170–174, 2010.
- ACHAL, V.; MUKERJEE, A.; REDDY, M. S. **Biogenic treatment improves the durability and remediates the cracks of concrete structures**. Construction and Building Materials, v. 48, p. 1-5, 2013.
- ACI Concrete Terminology. **American Concrete Institute: Advancing concrete knowledge**, 2013. Disponível em: [https://www.concrete.org/portals/0/files/pdf/ACI\\_Concrete\\_Terminology.pdf](https://www.concrete.org/portals/0/files/pdf/ACI_Concrete_Terminology.pdf). Acesso em 18 de agosto de 2016.
- ALDEA C.M.; SONG, W.J.; POPOVICS, J.S. **Extent of healing of cracked normal strength concrete**. J Mater Civil Eng, v. 12, 2000.
- ALIZADEH, R. A. **Nanostructure and engineering properties of basic and modified calcium-silicate-hydrate systems**. Tese de doutorado apresentada a Universidade de Ottawa, 2009.
- AL-SALLOUM, Y.; ABBAS, H.; SHEIKH, Q. I.; HADI, S.; ALSAYED, S.; ALMUSALLAM, T. **Effect of some biotic factors on microbially-induced calcite precipitation in cement mortar**. Saudi Journal of Biological Sciences, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7215: Cimento Portland - Determinação da resistência à compressão**. Rio de Janeiro: ABNT. 1997.
- \_\_\_\_\_. **NBR 13276: Argamassa para assentamento e revestimento de paredes e tetos - Preparo da mistura e determinação do índice de consistência**. Rio de Janeiro: ABNT. 2005.
- \_\_\_\_\_. **NBR 7211: Agregados para concreto - Especificação**. Rio de Janeiro: ABNT. 2009.
- \_\_\_\_\_. **NBR 15630: Argamassa para assentamento e revestimento de paredes e tetos - Determinação do módulo de elasticidade dinâmico através da propagação de onda ultrassônica**. Rio de Janeiro: ABNT. 2008.

\_\_\_\_\_. NBR 7222: **Concreto e argamassa — Determinação da resistência à tração por compressão diametral de corpos de prova cilíndricos**. Rio de Janeiro: ABNT. 2011.

\_\_\_\_\_. NBR 9778: **Argamassa e concreto endurecidos - Determinação da absorção de água, índice de vazios e massa específica**. Rio de Janeiro: ABNT. 2005.

\_\_\_\_\_. NBR 9833: **Concreto fresco - Determinação da massa específica, do rendimento e do teor de ar pelo método gravimétrico**. Rio de Janeiro: ABNT. 2009.

\_\_\_\_\_. NBR NM 248: **Agregados - Determinação da composição granulométrica**. Rio de Janeiro: ABNT. 2003.

\_\_\_\_\_. NBR NM 45: **Agregados - Determinação da massa unitária e do volume de vazios**. Rio de Janeiro: ABNT. 2006.

\_\_\_\_\_. NBR NM 52: **Agregado miúdo - Determinação da massa específica e massa específica aparente**. Rio de Janeiro: ABNT. 2009.

BACHMEIER, K.L.; WILLIAMS, A.E.; WARMINGTON, J.R.; BANG, S.S. **Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation**. *Journal of Biotechnology*, v. 93, p. 171–181, 2002.

BANG, S.S.; GALINAT, J.K.; RAMAKRISHNAN, V. **Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii***. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, p. 404–409, 2001.

BARABESI, C.; GALIZZI, A.; MASTROMEI, G.; ROSSI, M.; TAMBURINI, E.; PERITO, B. ***Bacillus subtilis* gene cluster involved in calcium carbonate biomineralization**. *Journal of bacteriology*, v. 189, p. 228-235, 2007.

BÄUERLEIN, E. **Biomineralization of Unicellular Organisms: An Unusual Membrane Biochemistry for the Production of Inorganic Nano-and Microstructures**. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 42, n. 6, 614-641, 2003.

BEAUDOIN, J. J.; FELDMAN, R. F.; TUMIDAJSLI, P. J. **Pore structure of hardened Portland cement pastes and its influence on properties**. *Advanced Cement Based Materials*, v. 1, n. 5, p. 224-236, julho 1994.

BRAISSANT, O.; CAILLEAU, G.; DUPRAZ, C.; VERRECCHIA, E. P. **Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: the role of exopolysaccharides and amino acids**. *Journal of Sedimentary Research*, v. 73(3), p. 485-490, 2003.

BRANDA, S. S.; CHU, F.; KEARNS, D. B.; LOSICK, R.; KOLTER, R. **A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix**. *Molecular microbiology*, v. 59, n. 4, p. 1229-1238, 2006.

BRIDIER, A.; MEYLHEUC, T.; BRIANDET, R. **Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM)**. *Micron*, v. 48, p. 65-69, 2013.

CHAHAL, N.; SIDDIQUE, R. **Permeation properties of concrete made with fly ash and silica fume: influence of Ureolytic bacteria**. *Construction and Building Materials*, v. 49, p. 161-174, 2013.

CHAHAL, N.; SIDDIQUE, R.; RAJOR, A. **Influence of bacteria on the compressive strength, water absorption and rapid chloride permeability of fly ash concrete**. *Construction and Building Materials*, v. 28, n. 1, p. 351-356, 2012.

CHATURVEDI, S.; CHANDRA, R.; RAI, V. **Isolation and characterization of *Phragmites australis* (L.) rhizosphere bacteria from contaminated site for bioremediation of colored distillery effluent**. *Ecological Engineering*, v. 27, p. 202–207, 2006.

CHONG, T. H.; SHEIKHOESLAMI, R. **Thermodynamics and kinetics for mixed calcium carbonate and calcium sulfate precipitation**. *Chemical Engineering Science*, v. 56, n. 18, p. 5391-5400, 2001.

CHUNXIANG, Q.; JIANYUN, W., RUIXING, W.; LIANG, C. **Corrosion protection of cement-based building materials by surface deposition of CaCO<sub>3</sub> by *Bacillus pasteurii***. *Materials Science and Engineering*, V. 29, n. 4, p. 1273-1280, 2009.

CIACH T. D.; GILLOTT J. E.; SWENSON E. G.; SEREDA P. J., **Microstructure of calcium silicate hydrates**. *Cement and Concrete Research*, v. 1, p. 13-25, 1971.

CORDEIRO, G. C. **Utilização das cinzas ultrafinas do bagaço de cana de açúcar e da casca de arroz como aditivos minerais em concretos**. Tese Doutorado. Ciências em Engenharia Civil. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2006.

DE ASSIS, J. T.; LIMA, I.; CARVALHO, G.; EINSFELD, R.; PESSÔA, J. R. C.; LOPES, R. T. e BREDER, R. L. B. **Concrete matrix porosity study by microtomography images**. 7 th EUROMECH Solid Mechanics Conference, Portugal, 2009.

DE KOSTER, S. A. L.; MORS, R. M., NUGTEREN, H. W.; JONKERS, H. M.; MEESTERS, G. M. H.; VAN OMMEN, J. R. **Geopolymer Coating of Bacteria-containing Granules for Use in Self-healing Concrete**. *Procedia Engineering*, v. 102, p. 475-484, 2015.

DE MUYNCK<sup>(1)</sup>, W.; COX, K.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. **Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete**. *Construction and Building Materials*, v. 22, n. 5, p. 875-885, 2008.

DE MUYNCK<sup>(2)</sup>, W.; DEBROUWER, D.; DE BELIE, N., VERSTRAETE, W. **Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials**. *Cement and Concrete Research*, v. 38; p. 1005–1014, 2008.

DE MUYNCK, W.; BELIE, N. DE.; VERSTRAETE, W. **Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review**. *Ecological Engineering*, v. 36, p. 118-136, 2010.

DHAMI, N. K.; MUKHERJEE, A.; REDDY, S. M.; SETO, J. **Biofilm and microbial applications in biomineralized concrete**. INTECH Open Access Publisher, 2012.

DICK, J.; DE WINDT, W.; DE GRAEF, B.; SAVEYN, H.; VANDER MEEREN, P.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. **Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species**. Biodegradation, v. 17, p. 357–367, 2006.

DUARTE, L. C.; JUCHEM, P. L.; PULZ, G. M.; BRUM, T. M. M.; CHODUR, N.; LICCARDO, A.; FISCHER, A. C.; ACAUAN, R. B. **Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros difração de raios X**. Pesquisas em Geociências, v. 30, n. 2, p. 3-15, 2003.

DUARTE, T. J. S. **Técnicas de microscopia aplicadas a materiais de base cimentícia**. Dissertação de mestrado em engenharia civil – Faculdade de Engenharia da Universidade de Porto, 2010.

DULLIEN, F. A. L. **Porous Media - Fluid transport and pore structure**. Academic Press, New York, 1979.

DUPRAZ<sup>(1)</sup>, C.; REID, R. P.; BRAISSANT, O.; DECHO, A. W.; NORMAN, R. S.; VISSCHER, P. T. **Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats**. Earth-Science Reviews, v. 96, n. 3, p. 141-162, 2009.

DUPRAZ<sup>(2)</sup>, S.; PARMENTIER, M.; MÉNEZ, B.; GUYOT, F. **Experimental and numerical modeling of bacterially induced pH increase and calcite precipitation in saline aquifers**. Chemical Geology, v. 265, v. 1, p. 44-53, 2009.

DWECK, J.; BUCHLER, P. M.; COELHO, A. C. V.; CARTLEDGE, F. K. **Controle de qualidade de cimento Portland composto por termogravimetria**. In Anais do 43o Congresso Brasileiro de Cerâmica, SC, p. 37-901, 1999.

FHWA-RD-01-156. **Corrosion cost and preventive strategies in the United States**. Report by CC Technologies Laboratories, Inc. to Federal Highway Administration. Office of Infrastructure Research and Development, September 2001.

FRANKEL, R. B.; e BAZYLINSKI, D. A. **Biologically induced mineralization by bacteria**. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, v. 54, p. 95-114, 2003.

FRIIS, A. K.; DAVIS, T. A.; FIGUEIRA, M. M.; PAQUETTE, J.; MUCCI, A. **Influence of *Bacillus subtilis* cell walls and EDTA on calcite dissolution rates and crystal surface features**. Environmental science e technology, v. 37, n. 11, p. 2376-2382, 2003.

GAJDA, J. **Absorption of atmospheric carbon dioxide by portland cement concrete**. PCA R & D Serial, n. 2255a, 2001.

GALLUCCI, E.; SCRIVENER, K.; GROSO, A.; STAMPANONI, M.; MARGARITONDO, G. **3D experimental investigation of the microstructure of cement pastes using synchrotron X-ray microtomography ( $\mu$ CT)**. Cement and Concrete Research, v. 37, n. 3, p. 360-368, 2007.

GEORGE D. O.; JIN LI. **Optimum conditions for microbial carbonate precipitation.** Chemosphere, v. 81, p. 1143-1148, 2010.

GHOSH, P.; MANDAL, S.; CHATTOPADHYAY, B. D.; PAL, S. **Use of microorganism to improve the strength of cement mortar.** Cement and Concrete Research, v. 35, n. 10, p. 1980-1983, 2005.

GHOSH, S.; BISWAS, M.; CHATTOPADHYAY, B. D.; MANDAL, S. **Microbial activity on the microstructure of bacteria modified mortar.** Cement and Concrete Composites, v. 31, n. 2, p. 93-98, 2009.

GOLLAPUDI, U.K.; KNUTSON, C.L.; BANG, S.S.; ISLAM, M.R. **A new method for controlling leaching through permeable channels.** Chemosphere, v. 30, p. 695-705, 1995.

GOMES, M. **Gênero Bacillus spp. Tópicos em Bacteriologia Veterinária.** FAVET-FRGS, 2013.

GONZÁLEZ, Y. V.; SANTANAB, A. P.; de CARVALHOC, J. C. **Bactérias nativas indutoras de precipitação de minerais de carbonato de cálcio em solos tropicais.** Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, v. 34, p. 15-21, 2014.

GREGG, S. J.; SING, K. S. W. **Adsorption, Surface Area and Porosity.** Academic Press, London, UK, p. 313, 1982.

GROSS, A.; KAPLAN, D.; BAKER, K. **Removal of chemical and microbiological contaminants from domestic greywater using a recycled vertical flow bioreactor (RVFB).** Ecological Engineering, v. 31, p. 107-114, 2007.

HAMMES, F.; VERSTRAETE, W. **Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation.** Reviews in environmental science and biotechnology, v. 1, p. 3-7, 2002.

HAMMES, F.; BOON, N.; DE VILLIERS, J.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S. D. **Strain-Specific Ureolytic Microbial Calcium Carbonate Precipitation.** Applied And Environmental Microbiology, p. 4901-4909, 2003.

HOPPE FILHO, JUAREZ. **Sistemas cimento, cinza volante e cal hidratada: mecanismo de hidratação, microestrutura e carbonatação de concreto.** Dissertação de doutorado apresentada a Universidade de São Paulo, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE PERÍCIAS DE ENGENHARIA (IBAPE). **Norma Básica para Perícias de Engenharia do IBAPE/SP,** 2015.

JONKERS H. M. **Self-healing concrete: a biological approach.** Self healing materials: an alternative approach to 20 centuries of materials science. The Netherlands: Springer, p. 195-204, 2007.

JONKERS H. M.; SCHLANGEN, E. **A two component bacteria-based self-healing concrete.** Concrete repair, rehabilitation and retrofitting II. Editores: In: Alexander MG, Beushausen HD, Dehn F, Moyo P. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group, p. 119-20, 2009.

JONKERS, H. M.; SCHLANGEN, E. **Development of a bacteria-based self healing concrete.** In Proc. int. FIB symposium, v. 1, p. 425-430, 2008.

JONKERS, H. M.; THIJSEN, A.; MUYZER, G.; COPUROGLU, O.; SCHLANGEN, E. **Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete.** Ecological Engineering, v. 36, p. 230-235, 2010.

JR MATTANA, A.; R. M. M. COSTA, M. **Avaliação da estrutura interna por microtomografia em pastas cimentícias.** IX Simpósio Brasileiro de Tecnologia de Argamassas, Minas Gerais, 2011.

JR. MATTANA, A. **Metodologia de avaliação da porosidade de estruturas cimentícias endurecidas através de microtomografia de raios X – avaliação de pasta cimentícias e argamassas de revestimento.** Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

JUGNIA, L.B.; CABRAL, A.R.; GREER, C.W. **Biothic methane oxidation within an instrumented experimental landfill cover.** Ecological Engineering, v. 33, p. 102–109, 2008.

KAWAGUCHI, T.; DECHO, A. W. **A laboratory investigation of cyanobacterial extracellular polymeric secretions (EPS) in influencing CaCO<sub>3</sub> polymorphism.** Journal of Crystal Growth, v. 240, n. 1, p. 230-235, 2002.

KERBAUY, G.; VIVAN, A. C.P.; SIMÕES, G. C.; SIMIONATO A. S.; PELISSON, M.; VESPERO, E. C.; COSTA. S. F.; ANDRADE, C, G.T. DE J.; BARBIERI, D. M.; MELLO, J. C.P.; MOREY, A. T.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F.; OLIVEIRA, ADMILTON G. DE; E ANDRADE, G. **Effect of a Metalloantibiotic Produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*.** Current Pharmaceutical Biotechnology, v. 17, 2016.

KONNO, H., NANRI, Y.; KITAMURA, M. **Crystallization of aragonite in the causticizing reaction.** Powder Technology, v. 123, n. 1, p. 33-39, 2002.

KRISHNAPRIYA, S.; VENKATESH BABU, D. L.; PRINCE ARULRAJ G. **Isolation and identification of bacteria to improve the strength of concrete.** Microbiological research, v. 174, p. 48-55, 2015.

KULAKOWSKI, M. P. (2002). **Contribuição ao estudo da carbonatação em concretos e argamassas compostos com adição de sílica ativa** (Doctoral dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

LEA, F. The chemistry of cement and concrete. Third ed. Edward Arnold Ltd.,  
LIMA, I.; APPOLONI, C.; DE OLIVEIRA, L., LOPES, R. T. **Caracterização de materiais cerâmicos através da microtomografia computadorizada 3D.** Revista Brasileira de Arqueometria, Restauração e Conservação, v. 1, n. 2, p. 22-27, 2007.

LUO, M.; QIAN, C.; LI, R. **Factors affecting crack repairing capacity of bacteria-based self-healing concrete.** Construction and Building Materials, v. 87, p. 1-7, 2015.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P.V.; CLARL, D. P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 12<sup>a</sup> Edição: 2010.

MARVASI, M.; DAVILA-VARQUEZ, Y. C.; MARTINEZ, L. C. **Supplemental Materials for Laboratory Activivy to Effectively Teach Introductory Geomicrobiology Concepts to Non-Geology Majors**. Journal of Microbiology e Biology Education, v. 14, n. 2, p. 206-212, 2013.

MARVASI, M.; VISSCHER, P. T.; PERITO, B.; MASTROMEI, G.; CASILLAS-MARTÍNEZ, L. **Physiological requirements for carbonate precipitation during biofilm development of *Bacillus subtilis* etfA mutant**. FEMS Microbiology Ecology, v. 71, n. 3, p. 341-350, 2010.

MAURÍCIO, A.; PEREIRA, M.; FLORES-COLEN, I.; SILVA, L.; FONTES, A. **Microtomografia computadorizada de raios x aplicada ao estudo de argamassas**. Congresso Português de Argamassa e Etics. Portugal, 2012.

MEHTA, P. K.; MONTEIRO, P. J. M. **Concreto: Microestrutura, propriedades e materiais**. São Paulo: IBRACON, 2<sup>o</sup> Edição em Português, 2014.

MONTOYA, C.; MARQUEZ, M. A.; LOPEZ, J. M.; CUERVO, C. **Characterization of calcite bioprecipitated by a native *Bacillus subtilis* isolate**. Revista Colombiana de Biotecnologia, v. 2, 2005

MORAES, M. Q. **Contribuição aos estudos da influência da nano sílica nas propriedades mecânicas e na trabalhabilidade de concretos para produção em centrais e para fabricação de pré-moldados**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, p. 145. 2012.

MORAVIA, W. G.; OLIVEIRA, C. A. S.; GUMIERI, A. G.; VASCONCELOS, W. L. **Microstructural evaluation of expanded clay to be used as lightweight aggregate in structural concrete**. Cerâmica, v. 52, n. 322, 193-199, 2006.

MORAVIA, W. G.; OLIVEIRA, C. A. S.; GUMIERI, A. G.; VASCONCELOS, W. L. **Caracterização microestrutural da argila expandida para aplicação como agregado em concreto estrutural leve**. Cerâmica, v. 52, p. 193-199, 2006.

NEVILLE, A. M.; BROOKS, J. J. **Tecnologia do Concreto Propriedades do Concreto**. 2<sup>o</sup>. ed. Porto Alegre: Bookman, 2013.

NITA, C.; JOHN V. M. **Materiais pozolânicos: o metacaulim e a sílica ativa**. Boletim Técnico da Escola Politécnica da USP. Departamento de Engenharia de Construção Civil; BT/PCC/451, São Paulo, EPUSP, p. 8-9, 2007.

OGINO, T.; SUZUKI, T.; SAWADA, K. **The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water**. Geochimica et Cosmochimica Acta, v. 51, n. 10, p. 2757-2767, 1987.

OLIVEIRA, A. A. de. **Inativação de endósporos bacterianos com fotossensibilizadores porfirínicos**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro, Portugal, 2008.

ONİYAMA, E.; WAHLBECK, P. G. **Application of transpiration theory to TGA data: calcium carbonate and zinc chloride.** *Thermochimica acta*, v. 250, p. 41-53, 1995.

PADE, C.; GUIMARAES, M. **The CO<sub>2</sub> uptake of concrete in a 100 year perspective.** *Cement and Concrete Research*, v. 37, n. 9, p. 1348-1356, 2007.

PAN, X.; LIU, Z.; CHEN, Z.; CHENG, Y.; PAN, D.; SHAO, J.; GUAN, X. **Investigation of Cr (VI) reduction and Cr (III) immobilization mechanism by planktonic cells and biofilms of *Bacillus subtilis* ATCC-6633.** *Water research*, v. 55, p. 21-29, 2014.

PARK, S. J.; PARK, J. M.; KIM, W. J.; GHIM, S. Y. **Application of *Bacillus subtilis* 168 as a multifunctional agent for improvement of the durability of cement mortar.** *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, p. 1568-1574, 2012.

PEI, R., LIU, J.; WANG, S.; YANG, M. **Use of bacterial cell walls to improve the mechanical performance of concrete.** *Cement e Concrete Composites*, v. 39, p. 122–130, 2013.

PERITO, B.; MARVASI, M.; BARABESI, C.; MASTROMEI, G.; BRACCI, S.; VENDRELL, M.; TIANO, P. **A *Bacillus subtilis* cell fraction (BCF) inducing calcium carbonate precipitation: biotechnological perspectives for monumental stone reinforcement.** *Journal of Cultural Heritage*, v. 15, n. 4, p. 345-351, 2014.

PESSÔA, J. R. de C.; DOMINGUÉZ, J. S.; CARVALHO, G. DE.; ASSIS, J. T. DE. **Porosidade do Concreto Determinada por Microtomografia com Raio X e Processamento de Imagem.** *Engenharia Estudo e Pesquisa*, v. 14, n. 2, p. 20-26, 2014.

PORCHERON, F.; MONSON, P. A. **Modeling mercury porosimetry using statistical mechanics.** *Langmuir*, V. 20, p. 6482-6489, 2004.

PRIESTER, J. H.; HORST, A. M.; VAN DE WERFHORST, L. C.; SALETA, J. L.; MERTES, L. A.; HOLDEN, P. A. **Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy.** *Journal of Microbiological Methods*, v. 68, n. 3, p. 577-587, 2007.

RAMACHANDRAN, S.K.; RAMAKRISHNAN, V.; BANG, S.S. **Remediation of concrete using micro-organisms.** *ACI Materials Journal*, v. 98, p. 3–9, 2001.

RAMAKRISHNAN, V. **Performance characteristics of bacterial concrete—a smart biomaterial.** *Proceedings of the First International Conference on Recent Advances in Concrete Technology*, Washington, DC, p. 67–78, 2007.

REDDY, S., RAO, M., APARNA, P., & SASIKALA, C. **Performance of standard grade bacterial (*Bacillus subtilis*) concrete.** *Asian J Civ Eng (Build Housing)*, v. 11, p. 43-55, 2010.

RICHARD, P.; CHEYREZY, M. **Composition of reactive powder concretes.** *Cement and Concrete Research*, v. 25, n. 7, p. 1501-1511, 1995.

RICHARDSON, I. G. **The calcium silicate hydrates**. Cement and concrete research, v. 38, n. 2, p. 137-158, 2008.

RODRIGUEZ-NAVARRO, C.; RODRIGUEZ-GALLEGO, M.; BENCHEKROUN, K.; GONZALEZ-MUNOZ, M.T. **Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization**. Applied and Environmental Microbiology, v. 69, p. 2182–2193, 2003.

SAMPAIO, J. A.; ALMEIDA, S. L. **Calcário e dolomito**. Rochas e Minerais Industriais, v. 1, 2005.

SCHLANGEN, E.; SANGADJI, S. **Addressing infrastructure durability and sustainability by self healing mechanisms-Recent advances in self healing concrete and asphalt**. Procedia Engineering, v. 54, p. 39-57, 2013.

SCHMITT, M. **Caracterização do Sistema Poroso de Rochas Selantes combinando-se Adsorção de Nitrogênio e Intrusão de Mercúrio**. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2009.

SILVA, I. J. D. **Contribuição ao Estudos dos Concretos de Elevado Desempenho: Propriedades Mecânicas, Durabilidade e Microestrutura**. USP. São Carlos, 2000

STOCKS-FISCHER, S.; GALINAT, J.K.; BANG, S.S. **Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>**. Soil Biology and Biochemistry, v. 31, p. 1563–1571, 1999.

STUMM, W. e MORGAN, J. J. *Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural Waters*, V. 126, 2012.

TAFT, W. H. **Carbonate rocks**. In Developments in Sedimentology (eds. G. V. CHILINGAR, H. J. BISSELL and R. W. FAIRBRIXE), Vol. 99. Chap. 3, pp. 15 I-167, 1967.

TAYLOR, H. F. W. **Cement chemistry**. London: Thomas Telford, 1997. 199p.

TEIXEIRA, M. G. **Aplicação de conceitos da ecologia industrial para a produção de materiais ecológicos: O exemplo do resíduo de madeira**. Dissertação de Merstrado apresentada à Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

TIANO, P.; BIAGIOTTI, L.; MASTROMEI, G. **Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation**. Journal of microbiological methods, v. 36, n. 1, p. 139-145, 1999.

VAN TITTELBOOM, K.; DE BELIE, N.; DE MUYNCK, W.; VERSTRAETE, W. **Use of bacteria to repair cracks in concrete**. Cement and Concrete Research, v. 40, p. 157-166, 2010.

VAN TITTELBOOM, K.; GRUYAERT, E.; RAHIER, H.; DE BELIE, N. **Influence of mix composition on the extent of autogenous crack healing by continued hydration or calcium carbonate formation**. Construction and Building Materials, v. 37, p. 349–359, 2012.

WEN, Y.; XIANG, L.; JIN, Y. **Synthesis of plate-like calcium carbonate via carbonation route**. Materials Letters, v. 57, n. 16-17, p. 2565-2571, May 2003.

WIKTOR, V.; JONKERS, H. M. **Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete.** Cement e Concrete Composites, v. 33, p. 763–770, 2011.

WRAY, J. L.; DANIELS, F. **Precipitation of calcite and aragonite.** Journal of the American Chemical Society, v. 79, n. 9, p. 2031-2034, 1957.

XIANG, L.; XIANG, Y.; WANG, Z. G.; JIN, Y. **Influence of chemical additives on the formation of super-fine calcium carbonate.** Powder Technology, v. 126, n. 2, p. 129-133, 2002.

XU, J.; YAO, W. **Multiscale mechanical quantification of self-healing concrete incorporating non-ureolytic bacteria-based healing agent.** Cement and Concrete Research, v. 64, p. 1-10, 2014.

XU, J.; YAO, W.; JIANG, Z. **Non-ureolytic bacterial carbonate precipitation as a surface treatment strategy on cementitious materials.** Journal of Materials in Civil Engineering, v. 26, n. 5, p. 983-991, 2013.

YAMAGUCHI, T.; MURAKAWA, K. **Preparation of spherical CaCO<sub>3</sub> (vaterite) powder transition to calcite in water.** Zairyo, v. 30, p. 856-860, 1981.