

Biocimentação de compósitos cimentícios mediante adição de esporos de *Bacillus subtilis* AP91

Biocimentation of cementitious composites by addition of *B. subtilis* AP91 spores

Nicole Schwantes-Cezario(1); Geovana Souza Ferreira Nogueira(2); Berenice Martins Toralles(3)

1 Mestre em Engenharia de Edificações e Saneamento pela Universidade Estadual de Londrina – UEL, Rodovia Celso Garcia CID, KM 380, Londrina – Paraná, Brasil. E-mail: nicoleschwantes@hotmail.com.

2 Mestranda em Engenharia Civil pela Universidade Estadual de Londrina, Brasil.
E-mail: geovanasouzanogueira@gmail.com

3 Doutora em Engenharia de Canais e Portos pela Universidade Politécnica de Catalunha. Professora na Universidade Estadual de Londrina, Brasil. E-mail: betoralles@gmail.com

Revista de Engenharia Civil IMED, Passo Fundo, vol. 4, n. 2, p. 142-158, Jul.-Dez. 2017 - ISSN 2358-6508

[Recebido: Ago. 04, 2017; Aceito: Dez. 14, 2017]

DOI: <https://doi.org/10.18256/2358-6508.2017.v4i2.2072>

Endereço correspondente / Correspondence address

Berenice Martins Toralles
Universidade Estadual de Londrina – UEL, Rodovia Celso
Garcia CID, KM 380, Londrina – Paraná, Brasil

Sistema de Avaliação: *Double Blind Review*
Editor-chefe: Luciana Oliveira Fernandes

Como citar este artigo / How to cite item: [clique aqui! / click here!](#)

Resumo

A durabilidade dos compósitos cimentícios está intimamente ligada à sua porosidade, sendo que quanto mais poroso um material é, mais susceptível ele está à ação de intempéries. 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 (CaCO_3). Estes cristais funcionam como um preenchimento de poros, evitando a deterioração precoce desses materiais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a biocimentação em compósitos cimentícios de traço de 1:1 (aglomerante:areia) em massa e consistência de 260 ± 10 mm com diferentes incorporações, como: sílica ativa (SA), nanossílica dispersa em policarboxilato (NDP) e esporos de *B. subtilis* isolado no Brasil, a fim de verificar se os esporos têm capacidade de precipitar CaCO_3 na presença destes materiais. Foram feitas análises de resistência à compressão, absorção de água, índice de vazios e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), a fim de avaliar a biocimentação a partir da precipitação de CaCO_3 . Com os resultados destes ensaios verificou-se que a aplicação das bactérias nos compósitos foi eficiente, pois proporcionou um aumento de até 10% na resistência à compressão e uma diminuição da absorção de água e do índice de vazios de até 10%, quando comparados com as referências, sem adição dos microrganismos. Além disso, a precipitação de CaCO_3 nos compósitos com adição de esporos bacterianos foi verificada por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Palavras-chave: Biocimentação. Compósitos cimentícios. *B. subtilis*. Precipitação de CaCO_3 .

Abstract

The durability of cementitious composites is closely related to their porosity, being that the more porous a material is, the more susceptible it is to the action of weathering. In order to reduce porosity in cementitious materials, bacteria of the *Bacillus* genus are being used as self-healing agent from the precipitation of calcium carbonate crystals (CaCO_3). These crystals function as a pores filling, preventing their early deterioration. The aim of this study was to evaluate the biocementation in cementitious composites with binder to sand ratio 1:1 (by weight) and a consistency of 260 ± 10 mm with different incorporations, such as: silica fume (SF), nanosilica dispersed in polycarboxylate (NDP) and spores of *B. subtilis* isolated in Brazil. Analyzes of compressive strength, water absorption, void index and Scanning Electron Microscopy (SEM) were performed to evaluate the biocementation from the precipitation of CaCO_3 . With the results of these tests, it was verified that the application of the bacteria to the composites was efficient, as it provided an increases of up to 10% in compressive strength and a decrease in water absorption and in the voids index of up to 10%, when compared with the reference, without the addition of microorganisms. Furthermore, Scanning Electron Microscopy (SEM) verified the CaCO_3 precipitation in the composites with addition of bacterial spores.

Keywords: Biocementation. Cementitious composites. *B. subtilis*. Calcium carbonate precipitation.

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 *American Concrete Institute (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 condições em serviço.

Uma das propriedades que influencia na durabilidade e na resistência dos compósitos cimentícios é a porosidade, sendo que existe uma razão inversamente proporcional entre a porosidade do material e sua resistência à compressão, ou seja, quanto maior a porosidade de um compósito, menor é sua resistência à compressão. Em materiais multifásicos, como os compósitos cimentícios, a porosidade de cada componente da microestrutura acaba se tornando um fator limitante da resistência à compressão do material (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 precipitação de cristais de carbonato de cálcio (CaCO_3) em materiais cimentícios a partir de dois metabolismos principais, através da hidrólise da ureia ou pela mudança de pH. Em ambos os metabolismos, as bactérias utilizam uma fonte de gás carbônico (CO_2) e uma de cálcio (Ca) para promover esta precipitação. Estes cristais atuam como agentes biocimentantes e proporcionam a autocicatrização de poros e fissuras nos compósitos cimentícios, evitando sua deterioração precoce e os protegendo não apenas dos desgastes sofridos pela entrada de água, mas também por outras substâncias deletérias, como cloretos, ácidos e sulfatos (JONKERS *et al.*, 2010; GEORGE; JIN LI, 2010).

Dentre as bactérias utilizadas nas pesquisas, destaca-se a *B. subtilis*, que é estudada na produção de calcita, forma cristalina de CaCO_3 , em meios com uma fonte de cálcio. Esta bactéria é produtora de uma variedade de enzimas e se reproduz facilmente em grande proporção, sendo que no seu crescimento as células são capazes de produzir esporos e biofilme (MONTTOYA *et al.*, 2005).

De acordo com Ghosh *et al.* (2009), Chahal *et al.* (2012) e Chahal e Siddique (2013) as bactérias são adicionadas aos materiais cimentícios em concentrações e estas influenciam principalmente nas propriedades no estado endurecido. Dentre as concentrações já estudadas na literatura, a concentração de 10^5 células/ml adicionada na água de amassamento foi a que apresentou melhores desempenhos quanto à resistência à compressão, com aumentos de até 22% nessa propriedade, e reduções de até 27% na absorção de água, que está intimamente ligada com a porosidade do material.

Diante do exposto, a pesquisa teve como objetivo estudar a influência da biocimentação promovida pela bactéria *Bacillus subtilis* AP91 nas propriedades mecânicas e microestruturais de compósitos cimentícios com incorporações de sílica.

2 Materiais e métodos

O trabalho experimental consiste em fazer um comparativo entre quatro compósitos cimentícios com diferentes incorporações, nos quesitos mecânicos e microestruturais.

2.1 Materiais

Os materiais empregados para o desenvolvimento do experimento foram: areia quartzosa de rio, Cimento Portland de alta resistência inicial (CP V-ARI), sílica ativa (SA), nanossílica dispersa em aditivo superplastificante à base de policarboxilato (NPD) e solução tampão fosfato (formulada de acordo com a Tabela 1) com 10^5 esporos/ml da bactéria *B. subtilis* AP91. Cabe ressaltar que a bactéria *B. subtilis* AP91 foi isolada no Brasil e adquirida do Instituto Biológico de São Paulo.

Tabela 1. Constituintes do tampão fosfato

Características	Quantidade (g/L)	Quantidade em relação à massa de cimento (%)
Fosfato de sódio (bibásico-anidro)	1,05	0,07
Fosfato de sódio (monobásico)	0,36	0,02
Cloreto de sódio	8,17	0,51

A solução tampão fosfato foi utilizada para manter o meio isotônico para a bactéria, sendo que seu pH é de 7,2. De acordo com Ramachandran *et al.* (2001) a dispersão das bactérias em solução tampão é mais vantajosa, em termos de resistência à compressão, do que a adição de solução salina e por isso esta solução foi selecionada.

A concentração de bactéria de 10^5 esporos de *B. subtilis*/ml foi escolhida por resultar em maiores valores de resistência à compressão e menores resultados de absorção de água, de acordo com estudos realizados Ghosh *et al.* 2009, Chahal *et al.* 2012, Chahal e Siddique, 2013 e Krishnapriya *et al.* 2015.

Além disso, foi incorporado 8% de sílica ativa e adicionado 0,2% de NDP, ambas em relação à massa de cimento, pois de acordo com Nogueira (2016) estes foram os percentuais com os resultados mais viáveis para compósitos de traço 1:1 (aglomerante:areia) com consistência de 260 ± 10 mm. As especificações da sílica ativa e da nanossílica foram fornecidas pelo fabricante e estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Especificações da sílica ativa

Características	Valor
Umidade (%)	0,3
Perda ao fogo (%)	2,4
Retido na peneira 45 µm (%)	1,3
Massa específica (g/cm ³)	2,15
pH	7,7

Tabela 3. Especificações da NDP, vendida comercialmente como aditivo Silicon ns high 200

Características	Valores
Cor	Mel
Densidade relativa	1,09
Teor de sólidos convencional	48,5
Valor de pH	3,24
Teor de cloreto	< 0,1%
Teor de álcalis	-

2.2 Método

Os compósitos dosados apresentam as seguintes nomenclaturas e componentes:

- ♦ Compósito Cimentício I (CC I): cimento, sílica ativa, areia e água;
- ♦ Compósito Cimentício II (CC II): cimento, sílica ativa, areia e solução tampão fosfato com 10⁵ esporos de *B. subtilis*;
- ♦ Compósito Cimentício III (CC III): cimento, sílica ativa, areia, água e nanossílica dispersa em aditivo superplastificante à base de policarboxilato (NDP);
- ♦ Compósito Cimentício IV (CC IV): cimento, sílica ativa, areia, nanossílica dispersa em aditivo superplastificante à base de policarboxilato (NDP) e solução tampão fosfato com 10⁵ esporos de *B. subtilis*;

O trabalho buscou verificar a influência da biocimentação promovida pela adição de esporos bacterianos nas propriedades mecânicas e microestruturais de compósitos cimentícios com adição de sílica ativa e NDP. Desta forma, o CC I é a referência do CC II e o CC III é a referência do CC IV.

Cabe destacar que o intuito deste trabalho foi estudar se os esporos bacterianos, na presença de adições de sílica, teriam a capacidade de precipitação de cristais de CaCO₃, os quais têm influência direta nas propriedades dos materiais cimentícios.

2.2.1 Análise do agregado miúdo

Para a obtenção de um esqueleto granular compacto, com o menor volume de vazios, foram analisadas duas areias, média e fina. Essas areias foram ensaiadas quanto à massa unitária compactada (NBR NM 45/2006) para diferentes composições, a fim de escolher a composição com o menor índice de vazios e a maior massa unitária compactada.

A areia composta foi caracterizada quanto à composição granulométrica (NBR NM 248/2003), massa específica (NBR NM 52/2009) e absorção de água (NBR NM 30/2001).

Além disso, a fim de refinar ainda mais a microestrutura do compósito e aumentar sua resistência, foram utilizadas duas adições, de sílica ativa e nanossílica dispersa em aditivo superplastificante a base de policarboxilato.

2.2.2 Bactérias e condições de cultivo

Para obter uma solução de 10^5 esporos de *B. subtilis* AP91/ml, as bactérias foram inoculadas no meio de cultivo LB (Luria-Bertani), o qual foi armazenado sob agitação de 170 rpm e temperatura de 37°C durante 48 horas. Cabe destacar que as condições ótimas para o crescimento das bactérias do gênero *Bacillus* é entre 36°C +/- 1°C, pH de 7 +/- 0,2 e estas bactérias crescem facilmente e rapidamente em quase todos os meios de cultivo.

Após este período o meio foi centrifugado a 4.000 rpm à temperatura de 23°C durante 3 minutos, descartou-se o sobrenadante, que continha a matéria orgânica do meio e ressuspendeu-se o pellet, contendo as células bacterianas, em solução tampão fosfato com pH de 7,2. Na sequência repetiu-se o procedimento 4 vezes, para que toda matéria orgânica do meio fosse retirada.

Ao final da última lavagem das células, as mesmas foram diluídas em solução tampão e quantificadas com o uso de um espectrofotômetro, com leitura de 600 nanômetros (nm). A concentração de células foi obtida a partir da aplicação da Equação 1 (RAMACHANDRAN et al., 2001), onde X é a concentração em células/ml e Y é a leitura do espectrofotômetro, a 600 nm.

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

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.

O volume total contendo a concentração de 10^5 células de *B. subtilis* AP91/ml foi armazenado 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 ambiente, para serem utilizados na confecção dos compósitos.

2.2.3 Elaboração dos Compósitos Cimentícios

Para obter um compósito de elevado desempenho o traço utilizado foi de 1:1 (aglomerante: areia), sendo que foram incorporados 8% de SA e 0,2% de NDP, ambas em relação à massa de cimento. A consistência foi fixada em 260 mm $\pm$ 10 mm, variando a relação água/cimento (a/c) para se obter a consistência desejada. A Tabela 4 apresenta o consumo dos materiais a serem utilizados por cada compósito.

Tabela 4. Consumo de materiais para cada compósito estudado

Amostras	Cimento (g)	Sílica ativa (g)	Areia (g)	NPD (ml)	Concentração de <i>B. subtilis</i>
CC I	2999,2	260,8	3260,0	-	10 ⁵ esporos/ml
CC II	2999,2	260,8	3260,0	-	
CC III	2999,2	260,8	3260,0	5,50	10 ⁵ esporos/ml
CC IV	2999,2	260,8	3260,0	5,50	

2.2.4 Procedimento de mistura

A mistura foi preparada em misturador mecânico, onde inicialmente foi colocada uma quantidade de água ou de solução tampão fosfato contendo os esporos bacterianos, caso houvesse a adição, para umedecer o cimento. Em seguida foi colocado todo o cimento e a sílica ativa e o misturador foi ligado durante 1 minuto em velocidade baixa. Após esse tempo e sem desligar o misturador, iniciou-se a colocação gradual da areia, tomando cuidado para que esta colocação durasse no máximo 2 minutos.

Imediatamente após o término da colocação da areia, aumentou-se a velocidade para a alta, misturando os componentes por mais 1 minuto. Durante esse período foi adicionada a NDP, caso essa estiver presente no compósito em questão. Após esse tempo, desliga-se o misturador por 1 minuto e, enquanto isso, a mistura repousa coberta com um pano limpo e úmido. Após esse intervalo, o misturador foi ligado na velocidade alta por mais 1 minuto e 30s.

2.2.5 Ensaios no estado fresco e endurecido

Todos os compósitos foram ensaiados no estado fresco quanto ao índice de consistência, NBR 13276/2005, e densidade de massa, NBR 13278/2005.

Na sequência, os corpos de prova foram moldados de acordo com a NBR 7215/1997, desmoldados após 24 horas e curados de acordo com NBR 5738/2015, até as idades de ensaio.

Na Tabela 5 estão apresentados os ensaios realizados no estado endurecido, com o número de corpos de prova moldados para cada compósito, idades de ensaio e as normas que regem estes ensaios.

Tabela 5. Planejamento experimental dos ensaios no estado endurecido para cada compósito estudado

Ensaio	Dimensão dos corpos de prova	Nº de corpos de prova por idade	Idades de ensaio	Norma
Resistência à compressão	5x10cm	4	7	NBR 7215/1997
Absorção de água e índice de vazios	5x10cm	3	28	NBR 9778/2009
Microscópio Eletrônico de Varredura	1x1x1cm	1	28	-

Para os ensaios de resistência à compressão foi utilizada a Prensa Hidráulica PCE 200 PLUS, com capacidade de 200.000 kgf da marca EMIC.

A análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Micro Análise – LMEN, da Universidade Estadual de Londrina – UEL, no Microscópio modelo FEI Quanta 200. O feixe de elétrons principal foi provocado por um filamento de tungstênio cuja tensão e corrente de operação foi de 20 kV e 94 μ A, respectivamente. A amostra foi preparada com uma superfície de ouro, para a aquisição de imagens com maior qualidade.

Além disso, para verificar se haviam diferenças significativas entre as amostras, foram plotados *blockspots* para o ensaio de resistência à compressão, absorção de água e índice de vazios.

3 Resultados e discussões

3.1 Caracterização da areia

Foi realizada a composição de duas areias, uma média e uma fina, para a obtenção da maior massa unitária no estado compactado. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Massa unitária compactada da mistura

Quantidade de areia média (%)	Quantidade de areia fina (%)	Massa unitária no estado compactado (kg/dm^3)	Índice de vazios (%)
100	0	1,748	33,0
90	10	1,758	32,6
80	20	1,765	32,4
70	30	1,760	32,6
60	40	1,744	33,2
50	50	1,742	33,3

Quantidade de areia média (%)	Quantidade de areia fina (%)	Massa unitária no estado compactado (kg/dm ³)	Índice de vazios (%)
40	60	1,726	33,9
30	70	1,711	34,4
20	80	1,690	35,3
10	90	1,676	35,8
0	100	1,645	37,0

A composição adotada foi de 80% de areia média e 20% de areia fina, pois a mistura apresentou a maior massa unitária compactada, 1,765kg/dm³, e por consequência o menor índice de vazios.

Após a escolha da composição, ensaios foram realizados para determinar as características desta composição de agregados. Os resultados estão apresentados na Figura 1.

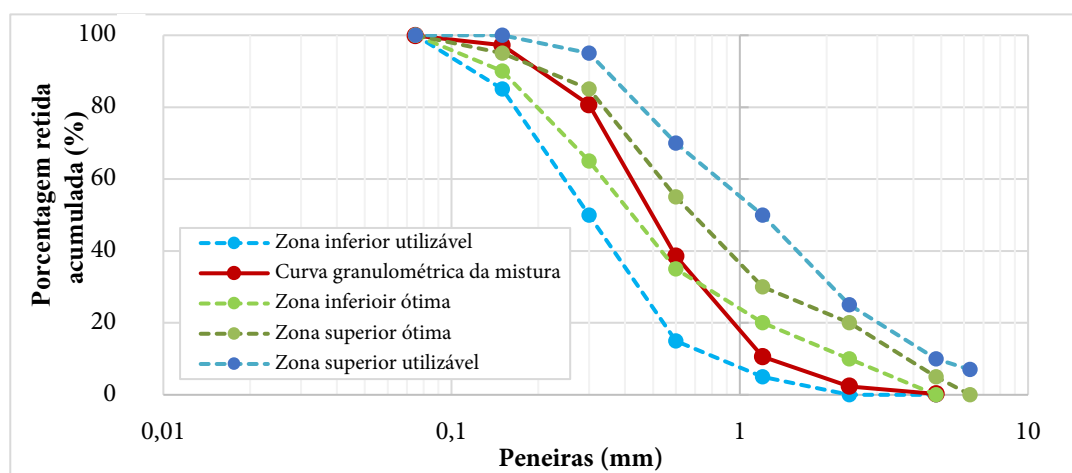


Figura 1. Curva granulométrica da mistura

De acordo com os resultados apresentados, verificou-se que o módulo de finura da composição é 2,3, o que a caracteriza como uma areia média. A massa específica encontrada foi de 2,61 g/cm³ e a absorção de água foi de 0,57%. Além disso, observou-se que a granulometria se apresentou de forma contínua e dentro dos limites utilizáveis apresentados pela norma.

3.2 Propriedades no estado fresco

3.2.1 Índice de consistência e densidade de massa

Na Tabela 7 está apresentada a quantidade de água adicionada em cada compósito para obter a consistência de 260 mm ± 10 mm, bem como os valores dos índices de consistência, a relação água/cimento (a/c), água/materiais secos (a/ms) e densidade de massa.

Tabela 7. Quantidade de água adicionada e os índices de consistência dos compósitos.

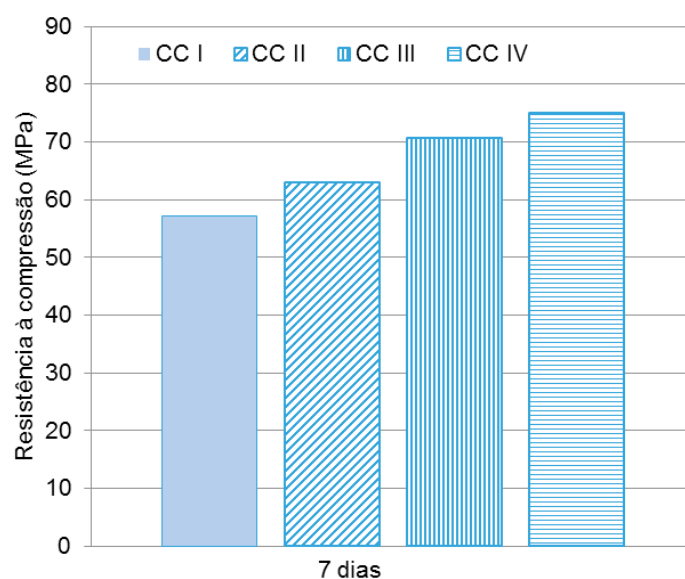
Amostras	Quantidade de água adicionada (ml)	Quantidade de solução tampão com 10^5 esporos de <i>B. subtilis</i> /ml	a/c	a/ms	Índice de consistência (mm)	Densidade de massa (g/cm^3)
CC I	1190	-	0,40	0,36	255	2,16
CC II	-	1197	0,40	0,37	262	2,15
CC III	1026	-	0,34	0,31	263	2,19
CC IV	-	1044	0,35	0,32	264	2,18

Pode-se verificar que o índice de consistência respeitou o estipulado de 260 ± 10 mm e a densidade de massa foi maior quando foi utilizada a nanossílica dispersa em aditivo superplastificante (CC III e CC IV), provavelmente pelo refinamento da microestrutura e diminuição do volume de vazios. Porém, quando os esporos bacterianos foram adicionados aos compósitos verificou-se uma diferença de $0,01 \text{ g}/\text{cm}^3$ na densidade de massa dos compósitos com adição de esporos bacterianos, comparados com suas respectivas referências, provavelmente pela atuação dos esporos ser mais efetiva no estado endurecido, pois em fresco não há tempo suficiente para estes atuarem e são raras as pesquisas que analisam a influência da adição dos esporos bacterianos no estado fresco.

3.3 Propriedades no estado endurecido

3.3.1 Resistência à compressão

A resistência à compressão dos compósitos foi medida aos 7 dias, seus resultados médios estão apresentados na Figura 2.

**Figura 2.** Resistência à compressão média aos 7 dias

Verificou-se que houve um aumento de resistência à compressão com a adição dos esporos bacterianos nos compósitos CC II e CC IV quando comparados às suas referências (CC I e CC III), esses aumentos foram de 10,0% e 6,2%, respectivamente. Corroborando com estudos realizados por Ghosh *et al.* (2009), Chahal *et al.* (2012), Chahal e Siddique (2013), em que o aumento da resistência mediante a adição de esporos bacterianos pode ter sido resultado da bioprecipitação de CaCO_3 , pois os esporos de *B. subtilis* AP91 quando estão em um ambiente alcalino e em contato com uma fonte de cálcio, involuntariamente precipitam CaCO_3 .

Para verificar se houveram diferenças significativas entre as amostras, foi elaborado um *blockspot* dos resultados de resistência à compressão, ilustrado na Figura 3.

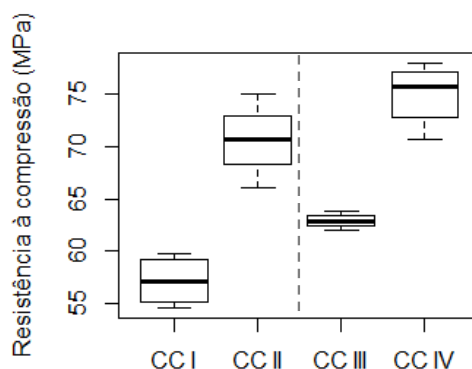


Figura 3. Blockspot dos resultados de resistência à compressão

A partir da análise da Figura 3, pode-se verificar que houveram diferenças significativas entre o CC I e o CC II. O mesmo foi observado quando comparamos o CC III e o CC IV, apontando que em ambas as situações os esporos bacterianos interferiram positivamente na resistência à compressão, provavelmente pela precipitação de CaCO_3 que já vem sendo abordada na literatura (GHOSH *et al.*, 2009; REDDY *et al.*, 2010, CHAHAL *et al.*, 2012; CHAHAL; SIDDIQUE, 2013).

3.3.2 Absorção de água e Índice de vazios

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados médios da absorção de água e do índice de vazios dos corpos de prova ensaiados aos 28 dias, assim como os desvios padrão e coeficientes de variação (CV).

Tabela 8. Resultados médios de absorção de água e índice de vazios aos 28 dias

Amostras	Absorção de água			Índice de vazios		
	Absorção de água média (%)	Desvio Padrão (%)	CV (%)	Índice de vazios médio (%)	Desvio Padrão (%)	CV (%)
CC I	8,35	0,36	4,32	16,85	0,61	3,64
CC II	8,19	0,11	1,35	16,24	0,22	1,33
CC III	7,08	0,23	3,25	14,76	0,41	2,77
CC IV	6,37	0,10	1,53	13,26	0,19	1,44

Para a melhor visualização dos resultados, os mesmos estão apresentados na forma de gráfico na Figura 4, onde as barras de erros apresentam os desvios padrão respectivos de cada compósito.

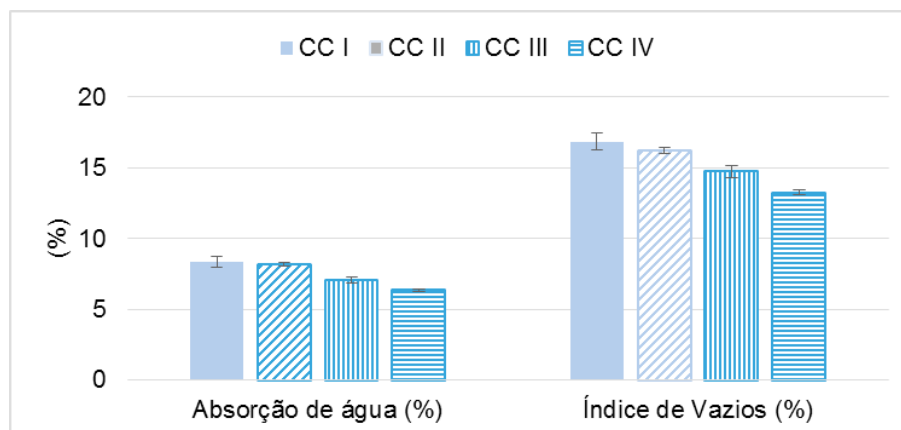


Figura 4. Gráfico da absorção de água e índice de vazios aos 28 dias

Tanto para a absorção de água quanto para o índice de vazios, verificou-se uma diminuição dos valores médios quando os esporos bacterianos foram adicionados aos compósitos cimentícios. Essa redução na absorção de água foi de 2% e 10% e no índice de vazios foi de 4% e 10%, para os compósitos CC II e CC IV, quando comparados aos compósitos CC I e CC III, respectivamente. Essas diminuições podem ter sido ocasionadas pela precipitação de CaCO_3 promovidas pelos esporos de *B. subtilis* AP91. Cabe ressaltar que esses resultados corroboram com o apresentado por Chahal *et al.* (2012), Abo-El-Enien *et al.* (2013) e Chahal e Siddique (2013).

Para facilitar a análise e verificar se houveram diferenças significativas entre os compósitos com adição de esporos bacterianos e suas respectivas referências, foram elaborados *blockspots*. Os mesmos estão apresentados nas Figuras 5 e 6.

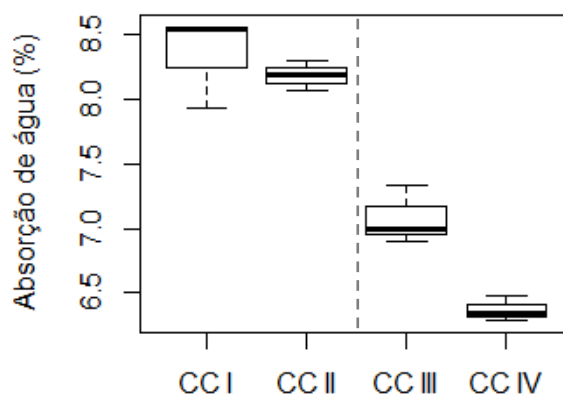


Figura 5. Blockspot dos resultados da absorção de água

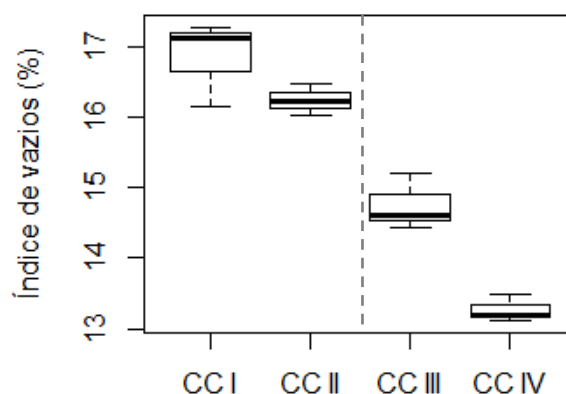


Figura 6. Blockspot dos resultados do índice de vazios

A partir da análise dos *blockposts*, observou-se que tanto para a absorção de água, quanto para o índice de vazios a adição dos esporos bacterianos apresentou diferenças significativas apenas quando comparamos o CC III e o CC IV. Cabe salientar que a diminuição da absorção de água e do índice de vazios pode ser ocasionada pelo preenchimento de poros devido a precipitação de CaCO_3 promovida pelos esporos de *B. subtilis* AP91.

3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 7 mostra os resultados obtidos na análise em MEV aos 28 dias de cura. Na primeira coluna se tem as amostras com a menor ampliação possível, de 50 vezes, mostrando toda amostra analisada. Na segunda e na terceira coluna estão representadas as superfícies das amostras com 6.000 vezes de ampliação, em áreas onde foram encontrados cristais de etringita (Etr) e o CaCO_3 produzido pelas bactérias, que tem a mesma morfologia que os cristais precipitados pela bactéria *B. subtilis* AP 91 em um estudo preliminar, realizado in vitro, sem a adição nos materiais cimentícios. No qual a bactéria estava em contato com um meio com uma fonte de cálcio e a partir da mudança de pH precipitou cristais de CaCO_3 (SCHWANTES-CEZARIO *et al.*, 2017).

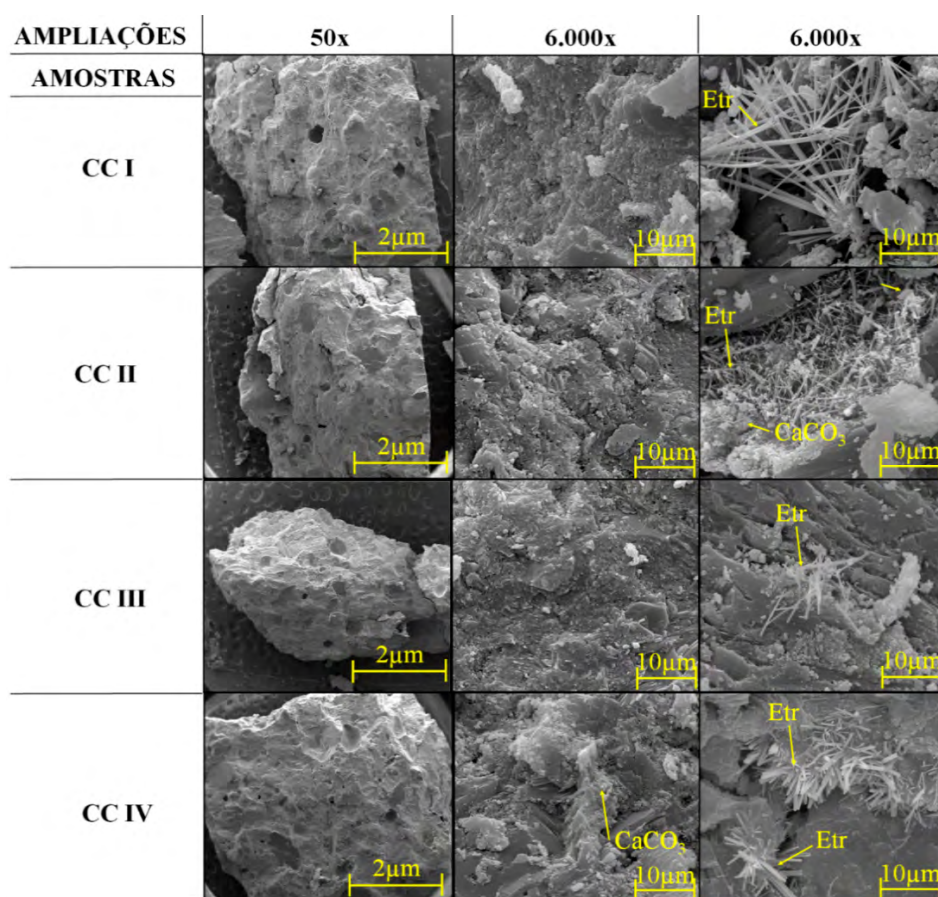


Figura 7. MEV das amostras aos 28 dias com aumentos de 50 e 6.000 vezes

A partir da análise das imagens, pode-se observar uma melhora na densidade das amostras de acordo com que sua microestrutura era refinada a partir da adição de sílica ativa, nanossílica e esporos de *B. subtilis* AP91. Além disso, as amostras em que houve adição de nanossílica, observou-se que houve pouca presença de cristais de etringita, quando comparadas ao CC I e CC II.

Por fim, apenas as amostras com adição dos esporos bacterianos (CC II e CC IV) apresentaram a precipitação de CaCO_3 , evidenciada na Figura 8. Essa precipitação provavelmente foi ocasionada a partir da mudança de pH para o alcalino, pois os materiais cimentícios apresentam um pH em torno de 12, enquanto o meio em que a bactéria estava inserida é em torno de 8.

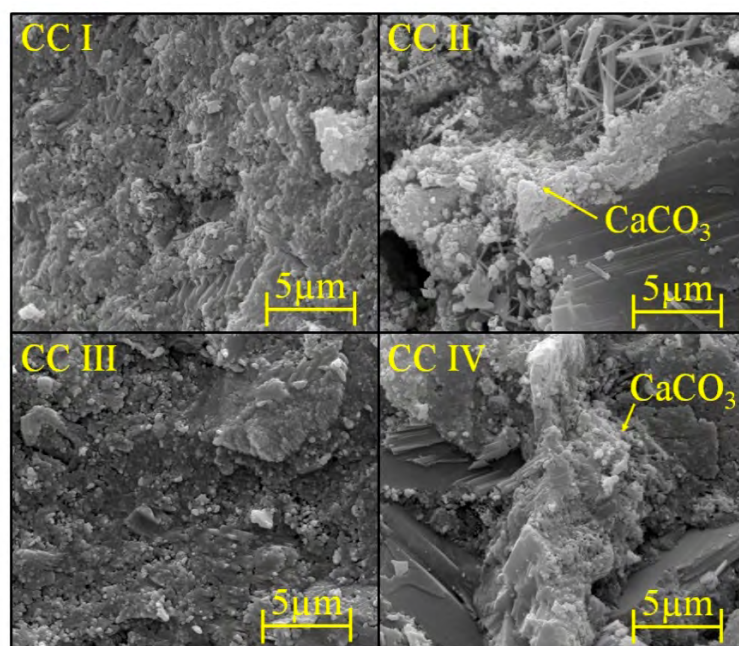


Figura 8. MEV das amostras aos 28 dias com aumento de 12.000 vezes

Além disso, os cristais precipitados tem a mesma morfologia que outros estudos apresentados na literatura (HAMMES *et al.*, 2003; BRAISSANT *et al.*, 2003; DUPRAZ *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2012; DASKALAKIS *et al.*, 2015, SCHWANTES-CEZARIO *et al.*, 2017).

4 Conclusão

A partir dos resultados obtidos na pesquisa, pode-se verificar que adição de 10^5 esporos de *B. subtilis*/ml na água de amassamento de compósitos cimentícios aumentou a resistência à compressão e reduziu a porosidade. Pois quando os esporos bacterianos foram adicionados no compósito que continha apenas a incorporação de 8% de sílica ativa (CC I), houve um aumento na resistência à compressão de 10%, uma redução na absorção de água e no índice de vazios de 2 e 4%, respectivamente. Já quando os esporos de *B. subtilis* foram adicionados ao compósito que continha a incorporação de 8% de sílica ativa e a adição de 0,2% NDP (CC III), houve um aumento na resistência à compressão de 6,2% e uma redução de 10% tanto na absorção de água quanto no índice de vazios.

Além disso, a precipitação de CaCO_3 foi verificada em MEV apenas nas amostras que continham adição de esporos de *B. subtilis* AP91, com morfologia semelhante ao apresentado na literatura. Porém este estudo é considerado como preliminar, sendo que mais análises são necessárias para a comprovação da atuação das bactérias nas propriedades dos materiais cimentícios ao longo do tempo.

Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7215**: Cimento Portland - Determinação da resistência à compressão. ABNT, 1997.

_____. **NBR NM 30**: Agregado miúdo - Determinação da absorção de água. ABNT, 2001.

_____. **NBR 13278**: Argamassa para assentamento e revestimento de paredes e tetos - Determinação da densidade de massa e do teor de ar incorporado. ABNT, 2005.

_____. **NBR 13276**: Argamassa para assentamento e revestimento de paredes e tetos - Preparo da mistura e determinação do índice de consistência. ABNT, 2005.

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

_____. **NBR NM 45**: Agregados - Determinação da massa unitária e do volume de vazios. ABNT, 2006.

_____. **NBR NM 52**: Agregado miúdo - Determinação da massa específica e massa específica aparente. ABNT, 2009.

_____. **NBR NM 248**: Agregados - Determinação da composição granulométrica. ABNT, 2011.

_____. **NBR 5738**: Concreto - Procedimento para moldagem e cura de corpos de prova. ABNT, 2011.

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.

ACI Concrete Terminology. **American Concrete Institute**: Advancing concrete knowledge, 2013. Disponível em: <https://www.concrete.org/portals/0/files/pdf/ACI_Concrete_Terminology.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2016.

ALDEA, C.M; SONG, W.J; POPOVICS, J.S. Extent of healing of cracked normal strength concrete. **Journal Mater Civil Engineer**, v. 12, n. 1, p. 92-96, 2000.

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, n. 3, p. 485-490, 2003.

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.

DASKALAKIS, M. I.; RIGAS, F.; BAKOLAS, A.; MAGOULAS, A.; KOTOULAS, G.; KATSIKIS, I.; MAVRIDOU, A. Vaterite bio-precipitation induced by *Bacillus pumilus* isolated from a solutional cave in Paiania, Athens, Greece. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 99, p. 73-84, 2015.

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

DUPRAZ, 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, n. 1, p. 44-53, 2009.1

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, 2001.

GEORGE D. O.; JIN LI. Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. **Chemosphere**, v. 81, n. 9, p. 1143-1148, 2010.

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.

HAMMES, F.; BOON, N.; DE VILLIERS, J.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S. D. Strain-Specific Ureolytic Microbial Calcium Carbonate Precipitation. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4901-4909, 2003.

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, n. 2, p. 230-235, 2010.

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.

MONTOYA, C.; MARQUEZ, M. A.; LOPEZ, J. M.; CUERVO, C. Characterization of calcite bioprecipitated by a native *Bacillus subtilis* isolate. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 7, n. 2, 2005.

NOGUEIRA, G. S. F. **A influência da incorporação de nano e micropartículas de sílica em compósitos cimentícios**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Civil) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

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, n. 11, p. 1568-1574, 2012.

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

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.

SCHWANTES-CEZARIO, N.; MEIDEIROS, L. P.; DE OLIVEIRA JR, A. G.; NAKAZATO, G. KOBAYASHI, R. K. T; TORALLES, B. M. Bioprecipitation of calcium carbonate induced by *Bacillus subtilis* isolated in Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 123, p. 200-205, 2017.