



**UNIVERSIDADE FUMEC
FACULDADE DE ENGENHARIA E ARQUITETURA
Curso de Mestrado Profissional em Processos Construtivos**

**Influência da adição de diferentes quantidades do fungicida bactericida
microbiológico à base da bactéria *Bacillus subtilis* nas propriedades mecânicas e na
microestrutura do concreto**

Francielle Martins Fernandes

**Belo Horizonte
2022**

Francielle Martins Fernandes

**Influência da adição de diferentes quantidades do fungicida bactericida
microbiológico à base da bactéria *Bacillus subtilis* nas propriedades mecânicas e na
microestrutura do concreto**

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Processos Construtivos da Universidade Fumec, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Processos Construtivos.

Área de concentração: Processos Construtivos.

Orientadora: Dra. Edna Alves Oliveira

Coorientadora: Dra. Gláucia Nolasco de Almeida Mello

Belo Horizonte
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F363i Fernandes, Francielle Martins, 1991-
Influência da adição de diferentes quantidades do fungicida bactericida microbiológico à base da bactéria *Bacillus subtilis* nas propriedades mecânicas e na microestrutura do concreto / Francielle Martins Fernandes. - Belo Horizonte, 2022.
77 f. : il.

Orientadora: Edna Alves Oliveira
Coorientadora: Gláucia Nolasco de Almeida Mello
Dissertação (Mestrado em Processos Construtivos),
Universidade FUMEC, Faculdade de Engenharia e Arquitetura,
2022.

1. *Bacillus subtilis*. 2. Concreto. 3. Ultrassom. 4. Microestrutura. I. Título. II. Oliveira, Edna Alves. III. Mello, Gláucia Nolasco de Almeida. IV. Universidade FUMEC, Faculdade de Engenharia e Arquitetura.

CDU: 691.32

ATA DA REUNIÃO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA ALUNA FRANCIELLE MARTINS FERNANDES

Aos dezesseis (16) dias do mês de setembro de dois mil e vinte e dois (2022) às 16:00 horas, sob a presidência da Profa. Dra. Edna Alves Oliveira (FUMEC), realizou-se a reunião da Comissão Examinadora indicada pelo Colegiado do Curso de Mestrado Profissional em Processos Construtivos para examinar a Dissertação intitulada: **"Influência da adição de diferentes quantidades do fungicida bactericida microbiológico à base da bactéria *Bacillus subtilis* nas propriedades mecânicas e na microestrutura do concreto"**, proposto pela aluna **Francielle Martins Fernandes** e sua orientadora Profa. Dra. Edna Alves Oliveira. Compareceram a aluna e os professores Profa. Dra. Gláucia Nolasco de Almeida Mello (Coorientadora); Prof. Dr. Luiz Antônio Melgaço Nunes Branco; Profa. Dra. Joana Darc da Silva Pinto e Prof. Dr. Henrique Nogueira Soares que compuseram a banca juntamente com a orientadora. A Senhora Presidente declarou aberta a sessão e em seguida a aluna fez a apresentação da Dissertação. Após a apresentação, procedeu-se à discussão da mesma. Ao final a dissertação foi considerada:

(x) aprovada/() reprovada por unanimidade.

Belo Horizonte, 16 de setembro de 2022.
XX

A comissão examinadora teve a seguinte composição:

Profa. Dra. Edna Alves Oliveira (Orientadora) – FEA/FUMEC;
Profa. Dra. Gláucia Nolasco de Almeida Mello (Coorientadora) - PUC Minas;
Prof. Dr. Luiz Antônio Melgaço Nunes Branco – FEA/FUMEC;
Profa. Dra. Joana Darc da Silva Pinto - PUC Minas;
Prof. Dr. Henrique Nogueira Soares - IFMG.

Edna Alves Oliveira

Luiz Antônio M. N. Branco

Henrique Nogueira Soares

Joana Darc Silva Pinto

Gláucia Nolasco de Almeida Mello

À minha amada família, especialmente
aos meus pais, João Bosco e Lucia, por
todo amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por sempre abençoar e iluminar o meu caminho.

Aos meus pais, João Bosco e Lucia, meus exemplos de vida, por nunca medirem esforços para que eu alcançasse meus objetivos. Às minhas irmãs, Karine e Thais, por todo amor e por estarem sempre ao meu lado. Eu amo vocês!

À minha orientadora Profa. Dra. Edna Alves Oliveira, que desde o início do Mestrado esteve comigo. Obrigada por toda paciência, compreensão, pelos aprendizados e por fazer com que este projeto se concretizasse.

À minha coorientadora Profa. Dra. Glaucia Nolasco de Almeida Mello, pela contribuição essencial nesta pesquisa e por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Henrique Nogueira Soares, por compartilhar o seu conhecimento, pela disponibilidade e por estar sempre presente nos meus trabalhos acadêmicos.

Ao Prof. Dr. Otávio Luiz do Nascimento por todo apoio nesta pesquisa.

Aos colegas de profissão Luiz, Samuel, Lucas, Gustavo e Guilherme pelo auxílio na realização dos ensaios experimentais.

À Universidade FUMEC, aos Professores do Mestrado em Processos Construtivos e aos colaboradores da Instituição, que tanto contribuíram para a conclusão deste ciclo.

À Supermix e toda a sua equipe, Consultare e PUC Minas, pela receptividade e por disponibilizarem os recursos para realizar a campanha experimental.

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Formulação do Problema	15
1.2	Justificativa	15
1.3	Objetivos.....	16
1.3.1	Objetivo geral	16
1.3.2	Objetivos específicos	17
1.4	Estrutura do Trabalho	17
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	18
2.1	Biomíneralização	18
2.1.1	Bioprecipitação de Carbonato de Cálcio por Bactérias	19
2.2	Influência das Bactérias Bacillus nas Propriedades dos Materiais Cimentícios	28
2.2.1	Resistência à compressão	29
2.2.2	Resistência à tração na compressão diametral.....	33
2.2.3	Análise microestrutural através do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS).....	36
3	METODOLOGIA.....	49
3.1	Materiais	49
3.2	Definição dos Traços	50
3.3	Impregnação das bactérias na argila expandida.....	50
3.4	Confecção dos Corpos de Prova	54
3.5	Ensaio por Ultrassom.....	57
3.6	Ensaio de resistência à compressão	58
3.7	Ensaio de resistência à tração por compressão diametral	59
3.8	Análise microestrutural pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) .	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
4.1	Slump Test	62
4.2	Ensaio por Ultrassom.....	62
4.3	Resistência à compressão.....	63
4.4	Resistência à tração na compressão diametral.....	64
4.5	Análise da microestrutura no MEV	65
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E FUTUROS DESENVOLVIMENTOS	72
5.1	Considerações Finais	72
5.2	Sugestões para Trabalhos Futuros	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (a) Estrutura bacteriana; (b) Parede celular carregada negativamente e a presença de íons positivos; (c) Produção do biomineral através da ligação dos íons à parede celular.....	19
Figura 2: Representação esquemática da precipitação de $CaCO_3$: (A) Atração de íons de cálcio, (B) Precipitação de $CaCO_3$, (C) Célula rodeada por $CaCO_3$ e (D) Marcas das células bacterianas.....	21
Figura 3: Imagens do MEV dos polimorfos de $CaCO_3$: (a) Calcita, (b) Aragonita e (c) Vaterita.....	23
Figura 4: Micrografias eletrônicas de varredura com diferentes formas dos cristais de $CaCO_3$ precipitados pela <i>Bacillus</i> sp. CR2: (a) Cloreto de cálcio, (b) Nitrato de cálcio, (c) Acetato de cálcio e (d) Óxido de cálcio.....	24
Figura 5: Esporângio de <i>Bacillus</i> com endósporo.....	25
Figura 6: Células vegetativas do <i>Bacillus</i>	25
Figura 7: Funcionalidade da bactéria no concreto: (a) Parede celular com carga negativa da bactéria, (b) Íons de cálcio positivos atraídos para a parede celular e (c) $CaCO_3$ ao redor da parede celular bacteriana.....	27
Figura 8: Fases sólidas da pasta de cimento hidratada obtida pelo MEV (A) Cristais de hidróxido de cálcio, (B) Silicato de cálcio hidratado e (C) Etringita.....	38
Figura 9: MEV com ampliação de 6.000x das amostras com 7 dias de cura (A) AR, (B) AR_TF, (C) AB_IM e (D) AB_AM.	39
Figura 10: MEV com ampliação de 12.000 x das amostras aos 28 dias de cura (A) AR, (B) AR_TF, (C) AB_IM e (D) AR_AM.	40
Figura 11: EDS das argamassas aos (a) e (b) 7 dias e (c) aos 28 dias.....	41
Figura 12: MEV das amostras referências com ampliação de (A) 250x, (B) 1000x, (C) 500x e (D) 2000x.	42
Figura 13: MEV amostras bacterianas com ampliação de (A) 250x, (B) 1000x, (C) 500x e (D) 2000x.....	43
Figura 14: Espectrometria de argamassas (a) AR antes da cura, (b) AB antes da cura, (c) AR após a a cura e (d) AB após a cura.....	44
Figura 15: MEV da argamassa bacteriana submersa (a) Aglomerados de calcita com formato de halteres, (b) e (c) Calcita com formato de romboedros lamelares deformados...	45
Figura 16: MEV em amostras de concreto (A) <i>Bacillus subtilis</i> e (B) <i>Bacillus megaterium</i>	46
Figura 17: MEV das amostras após 28 dias de cura (a) Amostra referência, (b) Amostra referência imersa em solução, (c) e (d) Amostras bacterianas.....	47
Figura 18: Difractograma de DRX das precipitações na superfície das amostras.	47
Figura 19: Equipamentos para o ensaio granulométrico da argila expandida (A) Agitador eletromagnético de peneiras e (B) Peneiras.	51
Figura 20: (A) Ureia, (B) Lactato de cálcio e (C) Serenade.....	52
Figura 21: Argila expandida imersa em 500 mL (bacia maior – à esquerda) e 250 mL (bacia menor – à direita) da solução bacteriana.....	53
Figura 22: Argila expandida bacteriana: (A) e (B) sem o excesso de líquido; (C) e (D) dentro da estufa.	53

Figura 23: Confecção do bioconcreto – (A) Materiais inseridos na betoneira; (B) Mistura homogênea	55
Figura 24: Slump test dos traços do bioconcreto.....	56
Figura 25: Confecção dos Corpos de Prova (A) Formas para moldagem dos corpos de prova cilíndricos, (B) Confecção dos CPs e (C) CPs moldados.	57
Figura 26: Ensaio de ultrassom - (A) CP preparado com uma fina camada de acoplante e o equipamento; (B) Transdutores acoplados no CP com medição direta.	58
Figura 27: Ensaio de resistência à compressão – (A) Corpos de prova retificados; (B) Prensa hidráulica Forney; (C) Início da ruptura do CP.	59
Figura 28: Prensa Universal da marca EMIC utilizada para realizar o ensaio de resistência à tração por compressão diametral.	60
Figura 29: Fragmentos do bioconcreto para análise microestrutural – (A) Traço referente a 250 mL de Serenade; (B) Traço com 500 mL de Serenade; (C) Arranjo para análise.	61
Figura 30: Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).	61
Figura 31: MEV das amostras secas com 250 mL do produto Serenade (A) CB_250(1) com ampliação de 1000x, (B) CB_250(1) com ampliação de 3000x, (C) CB_250(2) com ampliação de 750x e (D) CB_250(2) com ampliação de 3000x.	66
Figura 32: MEV das amostras secas com 500 mL do produto Serenade (A) CB_500(1) com ampliação de 1500x, (B) CB_500(1) com ampliação de 3000x, (C) CB_500(2) com ampliação de 1500x e (D) CB_500(2) com ampliação de 4000x.	67
Figura 33: MEV das amostras úmidas com 250 mL do produto Serenade (A) CB_250(U) com ampliação de 1000x, (B) CB_250(U) com ampliação de 1200x, (C) CB_250(U) com ampliação de 2000x e (D) CB_250(U) com ampliação de 3000x.	68
Figura 34: MEV das amostras úmidas com 500 mL do produto Serenade (A) CB_500(U1) com ampliação de 1200x, (B) CB_500(U1) com ampliação de 3000x, (C) CB_500(U1) com ampliação de 5000x e (D) CB_500(U2) com ampliação de 2000x.....	69
Figura 35: EDS das amostras secas (A) CB_250 e (B) CB_500.....	70
Figura 36: EDS das amostras úmidas (A) CB_250(U) e (B) CB_500(U).	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Influência da adição de bactérias do gênero Bacillus na resistência à compressão de materiais cimentícios.	30
Tabela 2: Influência da adição de bactérias do gênero Bacillus na resistência à tração de materiais cimentícios.	34
Tabela 3: Traços dos corpos de prova de concreto.....	50
Tabela 4: Quantitativos dos materiais.	54
Tabela 5: Resultados do ensaio ultrassônico.	62
Tabela 6: Relação entre a velocidade de propagação da onda e qualidade do concreto.	63
Tabela 7: Resultados da Resistência à compressão-.....	63
Tabela 8: Resultados da Resistência à tração na compressão diametral.	64

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$CaCO_3$	Carbonato de Cálcio
Ca	Cálcio
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
$CaSO_4$	Sulfato de cálcio
CO_2	Gás carbônico
CID	Carbono Inorgânico Dissolvido
H_2CO_3	Ácido carbônico
H_2COOH	Carbamato
EDS	Espectroscopia por Energia Dispersiva
MBI	Mineralização Biologicamente Induzida
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MBC	Mineralização Biologicamente Controlada
NH_3	Amônia

FERNANDES, F. M. **Influência da adição de diferentes quantidades do fungicida bactericida microbiológico à base da bactéria *Bacillus subtilis* nas propriedades mecânicas e na microestrutura do concreto.** Dissertação (Mestrado Profissional em Processos Construtivos) – Universidade FUMEC, Belo Horizonte, 2022.

RESUMO

A elevada tendência à fissuração do concreto o torna susceptível ao contato com muitos agentes internos e/ou externos, que podem agir e gerar manifestações patológicas na estrutura. Neste contexto, o estudo do fenômeno de autocura do concreto por meio de bactérias vem se destacando. As bactérias do gênero *Bacillus subtilis* em contato com uma fonte de cálcio podem precipitar cristais de carbonato de cálcio, preenchendo as microfissuras existentes nos materiais cimentícios. O objetivo deste trabalho foi analisar a influência da adição de 500 mL e 250 mL do fungicida bactericida microbiológico à base da bactéria *Bacillus subtilis* na resistência à compressão axial e à tração por compressão diametral e na microestrutura do concreto. Para a confecção do bioconcreto foi utilizado o traço de 1:2,538:1,102, com substituição de 30% do agregado graúdo pela argila expandida impregnada com bactéria e relação água/cimento de 0,5 para 500mL do produto Serenade e para 250mL a relação a/c foi de 0,545. Após o tempo de cura, os corpos de prova (CP) do bioconcreto foram submetidos ao ensaio não destrutivo (por meio de ultrassom), os quais apresentaram bons resultados, e aos testes experimentais destrutivos para determinar a resistência à compressão e à tração por compressão diametral. A resistência à compressão média dos CP's do bioconcreto com 500 mL de Serenade foi 27,97 MPa, o que corresponde a um resultado de, aproximadamente, 20% superior dos CP's de bioconcreto com 250 mL de Serenade. Já a resistência à tração por compressão diametral média dos CPs contendo 250 mL do fungicida bactericida biológico foi de 8,76 MPa, correspondendo a um resultado de aproximadamente, 17% superior dos CP's que continham 500 mL do Serenade. Posteriormente, as amostras rompidas secas e umedecidas com água foram analisadas por meio do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Observaram-se alguns cristais de carbonato de cálcio, especialmente nos fragmentos úmidos. Por fim, os corpos de prova do concreto bacteriano tiveram um bom desempenho nas propriedades analisadas.

Palavras-chave: Bioconcreto, Resistência à compressão, Resistência à tração por compressão diametral, Ultrassom, Microestrutura.

FERNANDES, F, M. Influence of the addition of different amounts of the microbiological bactericidal fungicide based on the bacterium *Bacillus subtilis* on the mechanical properties and on the microstructure of concrete. Dissertation (Master Professional Degree on Constructions Process) – Universidade FUMEC, Belo Horizonte, 2022.

A B S T R A C T

The high tendency of concrete to crack makes it susceptible to contact with many internal and/or external agents, which can act and generate pathological manifestations in the structure. In this context, the study of the phenomenon of self-healing of concrete by means of bacteria has been highlighted. Bacteria of the genus *Bacillus subtilis* in contact with a source of calcium can precipitate calcium carbonate crystals, filling the existing microcracks in cementitious materials. The objective of this work was to analyze the influence of the addition of 500 mL and 250 mL of the microbiological bactericidal fungicide based on the bacterium *Bacillus subtilis* on the strength of axial compression and tensile strength by diametral compression, and on the microstructure of concrete. For the preparation of the bioconcrete, a mixture of 1:2,538:1,102 was used, replacing 30% of the coarse aggregate by the expanded clay impregnated with bacteria and, water/cement ratio of 0,5 for 500mL of the Serenade product and for 250mL the ratio w/c was 0,545. After the curing time, the specimens of the bioconcrete were submitted to the non-destructive test (using ultrasound), which showed good results, and to the destructive experimental tests to determine the compressive and tensile strengths by compression. diametral. The average compressive strength of the specimens of bioconcrete with 500 mL of Serenade was 27,97 MPa, which corresponds to a result of approximately 20% higher than the specimens of bioconcrete with 250 mL of Serenade. The average diametrical tensile strength of specimens containing 250 mL of the biological bactericidal fungicide was 8,76 MPa, corresponding to a result of approximately 17% higher than the specimens that contained 500 mL of Serenade. Subsequently, the ruptured samples, dried and moistened with water, were analyzed using a Scanning Electron Microscope (SEM). Some calcium carbonate crystals were observed, especially in the wet fragments. Finally, the bacterial concrete specimens had a good performance in the analyzed properties.

Keywords: Bioconcrete, Compressive strength, Tensile strength by diametral compression, Ultrasound, Microestrutural.

1 INTRODUÇÃO

O concreto possui funções indispensáveis em vários setores e no da construção civil, ele é um dos materiais mais utilizados. Apesar das diversas vantagens como elevada resistência à compressão, durabilidade, compatibilidade com as barras de reforço, facilidade de manuseio e baixo custo, o concreto possui alta tendência à fissuração (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016). Através das fissuras, vários agentes internos e/ou externos podem agir em uma estrutura gerando manifestações patológicas na mesma e interferindo no seu desempenho, na sua durabilidade e vida útil.

Os tratamentos para fissuras e poros no concreto são divididos em ativo e passivo. Enquanto o último pode curar apenas fissuras na superfície, o primeiro consegue tratar fissuras internas e externas (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016). No método passivo o reparo será realizado após a detecção das fissuras e assim os agentes de cura agem de fora para dentro das mesmas. Já no ativo, o processo de reparo acontece pelo próprio concreto, por meio da autocura, ocorrendo de dentro para fora (WANG; DE BELIE; VERSTRAETE, 2012).

O fenômeno de autocura em materiais cimentícios é conhecido há muitos anos. Esses materiais sob determinadas circunstâncias são capazes de repararem suas microfissuras com produtos químicos (LV; CHEN, 2013). Entre algumas alternativas de métodos de autocura, a biomineralização vem se destacando. Nesse processo pode ocorrer a produção de minerais por seres vivos, entre eles, o carbonato de cálcio ($CaCO_3$), que é muito compatível com materiais cimentícios (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016).

As bactérias são agentes promissores de autocura para fissuras e as do gênero *Bacillus* são utilizadas para produção de carbonato de cálcio. Na presença de uma fonte de cálcio (Ca), o processo de mineralização induzida biologicamente pode precipitar os cristais de $CaCO_3$, que promovem a autocicatrização das fissuras e dos poros nos materiais cimentícios (JONKERS et al., 2010; SCHWANTES, 2017; SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016).

Bacillus Subtilis é uma cepa de bactérias gram-positivas do gênero *Bacillus* e podem ser encontradas na camada superior do solo. Elas são capazes de formar endosporos dormentes muito resistentes à falta de nutrientes e a estresses ambientais

(NAIN et al., 2019). Essas bactérias por serem não patogênicas e capazes de sobreviver a ambientes extremos, vem sendo estudadas para a auto cicatrização do concreto, com a finalidade de obter um melhor desempenho, durabilidade e vida útil do mesmo.

Dessa forma, essa pesquisa propõe contribuir com o desenvolvimento da utilização de microrganismos em matrizes cimentícias, por meio da análise do método de biomineralização na Engenharia Civil, mediante a precipitação de $CaCO_3$ através das bactérias *Bacillus Subtilis* incorporadas ao concreto.

1.1 Formulação do Problema

Como o estudo da eficiência da incorporação das bactérias *Bacillus Subtilis* à matriz cimentícia pode contribuir e desenvolver ferramentas para uma maior durabilidade e um maior desempenho das estruturas de concreto e para o meio ambiente?

1.2 Justificativa

Uma das desvantagens do concreto é a sua vulnerabilidade em fissurar devido à sua baixa resistência à tração, a diferentes ações de cargas e a fatores não relacionados à carga, como retração plástica, tensões térmicas entre outros (GUPTA; PANG; KUA, 2017). O aparecimento de fissuras além de diminuir a resistência, também, permite a entrada de agentes nocivos ao concreto. Para reparar as microfissuras, os tratamentos de superfície mais comuns utilizam polímeros orgânicos como epóxi, poliuretano, acrílico e siloxano, que possuem um certo grau de toxicidade e não são totalmente eficazes (NAIN et al., 2019).

Quando as fissuras são reparadas manualmente, alguns problemas podem ser associados à operação, como, impacto no meio ambiente, acessibilidade e custo. Os materiais de reparo utilizados possuem em sua composição cimento, que é responsável por emitir significativa quantidade de gás carbônico (CO_2) na atmosfera e, agentes de cura químicos, que podem ser incompatíveis com alguns materiais e nocivos ao meio ambiente. Além disso, microfissuras podem aparecer logo após o término da construção e serem notadas apenas em um estágio avançado, comprometendo a funcionalidade da estrutura e aumentando o valor do seu reparo. Sendo assim, métodos mais sustentáveis e

economicamente viáveis para promover a cura de fissuras são necessários (GUPTA; PANG; KUA, 2017).

A autocura, um fenômeno antigo e muito conhecido, é uma boa alternativa para ser utilizada nesses casos, uma vez que este método possui propriedades naturais de cura autógena (VAN TITTELBOOM; DE BELIE, 2013). O $CaCO_3$ é muito compatível com compostos cimentícios e pode ser precipitado por bactérias no processo de Mineralização Biologicamente Induzida (MBI) na presença de uma fonte de cálcio (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016). Deste modo, esse composto químico precipitado preencheria as microfissuras e poros, possibilitando a auto cicatrização do concreto e, portanto, aumentando a sua vida útil (JONKERS, 2011; JONKERS et al., 2010; NAIN et al., 2019).

Além de prolongar a durabilidade, algumas pesquisas mostraram que a utilização das bactérias do gênero *Bacillus* pode melhorar o desempenho mecânico de materiais cimentícios, especialmente a resistência à compressão (ABO-EL-ENEIN et al., 2013; AFIFUDIN et al., 2011; NAIN et al., 2019; NUGROHO; SATYARNO; SUBYAKTO, 2015).

Sendo assim, o bioconcreto pode ser utilizado em diversos tipos de obras como pontes, barragens, entre outras, e pode também ser aplicado como argamassa de revestimento. A adição de microrganismos em materiais cimentícios pode diminuir a porosidade e melhorar o desempenho mecânico do concreto, que conseqüentemente, contribuirá para uma maior vida útil da estrutura, além de gerar menos danos ao meio ambiente (SCHWANTES, 2017).

Dessa forma, esta pesquisa busca contribuir com mais informações a respeito da incorporação de bactérias em materiais cimentícios, que mesmo já sendo um tema muito estudado em outros países, ainda é pouco desenvolvido no Brasil.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é analisar a influência da adição de diferentes quantidades do fungicida bactericida microbiológico à base da bactéria *Bacillus subtilis*

nas propriedades mecânicas, resistência à compressão axial e à tração por compressão diametral e na microestrutura do concreto.

1.3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- Analisar os resultados obtidos por meio de ultrassom;
- Avaliar a resistência à compressão axial simples e à tração por compressão diametral de corpos de prova de concreto com adição de diferentes quantidades de fungicida bactericida microbiológico;
- Avaliar a precipitação de cristais de carbonato de cálcio (CaCO_3) em corpos de prova de concreto com adição de diferentes quantidades de fungicida bactericida biológico.

1.4 Estrutura do Trabalho

O presente trabalho está estruturado em cinco capítulos, sendo o primeiro dedicado à introdução, formulação do problema, justificativa, objetivo geral e os objetivos específicos. No segundo capítulo foi realizada uma revisão bibliográfica sobre o bioconcreto, enfatizando a influência das bactérias do gênero *Bacillus* nas propriedades mecânicas, entre elas a resistência à compressão e à tração por compressão diametral, assim como na microestrutura do concreto. No terceiro capítulo foram abordados a metodologia, os materiais e os equipamentos utilizados para o desenvolvimento do experimento. No quarto capítulo foram apresentados os resultados dos ensaios realizados e uma breve discussão deles. Por fim, no quinto capítulo, foram realizadas as considerações finais e as sugestões para trabalhos futuros.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Neste capítulo estão reunidos estudos anteriores de materiais cimentícios com adição de bactérias, com ênfase no processo de biomineralização, na bioprecipitação de carbonato de cálcio por bactérias e nas propriedades apresentadas pela incorporação de bactérias nos materiais cimentícios.

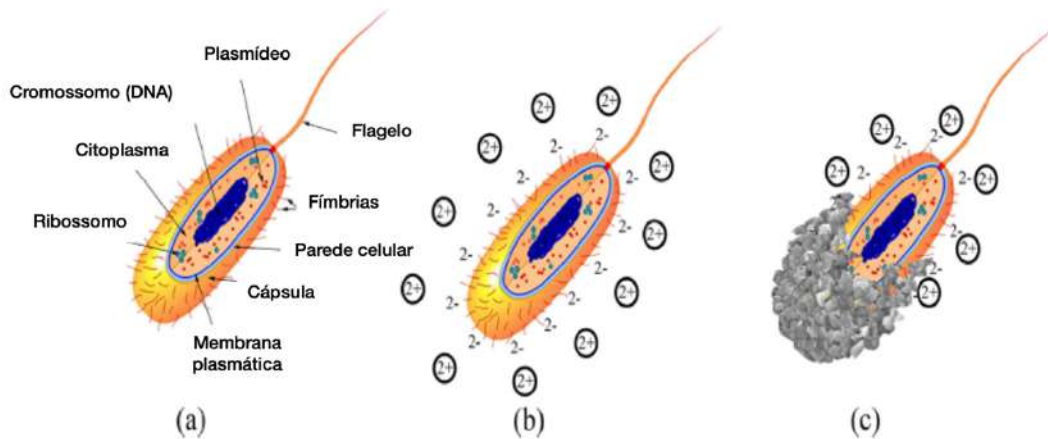
2.1 Biomineralização

Biomineralização está relacionada aos processos nos quais organismos formam minerais. Além disso, o termo biomineral refere-se ao fato de que a maioria dos produtos mineralizados são materiais compósitos compostos de componentes minerais e orgânicos (WEINER; DOVE, 2003). Os minerais biogênicos mais abundantes tanto em relação as quantidades produzidas e quanto as diferentes formas de distribuição, são os minerais de carbonatos de cálcio (WEINER; DOVE, 2003).

O processo de biomineralização é dividido em Mineralização Biologicamente Induzida (MBI) e Mineralização Biologicamente Controlada (MBC). Na MBI a precipitação secundária de minerais é o resultado de interações entre a atividade biológica e o meio ambiente. Nesta, as superfícies das células, normalmente, são os agentes da nucleação e posteriormente do crescimento mineral. Já na MBC o organismo utiliza atividades celulares para direcionar a nucleação, crescimento, morfologia e onde o mineral será depositado (WEINER; DOVE, 2003).

Os minerais formados por MBI, geralmente, nucleiam e crescem no exterior da célula, como resultado de atividades metabólicas do organismo e de reações químicas envolvendo subprodutos metabólicos. Em muitos casos, a deposição de partículas dos minerais é resultado da secreção pelos organismos de um ou mais produtos metabólicos que reagem com íons ou compostos do ambiente (FRANKEL; BAZYLINSKI, 2003). Um diagrama esquemático da produção de carbonato de cálcio e a estrutura bacteriana estão representados na Figura 1.

Figura 1: (a) Estrutura bacteriana; (b) Parede celular carregada negativamente e a presença de íons positivos; (c) Produção do biomineral através da ligação dos íons à parede celular



Fonte: (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016).

2.1.1 Bioprecipitação de Carbonato de Cálcio por Bactérias

A capacidade das bactérias precipitar carbonato de cálcio em suas condições naturais ou em laboratório, vem sendo relatada por alguns pesquisadores em seus estudos (HAMMES; VERSTRAETE, 2002; RODRIGUEZ-NAVARRO et al., 2003; WIKTOR; JONKERS, 2016). Diferentes tipos de bactérias e fatores abióticos como salinidade e composição do meio, podem contribuir de diferentes maneiras para precipitação de $CaCO_3$ (DHAMI; REDDY; MUKHERJEE, 2012; RIVADENEYRA et al., 2004).

A precipitação de $CaCO_3$ depende principalmente de quatro fatores para acontecer: concentração de cálcio (Ca^{+2}), concentração de Carbono Inorgânico Dissolvido (CID), pH e presença de locais de nucleação (HAMMES; VERSTRAETE, 2002). A produção de $CaCO_3$ por microrganismos extracelularmente pode ser obtida através de duas vias metabólicas: autotrófica e heterotrófica (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016).

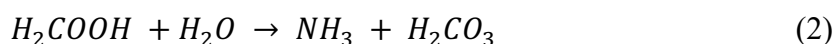
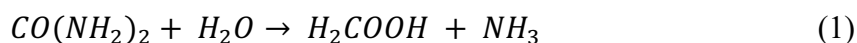
Na autotrofia, as três vias metabólicas metanogênese metilotrófica, fotossíntese anoxigênica e fotossíntese oxigênica, utilizam CO_2 como fonte de carbono para produzir matéria orgânica e induzem a redução de CO_2 no meio bacteriano. Quando íons de cálcio

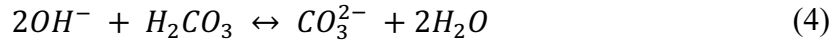
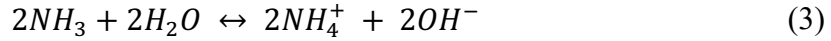
estão presentes no meio, a precipitação de $CaCO_3$ é favorecida por essa depleção (CASTANIER; LE MÉTAYER-LEVREL; PERTHUISOT, 1999).

Na heterotrofia, a precipitação pode ser ativa ou passiva. Na primeira, as partículas de carbonato são produzidas pelas trocas iônicas através da célula da membrana por bombas iônicas de cálcio e/ou magnésio. Já na precipitação passiva, dois ciclos metabólicos estão envolvidos: o ciclo de nitrogênio e o ciclo do enxofre. Neste último, a bactéria utiliza a via metabólica de redução dissimilatória do sulfato, no qual o ambiente não deve ter oxigênio, ser rico em matéria orgânica, cálcio e sulfato. Dessa forma, se houver a presença íons de cálcio, a ocorrência de precipitação de carbonato de cálcio dependerá do comportamento do sulfeto de hidrogênio. Já no ciclo de nitrogênio a precipitação passiva bacteriana segue três caminhos: amonificação de aminoácidos, redução dissimilatória de nitrato e degradação da ureia ou ácido úrico. As três vias induzem a produção de íons carbonato ou bicarbonato e da amônia (NH_3), que induz o aumento do pH e na presença de íons cálcio, precipitam o carbonato de cálcio (CASTANIER; LE MÉTAYER-LEVREL; PERTHUISOT, 1999).

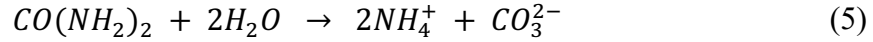
Em muitos estudos as bactérias ureolíticas do gênero *Bacillus* foram utilizadas como agentes para produção biológica de minerais de carbonato de cálcio. Essas bactérias utilizam a hidrólise da ureia para formação do $CaCO_3$ (JONKERS et al., 2010). Esse mecanismo é catalisado pela enzima urease, no qual a ureia é utilizada como fonte de energia para produzir carbonato e amônia, aumentando o pH e a concentração de carbonato no meio microbiano (DE MUYNCK; DE BELIE; VERSTRAETE, 2010; KRUMBEIN, 1979).

A seguir observa-se as equações químicas referentes ao processo da hidrólise da ureia: um mol de ureia é hidrolisado intracelularmente produzindo um mol de amônia e de carbamato (1), que naturalmente se hidrolisa e forma um mol de amônia e de ácido carbônico (2). Esses produtos em seguida interagem com água e produzem bicarbonato e dois mols de amônio e íons hidróxido (3) e (4) (DE MUYNCK; DE BELIE; VERSTRAETE, 2010).

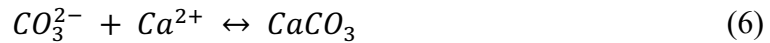




A reação global pode ser escrita da seguinte maneira (DE MUYNCK; DE BELIE; VERSTRAETE, 2010):

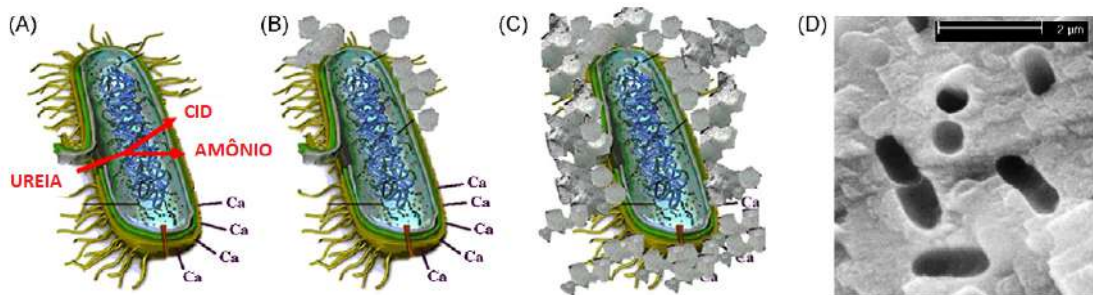


E na presença dos íons cálcio, ocorrerá a precipitação de carbonato de cálcio (DE MUYNCK; DE BELIE; VERSTRAETE, 2010):



Os íons de cálcio ligam-se à parede celular, podendo formar cristais na célula bacteriana. Uma representação simplificada da precipitação de $CaCO_3$ na parede celular bacteriana é mostrada na Figura 2. Na Figura 2(A) é possível observar que os íons de cálcio na solução são atraídos pela parede celular bacteriana carregada negativamente. Após a adição de ureia na solução, o carbono inorgânico dissolvido (CID) e o amônio são liberados através do metabolismo da bactéria. Na Figura 2(B) ocorre a precipitação de $CaCO_3$ na parede celular bacteriana devido a presença de íons de cálcio. Na Figura 2(C) toda a célula é rodeada pelo $CaCO_3$ e na Figura 2(D) as marcas das células bacterianas envolvidas na precipitação do $CaCO_3$ (DE MUYNCK; DE BELIE; VERSTRAETE, 2010; SCHWANTES, 2017).

Figura 2: Representação esquemática da precipitação de $CaCO_3$: (A) Atração de íons de cálcio, (B) Precipitação de $CaCO_3$, (C) Célula rodeada por $CaCO_3$ e (D) Marcas das células bacterianas.



Fonte: Adaptado de (DE MUYNCK; DE BELIE; VERSTRAETE, 2010).

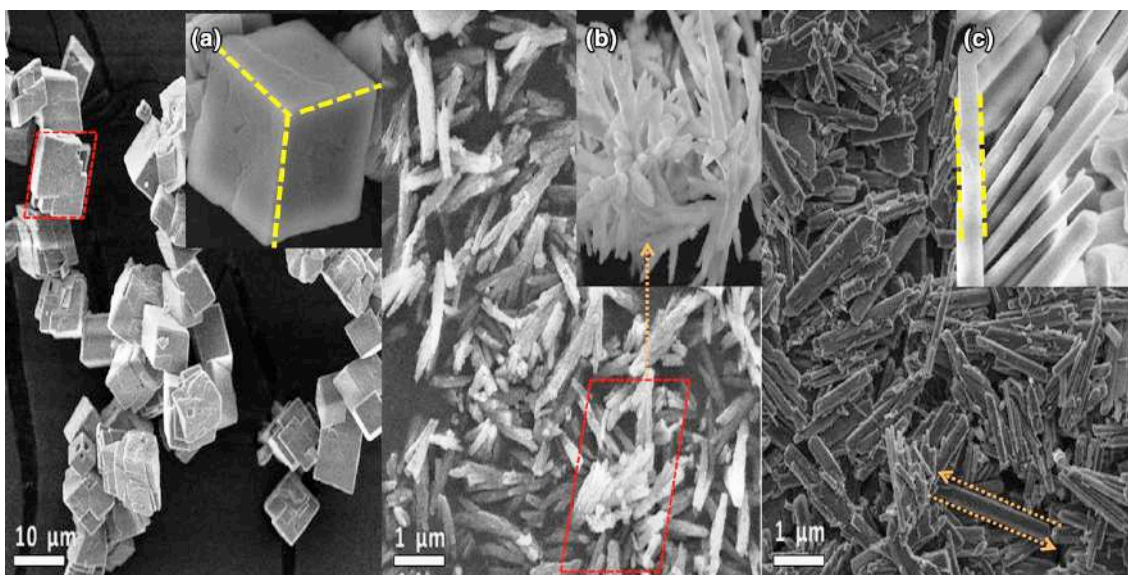
A concentração de íons carbonato está relacionada à concentração de CID e do pH da solução. Além disso, a concentração de CID depende de parâmetros como a temperatura e pressão parcial do CO_2 (DHAMI; REDDY; MUKHERJEE, 2012). As bactérias também atuam diretamente nessa formação, uma vez que elas fornecem locais de nucleação (parede celular das bactérias) para precipitar e permitir o crescimento do carbonato de cálcio. Dessa forma, o CID, o pH, a concentração de íons de cálcio e de ureia e a participação das bactérias ureolíticas são fundamentais para formação e precipitação de $CaCO_3$ via hidrólise da ureia (STOCKS-FISCHER; GALINAT; BANG, 1999).

A formação de $CaCO_3$ por bactérias através da hidrólise da ureia é promissora para reparo de pequenas fissuras no concreto e diminuição da permeabilidade do material. No entanto, uma desvantagem desse mecanismo de reação é que para cada íon de carbonato dois íons de amônio são produzidos simultaneamente, podendo resultar uma carga excessiva de nitrogênio no meio ambiente (JONKERS et al., 2010).

2.1.1.1 Polimorfos de Carbonato de Cálcio

Polimorfismo é a capacidade de uma molécula cristalizar em formas diferentes. O carbonato de cálcio possui diferentes tipos de polimorfos e entre eles, os cristalinos anidros são a calcita, um dos minerais mais comuns, a aragonita e a vaterita que é um mineral mais escasso (BESSLER; RODRIGUES, 2008; TANG; YU; ZHAO, 2009). Após uma análise dos autores Siva et. al (2017) no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), na Figura 3 é possível observar em (a) calcita – formato de partículas na maioria de cubos regulares, em (b) aragonita – partículas de diferentes tamanhos em formato de folha irregular, e em (c) vaterita – partículas em formato de haste.

Figura 3: Imagens do MEV dos polimorfos de $CaCO_3$: (a) Calcita, (b) Aragonita e (c) Vaterita.

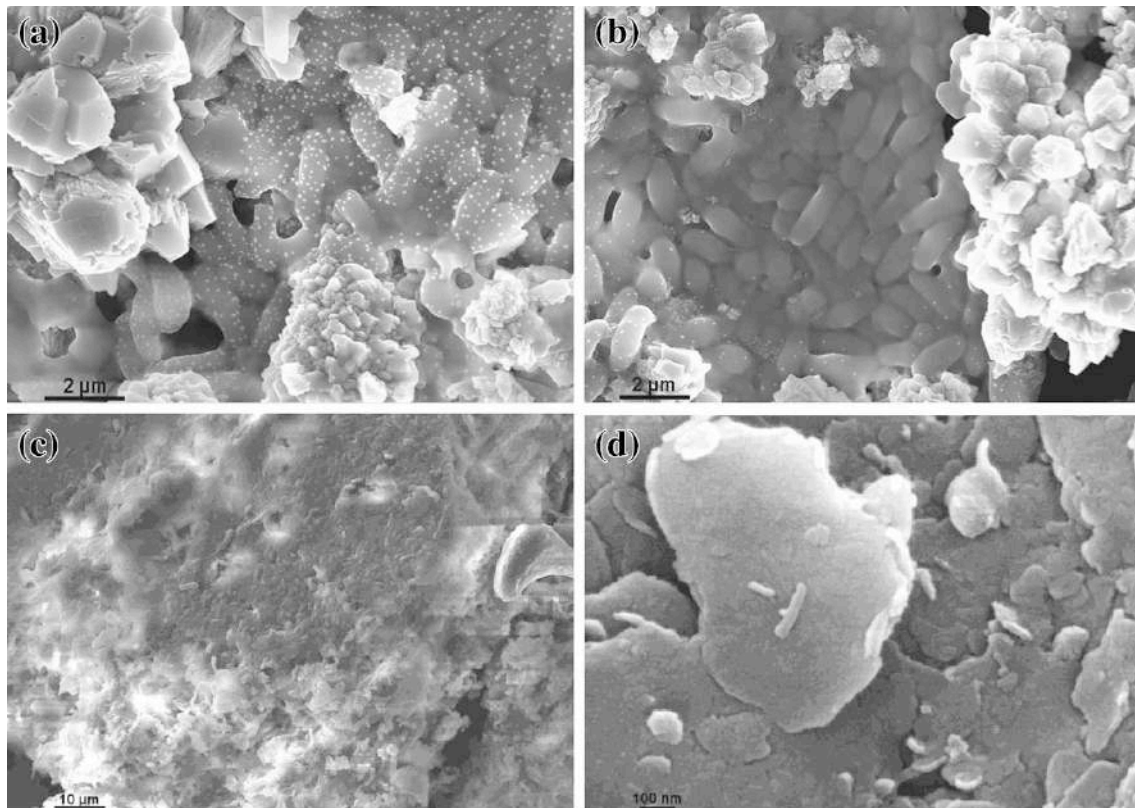


Fonte: (SIVA et al., 2017).

A calcita é o principal constituinte de muitas formações de rochas sedimentares de calcário e é considerada a modificação termodinamicamente estável em todas as temperaturas. Já a formação da aragonita está relacionada a determinadas circunstâncias físico-químicas e é constantemente encontrada em depósitos calcários resultantes de águas termais (BESSLER; RODRIGUES, 2008). A vaterita é o polimorfo menos estável entre os três e se transforma com facilidade em calcita (o mais estável) em temperaturas inferiores a 40°C ou em aragonita em temperaturas mais elevadas (KONOPACKA-ŁYSKAWA; KOŚCIELSKA; ŁAPIŃSKI, 2019).

A diferença na formação dos cristais pode ser atribuída a muitos fatores na precipitação do $CaCO_3$ por bactérias. Entre eles é possível relacionar, principalmente, a cepa das bactérias ureolíticas e os componentes presentes durante a cultura e formação do cristal. Além disso, a fonte de cálcio também afeta a sua formação (GOROSPE et al., 2013). Na Figura 4 é possível observar em uma imagem obtida através do MEV por Achal e Pan (2014), as formas dos cristais de $CaCO_3$ formados pela bactéria *Bacillus* sp. CR2 no meio nutritivo complementado com ureia, contendo Figura 4(a) cloreto de cálcio, Figura 4(b) nitrato de cálcio, Figura 4(c) acetato de cálcio e Figura 4(d) óxido de cálcio.

Figura 4: Micrografias eletrônicas de varredura com diferentes formas dos cristais de $CaCO_3$ precipitados pela *Bacillus* sp. CR2: (a) Cloreto de cálcio, (b) Nitrato de cálcio, (c) Acetato de cálcio e (d) Óxido de cálcio.



Fonte: (ACHAL; PAN, 2014).

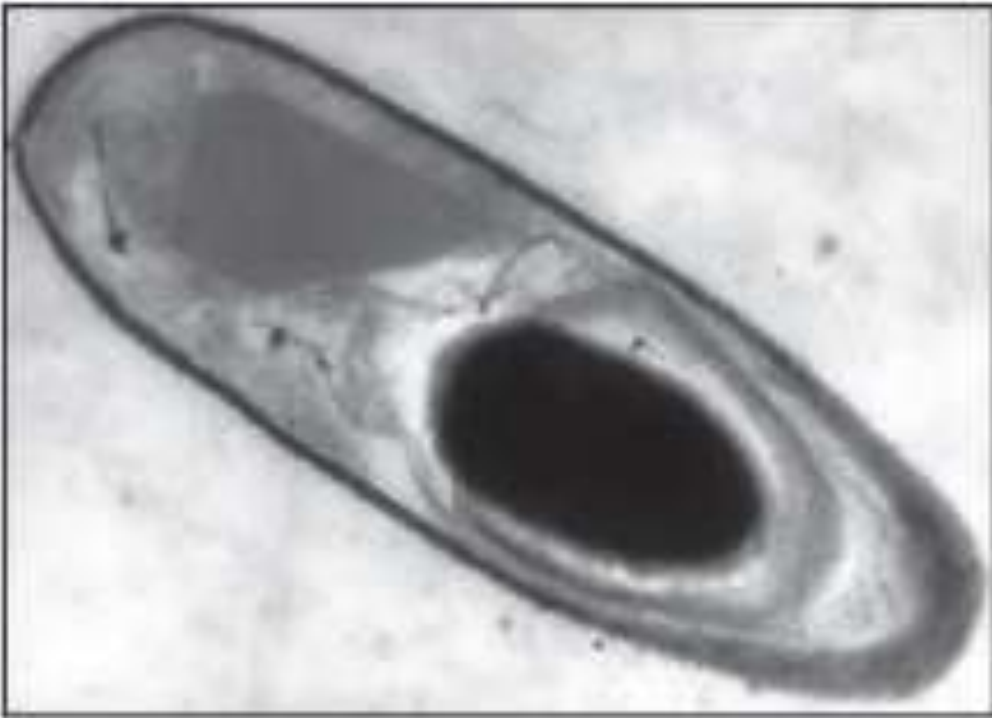
2.1.1.2 Bactérias precipitadoras de $CaCO_3$ do gênero *Bacillus*

Muitas bactérias são capazes de sobreviver em situações extremas e as do gênero *Bacillus* são altamente resistentes aos meios alcalinos (STANASZEK-TOMAL, 2020). Os *Bacillus* são células em forma de bastões, Gram-positivos e que possuem a capacidade de produzir esporo¹, originando célula vegetativa² apta à multiplicação (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015). Uma imagem do esporângio, que é a célula-mãe portadora do esporo, e outra de células vegetativas do gênero *Bacillus*, estão, respectivamente, na Figura 5 e na Figura 6.

¹ Célula mais resistente a condições críticas do meio ambiente capaz de germinar quando se encontra em meio de cultivo que tenha condições permissíveis.

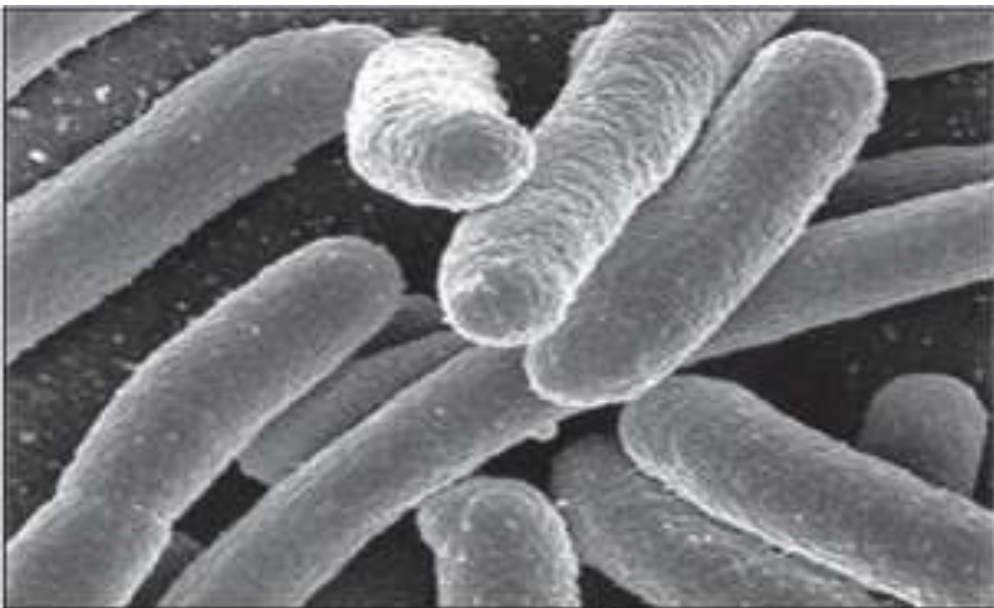
² Célula que não contém esporo.

Figura 5: Esporângio de *Bacillus* com endósporo.



Fonte: (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015).

Figura 6: Células vegetativas do *Bacillus*.



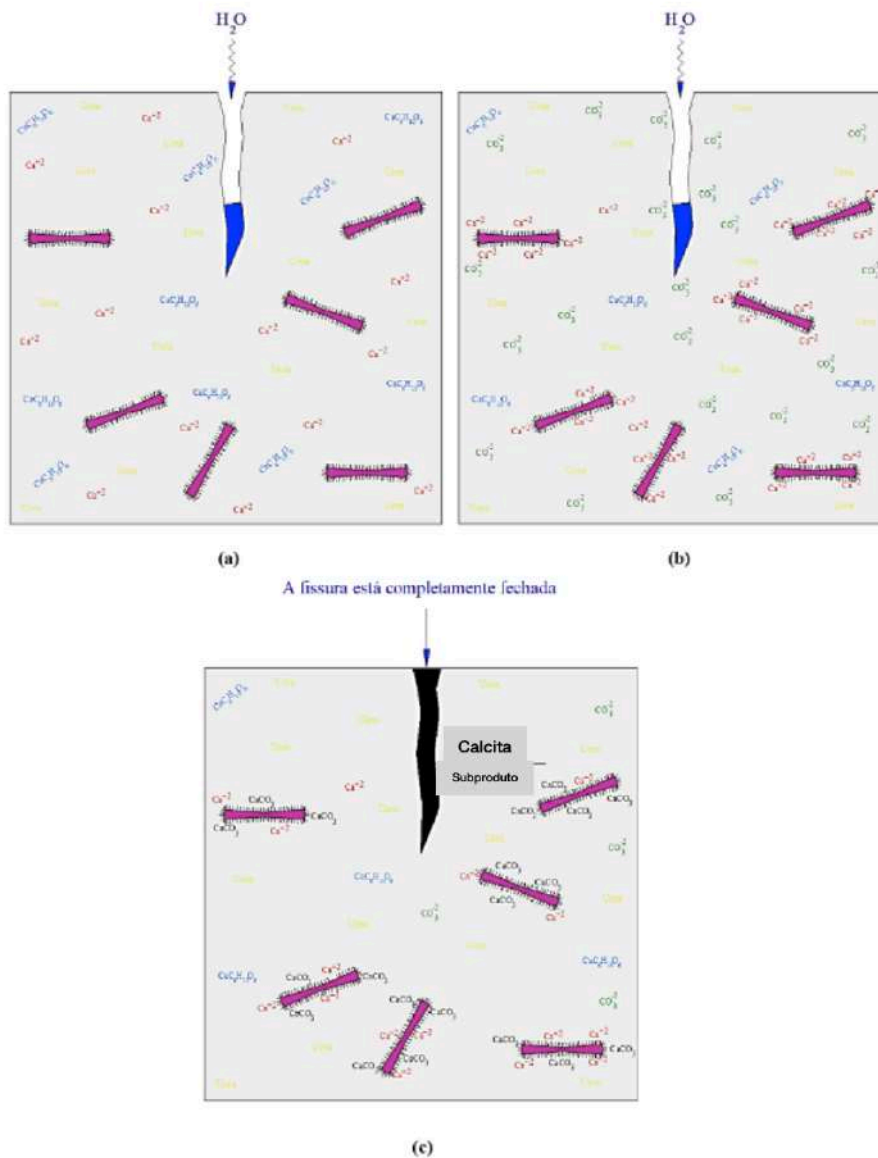
Fonte: (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015).

Essas bactérias utilizam processos metabólicos como a hidrólise da ureia, redução do sulfato e fotossíntese, que tem como subproduto o carbonato de cálcio. Além disso, as bactérias do gênero *Bacillus* não são nocivas para os seres humanos (STANASZEK-TOMAL, 2020).

As bactérias e nutrientes (compostos do cálcio, nitrogênio ou fósforo) são utilizados para que a precipitação de $CaCO_3$ aconteça. Todos esses componentes são adicionados durante a produção do concreto e podem permanecer inativos até que ele seja danificado. Dessa forma, a água do ambiente externo pode penetrar através das fissuras, ativando os esporos bacterianos que são capazes de crescer conforme a condição do ambiente (STANASZEK-TOMAL, 2020).

Algumas espécies específicas de bactérias, como as ureolíticas, são utilizadas principalmente para a precipitação induzida microbiologicamente de $CaCO_3$. As bactérias do gênero *Bacillus* como a *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cohnii* são utilizadas no concreto. *Bacillus subtilis* podem ser utilizados tanto para reparar fissuras quanto para produzir o bioconcreto (SAIFEE; LAD; JUREMALANI, 2015). Todo o fenômeno do papel da bactéria dentro da matriz do concreto é mostrado na Figura 7, na qual representa esquematicamente o processo da hidrólise da ureia. Como a parede celular da bactéria possui carga negativa (Figura 7(A)) os íons de cálcio positivos são atraídos para perto dela (Figura 7(b)). Os Ca^{+2} , por sua vez, podem atrair os íons carbonatos negativos, que então produzem $CaCO_3$ ao redor da parede celular bacteriana (Figura 7(c)) (OSMAN et al., 2021).

Figura 7: Funcionalidade da bactéria no concreto: (a) Parede celular com carga negativa da bactéria, (b) Íons de cálcio positivos atraídos para a parede celular e (c) $CaCO_3$ ao redor da parede celular bacteriana.



Fonte: Adaptado de (OSMAN et al., 2021).

2.1.1.3 Autocura Microbiana

Para obter a autocura microbiana, as bactérias que precipitam carbonato de cálcio podem ser adicionadas ao concreto durante o seu processo de mistura ou encapsuladas antes da adição. No primeiro método, as bactérias devem sobreviver durante a preparação, permanecerem vivas, mas inativas dentro do concreto, até surgirem fissuras que irão

ativá-las, induzindo a precipitação de $CaCO_3$. Além disso, a matriz cimentícia, aos poucos, se torna uma estrutura mais densa devido à hidratação instantânea. Como a maioria dos poros possui um tamanho inferior a $0,5 \mu m$, as bactérias entre $1-3 \mu m$ e os esporos em torno de $1 \mu m$, é possível que as bactérias sejam espremidas e esmagadas quando os poros se tornam menores. Para que isso não ocorra, o encapsulamento das bactérias antes da adição à mistura é recomendado. A função do material de encapsulamento é de proteger as bactérias, como se fosse uma “casca”, e não impede a precipitação de $CaCO_3$ quando ocorre a fissuração (WANG et al., 2014).

O encapsulamento pode aumentar a vida útil dos agentes de cura químicos e biológicos e controlar seus lançamentos na matriz. Alguns estudos baseados na recuperação de propriedades mecânicas e de durabilidade, sugerem que essa abordagem é versátil e que a qualidade de reparo é satisfatória (SOURADEEP; KUA, 2016).

Muitos materiais de encapsulamento como agregados leves, tubos de vidro, tubos de cerâmica e polímeros têm sido utilizados no desenvolvimento da ação de autocura no concreto. No entanto, a presença de cápsulas de vidro e tubos feitos de cerâmica ou vidro podem enfraquecer a estrutura de concreto (SOURADEEP; KUA, 2016).

Algumas pesquisas como as de Jonkers (2011) e Mors e Jonkers (2013) utilizaram como material de encapsulamento a argila expandida, que é um agregado leve. Nestes estudos, a proteção dos esporos bacterianos imobilizados dentro dos poros da argila expandida antes da adição à mistura do concreto, mostrou-se eficaz, prolongando o seu tempo de vida. Sendo assim, esse método tornou-se promissor por ser uma alternativa que além de aumentar a durabilidade dos esporos, é também sustentável, já que diminui a utilização de outros agentes de cura, em casos de reparos de fissuras.

2.2 Influência das Bactérias Bacillus nas Propriedades dos Materiais Cimentícios

O processo de biomineralização por promover a precipitação de $CaCO_3$ e preencher alguns dos poros existentes nos materiais cimentícios, pode melhorar as suas propriedades como resistência e durabilidade (AFIFUDIN et al., 2011; BANG; GALINAT; RAMAKRISHNAN, 2001). A seguir, encontram-se alguns levantamentos de estudos anteriores que relatam a influência das bactérias do gênero Bacillus no concreto

ou argamassa com relação à resistência à compressão e à tração e às características microestruturais desses materiais.

2.2.1 Resistência à compressão

A determinação da resistência à compressão é extremamente importante, pois é através dela que se adota um valor de referência no projeto estrutural que influencia diretamente na segurança e durabilidade das estruturas de concreto. Esse parâmetro é considerado como o principal para controle das estruturas de concreto simples e armado, uma vez que afeta as propriedades mais importantes desses elementos (PINTO DA SILVA FILHO; HELENE, 2011).

A precipitação mineral resultante da atividade metabólica das bactérias *Bacillus* influencia algumas propriedades dos materiais cimentícios e entre elas a resistência à compressão. Observa-se na Tabela 1 os principais resultados encontrados por alguns pesquisadores.

Tabela 1: Influência da adição de bactérias do gênero *Bacillus* na resistência à compressão de materiais cimentícios.

Autor	Material	Microorganismo	Adição da Bactéria	Meio de Cultura	Concentração	Tempo de Cura	Principais resultados
Jonkers et al. (2010)	Rocha de cimento	<i>Bacillus pseudofirmus</i> DSM 8715 <i>B. cohnii</i> DSM 6307	Na água de amassamento	5 g de peptona 3 g de extrato de carne 0,42 g NaHCO ₃ 0,53 g Na ₂ CO ₃ pH 9,7 Meio alcalino água ultra-pura MiliQ	a/c: 0,4 - <i>B. pseudofirmus</i> : 6 x 10 ⁸ esporos/mL a/c: 0,5; <i>B. cohnii</i> : 1 x 10 ⁸ esporos/mL Extrato de levedura - 1% do peso do cimento Peptona - 1% peso do cimento Acetato de cálcio - 1% peso do cimento Lactato de cálcio - 1% peso do cimento	3, 7 e 28 dias	Apenas a incorporação de Lactato de cálcio na mistura resultou em aumento da resistência.
Afifudin et. al (2011)	Concreto	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> quimicamente modificada (CMBS)	Na água de amassamento	<i>B. subtilis</i> : caldo de soja com 0,5% de extrato de levedura CMBS: reação química do <i>Bacillus subtilis</i> com solução de etilenidiamina	Traço - 1:2,8:3,42 a/c: 0,63 <i>B. subtilis</i> : 10 ³ , 10 ⁴ , 10 ⁵ , 10 ⁶ e 10 ⁷ cell/mL	3, 7, 14, 21, 28 e 60 dias	A incorporação da bactéria teve um efeito positivo no CP com 10 ⁶ cell/mL.
Jonkers (2011)	Concreto	<i>Bacillus B2-E2-1</i>	Imobilizada dentro da argila expandida	292 g de argila expandida 15 g/dm ³ lactato de cálcio Água	5x10 ⁷ esporos/ dm ³ concreto Traço - 1:2,4:0,74 (cimento: areia: argila expandida)	28 dias	50% perda comparada com concreto com brita
Abo-El-Enein et al. (2012)	Argamassa	<i>Sporosarcina pasteurii</i> (<i>Bacillus pasteurii</i>)	Na água de amassamento	10 g/l de extrato de levedura 5 g/l de NaCl 25 g/mol de CaCl ₂ 20 g/l de ureia 1,5 L de água	Traço - 1:3 a/c: 0,46 <i>S. pasteurii</i> para OD em 600 nm de 0,5, 1,0 e 1,5 OD	3, 7, 14 e 28 dias	Argamassas bacterianas apresentaram melhores resultados
Mors e Jonkers (2013)	Concreto	Esporos bacterianos	Imobilizada dentro da argila expandida	350 g/L de lactato de cálcio 2 Kg de argila expandida	1,7 x 10 ⁵ esporos bacterianos/g de argila Traço - 1:2,4:1,3 (cimento: areia: argila expandida) a/c: 0,5 - (0%,0,5%,1%,4% de lactato de calcio na água)	3, 7 e 28 dias	A maioria dos CPs obtiveram resultado superior
Nugroho, Satyarno e Subyakto (2015)	Argamassa	<i>Bacillus subtilis</i> (IFO - 13719)	Imobilizada dentro da cinza volante pulverizada	5 g/L de peptona 5 g/L de NaCl 3 g/L de extrato de levedura	Traço - 1:3 a/c: 0,485 <i>B. subtilis</i> : 10 ⁴ , 10 ⁵ e 10 ⁶ cell/mL Cinza volante pulverizada: 20% do peso do teor de cimento	3, 7 e 28 dias	A maioria das argamassas bacterianas obteve resultado superior
Nain et. al (2019)	Concreto	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus megaterium</i>	Na água de amassamento	5 g/L de peptona 5 g/L de NaCl 2 g/L de extrato de levedura 1 g/L de extrato de carne Meio de Luria-Bertani	10 ⁸ cell/mL	7 e 28 dias	CPs com bactérias apresentaram valores maiores
Schwantes-Cezario et. al (2019)	Argamassa	<i>Bacillus subtilis</i> AP91	Na água de amassamento e em uma solução tampão de fosfato contendo os esporos		Traço - 1:3 Solução tampão de fosfato: 1,05 g/L fosfato de sódio (bifásico-anidro); 0,36 g/L fosfato de sódio (monobásico); 8,17 g/L NaCl a/c: 0,63 <i>B. subtilis</i> : 10 ⁵ cell/mL	7 e 28 dias	As argamassas que continham esporos de <i>B. subtilis</i> incorporados à água de mistura obtiveram melhores resultados As argamassas que foram imergidas não tiveram diferença significativa
Vijay e Murmu (2019)	Concreto	<i>Bacillus subtilis</i>	Na água de amassamento	5 g de peptona 3 g de extrato de carne 5 g/L extrato de levedura (1,5% de ágar adicionado)	Traço - 1:1,3:2,5 a/c: 0,4 <i>B. subtilis</i> (pó de esporos): 2 mi ufc/g [concreto] - 2,25;4,5;6,75;9,0;11,25 kg/m ³ de lactato de cálcio <i>B. subtilis</i> : 10 ⁵ cell/mL	7, 14 e 28 dias	Aumento da resistência dos CPs com bactérias com até 0,5% de lactato de calcio

Fonte: (AUTORA, 2022).

Com exceção de Jonkers (2011), a maioria dos estudos relatados acima teve um resultado da resistência à compressão superior ou similar ao material cimentício sem adição da bactéria do gênero *Bacillus*. É necessário ressaltar que essa perda na resistência de quase 50% obtida pelo Jonkers (2011), foi devido à uma grande substituição da areia e brita pela argila expandida, o que resultou em uma diminuição da sua resistência, uma vez que as propriedades de cada um desses materiais são únicas e não devem ser totalmente substituídos, caso contrário, haverá perdas significativas no seu desempenho.

Alguns fatores como o meio de cultura, a forma como a bactéria foi adicionada e a sua concentração e o traço do material cimentício afetam diretamente os resultados da resistência à compressão. Jonkers et al. (2010) analisaram uma rocha de cimento com a concentração de *B. pseudofirmus* de 6×10^8 esporos/mL e notaram uma resistência à compressão menor que 10% nas idades de 3, 7 e 28 dias quando comparada à do material cimentício sem bactéria. Esses autores também estudaram diferentes compostos orgânicos na mistura (1% da massa de cimento) como lactato de cálcio, extrato de levedura, peptona e acetato de cálcio e apenas o primeiro resultou em aumento da resistência à compressão aos 28 dias. Os demais reduziram essa propriedade quando comparados à rocha de cimento referência.

Já Afifudin et al. (2011) estudaram os *Bacillus subtilis* nas concentrações de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 cell/mL incorporados na água de amassamento para confecção de concreto. O corpo de prova (CP) que teve melhor resultado foi o com concentração de bactérias de 10^6 cell/mL, apresentando em 60 dias um valor de resistência à compressão 28% maior que o CP sem adição destes microrganismos. Além dele, a amostra com concentração de *B. subtilis* de 10^3 cell/mL teve um grande ganho na resistência até os 28 dias comparada ao CP referência, mas até atingir 60 dias de cura, houve uma grande perda na resistência, que praticamente se equiparou à da amostra padrão. As demais concentrações de bactérias adicionadas ao concreto apresentaram um desempenho inferior quando comparado ao concreto referência.

Mors e Jonkers (2013) imobilizaram os esporos bacterianos dentro da argila expandida antes de serem adicionados ao concreto. Em uma das análises eles compararam o concreto referência com argila expandida (CRA) ao concreto com incorporação de bactérias dentro dela (CAB) e ao concreto com incorporação das bactérias dentro da argila

sob vácuo com nutrientes (CABVN) e sob vácuo com nutrientes e água e depois seco em estufa (CABVNA). Nessa primeira análise, apenas o CABVNA apresentou resistência à compressão aos 28 dias inferior ao CRA, tanto o CAB quanto o CABVN apresentaram valor superior. Vale ressaltar que a superfície do CABVNA estava notavelmente esbranquiçada, indicando a deposição do lactato de cálcio na mesma, o que já era esperado, uma vez que a solubilidade deste composto é maior em temperaturas mais elevadas, podendo ser transportado com água para fora dos poros durante a secagem. Em um outro ensaio, eles compararam quantidades diferentes do lactato de cálcio dissolvido na água de amassamento (0%, 0,5%, 1% e 4% do peso do cimento) a fim de testar a sua influência na resistência à compressão do concreto com argila expandida. Como resposta, os CPs com 0,5% e 1% de adição, apresentaram maiores resultados aos 7 dias dessa propriedade quando comparados à amostra sem adição. Já a incorporação de 4% desse nutriente levou à uma perda considerável na resistência à compressão.

Na pesquisa de Nugroho, Satyarno e Subyakto (2015), eles impregnaram na cinza volante pulverizada (CVP) esporos da bactéria *Bacillus subtilis* nas concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 cell/mL e substituíram 20% do peso do cimento na argamassa por este material. Os corpos de prova foram submersos em água ou em solução de 5% de ureia misturada com 1% de acetato de cálcio por 3, 7 e 28 dias antes do ensaio. Após 28 dias de imersão, todas as argamassas com bactérias apresentaram maior resultado de resistência à compressão que a referência. Na submersão em água, o CP com concentração de bactérias de 10^6 cell/mL teve o melhor resultado, enquanto na outra submersão, a concentração de 10^5 cell/mL foi a que se destacou. Os autores acreditam que, neste caso, quando os nutrientes estão em excesso, a concentração de bactérias necessária é menor, devido à maior facilidade de sobrevivência e reprodução em ambientes onde água, oxigênio e nutrientes estão disponíveis, o que explicaria essa diferença de resultados encontrada.

No estudo de Schwantes-Cezario et al. (2019), esporos bacterianos na concentração de 10^5 esporos/mL foram adicionados na água de mistura e por imersão em uma solução tampão de fosfato. Aos 28 dias as argamassas com esporos bacterianos apresentaram resistência à compressão superior que a referência, especialmente a que teve as bactérias misturadas à água. Os autores sugerem que nas argamassas que foram imersas os esporos teriam que penetrar as amostras para reagir com os produtos de hidratação e então precipitar $CaCO_3$, o que explicaria a diferença de resultado em entre ambas.

Vijay e Murmu (2019) analisaram amostras de concreto referência, amostras de concreto adicionados com pó de esporos de *Bacillus subtilis* com concentrações de 2 milhões ufc/g (unidade formadora de colônias/grama) variando a quantidade de lactato de cálcio de 0% a 2,5% e amostras do concreto com a bactéria na concentração de 10^5 cell/mL adicionada à água e então misturada ao concreto. O maior valor encontrado da resistência à compressão foi para os corpos de prova onde houve adição do pó de esporos bacterianos com 0,5% de lactato de cálcio ao concreto. Os únicos CPs que tiveram um valor menor dessa propriedade comparado ao valor referência, foram os concretos nos quais a adição de lactato de cálcio foi igual e maior que 1,5%. Os autores observaram que o aumento na porcentagem desse composto na mistura resulta em um decréscimo da resistência à compressão. Essa redução, segundo os pesquisadores, é devido aos materiais adicionados à mistura que não participam do processo de hidratação com o ligante. Enquanto as bactérias e o lactato de cálcio adicionados ao concreto não atuam diretamente nesta reação química, o carbonato de cálcio ajuda a preencher os poros do concreto e a cicatrizar as fissuras. Sendo assim, como o aumento da concentração do lactato de cálcio leva a uma diminuição da RC, o excesso de produção do $CaCO_3$ também afeta esta propriedade.

É possível observar na maioria dessas pesquisas que os materiais cimentícios com bactérias do gênero *Bacillus* tiveram um resultado superior de resistência à compressão comparado ao material de referência. Muitos fatores como a concentração e modo de adição da bactéria, meio de cultura, traço do material cimentício, afetam diretamente nesta propriedade. No entanto, essas bactérias quando utilizadas de maneira adequada, induzem a precipitação de $CaCO_3$ que é capaz de preencher os poros e selar pequenas fissuras e, consequentemente, aumentar a resistência à compressão do material.

2.2.2 Resistência à tração na compressão diametral

A fissuração do concreto, muitas vezes, é resultado de uma ruptura à tração proveniente de retração restringida. As fissuras se propagam tão facilmente sob a tensão de tração, que a razão entre as resistências à tração uniaxial e à compressão normalmente variam de 0,07 a 0,11. Entre os ensaios mais aplicados para avaliação da resistência à tração do concreto, encontra-se o ensaio por compressão diametral (MEHTA; MONTEIRO, 2008b).

Observa-se na Tabela 2 os principais resultados dessa propriedade obtidos por alguns pesquisadores de materiais cimentícios com adição de bactérias do gênero *Bacillus*.

Tabela 2: Influência da adição de bactérias do gênero *Bacillus* na resistência à tração de materiais cimentícios.

Autor	Material	Microorganismo	Adição da Bactéria	Meio de Cultura	Concentração	Tempo de Cura	Principais resultados
Meera e Subha (2016)	Concreto	<i>Bacillus subtilis</i> JC3	Na água de amassamento	5 g/L de peptona 5 g/L de NaCl 3 g/L de extrato de levedura	Traço - 1:1,5:3 B. subtilis: 10 ³ , 10 ⁴ , 10 ⁵ e 10 ⁶ cell/mL	28 dias	CPs com bactérias tiveram melhores resultados
Kalhari e Bagherpour (2017)	Concreto Projetado	<i>Bacillus subtilis</i> PTCC 1254	Na água de amassamento e irmesas em uma solução durante a cura	5 g/L de peptona 3 g/L de extrato de carne 0,01 g MnS04.H20	Traço - 1:3,2:1,3 a/c: 0,5 B. subtilis: 2,2 x 10 ⁶ cell/mL	28 dias	CPs com bactérias tiveram melhores resultados
Nain et. al (2019)	Concreto	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus megaterium</i>	Na água de amassamento	5 g/L de peptona 5 g/L de NaCl 2 g/L de extrato de levedura 1 g/L de extrato de carne	Traço - 1:1:3 10 ⁸ cell/mL	7 e 28 dias	CPs com bactérias apresentaram valores maiores
Schwantes-Cezario et. al (2019)	Argamassa	<i>Bacillus subtilis</i> AP91	Na água de amassamento e em uma solução tampão de fosfato contendo os esporos	Meio de Luria-Bertani	Traço - 1:3 Solução tampão de fosfato: 1,05 g/L fosfato de sódio (bifásico-anidro); 0,36 g/L fosfato de sódio (monobásico); 8,17 g/L NaCl a/c: 0,63 B. subtilis: 10 ⁵ cell/mL	7 e 28 dias	As argamassas que continham esporos de B. subtilis incorporados à água de mistura obtiveram melhores resultados As argamassas que foram imergidas não tiveram diferença significativa
Priyom, Islam e Shumi (2020)	Concreto	<i>Bacillus subtilis</i>	Na água de amassamento	5 g/L de extrato de carne 3 g/L de peptona NaCl	Traço - 1:2,57:2,71 - a/c= 0,592 Traço- 1:1,68:2,04 - a/c=0,446 Traço - 1:1,28:1,73 - a/c= 0,380 B. subtilis: OD600 = 0,107;0,2;0,637;1,221	7, 14, 28, 60 e 120 dias	CPs com bactérias tiveram melhores resultados

Fonte: (AUTORA, 2022)

A partir dos estudos apresentados é possível perceber que houve uma melhora na resistência à tração dos materiais cimentícios com bactérias quando comparados aos materiais sem adição delas. Meera e Subha (2016) analisaram diferentes concentrações de *Bacillus subtilis* no concreto e todas as amostras tiveram resultado superior que a referência, especialmente a com 10^5 cell/mL que obteve um ganho de 63,46% nessa propriedade.

Já Kalhori e Bagherpour (2017) analisaram a bactéria incorporada à água de mistura e a mesma imersa em uma solução com ureia e cloreto de cálcio ($CaCl_2$) utilizada durante a cura do corpo de prova. Os concretos que tiveram contato com a bactéria apresentaram melhores resistências à tração que o concreto sem o microrganismo, sendo o que teve a sua cura imersa na solução bacteriana um aumento de 14% e o que teve a bactéria adicionada à água de amassamento um ganho de 8% no seu resultado.

Nas pesquisas de Nain et al. (2019) e Schwantes-Cezario et al. (2019) os materiais cimentícios com bactérias também tiveram as suas resistências à tração superiores quando comparados aos materiais sem bactérias. Os primeiros autores analisaram diferentes espécies do gênero *Bacillus* adicionado à água de mistura do concreto, sendo que o CP com *B. subtilis* teve um resultado de resistência à tração superior que o com *B. megaterium* aos 28 dias. Já Schwantes-Cezario et al. (2019), similarmente à resistência à compressão, também tiveram como resultado um desempenho melhor dessa propriedade nas argamassas que continham esporos bacterianos adicionados na água de amassamento.

Priyom, Islam e Shumi (2020) estudaram concretos de resistência de 20 MPa, 30 MPa e 40 MPa (cada um com um traço) e, para cada um deles quatro tipos de misturas contendo bactérias com diferentes concentrações foram analisadas. Os CPs foram moldados com uma densidade de cultura de *Bacillus subtilis* igual a 0,107; 0,2; 0,637 e 1,221, sendo que a amostra que continha este último valor, apresentava uma concentração celular da bactéria maior que as demais. Apesar dos traços diferentes, a relação água/cimento para o concreto bacteriano foi composto de 50% água e 50% da cultura bacteriana por massa. Após 14 dias de cura todos os concretos com bactéria apresentaram melhor desempenho na resistência à tração que o concreto de referência, sendo que o CP moldado com densidade de cultura igual a 0,637, aos 120 dias, apresentou o melhor resultado com 18% de ganho nesta propriedade.

Um melhor desempenho da resistência à tração é consequência da melhoria na resistência à compressão, já que, na maioria das vezes, o valor da primeira é em torno de 10% da segunda (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019). Esse efeito positivo das bactérias é devido à precipitação dos cristais de carbonato de cálcio, que preenchem os vazios, reduzindo a porosidade e aumentando a resistência à tração (KALHORI; BAGHERPOUR, 2017; NAIN et al., 2019; PRIYOM; ISLAM; SHUMI, 2020).

2.2.3 Análise microestrutural através do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)

Através da análise microestrutural é possível entender as correlações entre microestrutura, defeitos e propriedades. A microscopia eletrônica analisa a área através da irradiação de um feixe fino de elétrons e essa interação resulta na emissão de várias radiações como elétrons secundários e retroespalhados, raios-X característicos, fótons etc. Essas radiações quando captadas de forma correta fornecem informações características da amostra tais como cristalografia, composição e topografia da superfície. O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) possui um desempenho ainda melhor com a adaptação na câmera da amostra de detectores de raios-X possibilitando a realização da análise química na amostra. Na Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS – energy dispersive spectroscopy) os raios-X, geralmente, são distribuídos no espectro pela ordem de sua energia. Dessa forma, as informações qualitativas e quantitativas da amostra na região submicrométrica de incidência do feixe de elétrons são permitidas através da captação feita pelos detectores e da análise dos raios-X característicos emitidos pela mesma (MALISKA, [s.d.]).

Dessa forma, o MEV e EDS podem ser utilizados para análise da microestrutura dos produtos de hidratação do cimento e dos cristais de $CaCO_3$ precipitados pela ação bacteriana.

2.2.3.1 Verificação dos produtos de hidratação do cimento

O sulfato de cálcio ($CaSO_4$) e compostos de cálcio formados a elevada temperatura começam a entrar em solução quando o cimento é adicionado na água e então, a fase líquida se torna saturada com vários tipos de íons. A interação entre cálcio,

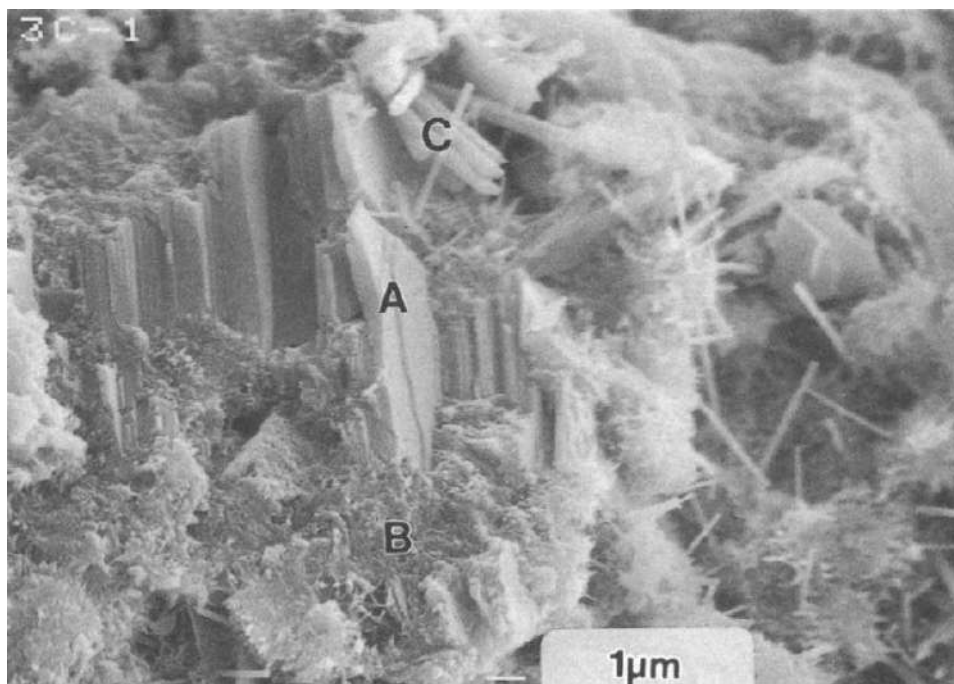
sulfato, aluminatos e íons hidroxilas, durante a hidratação do cimento, resulta algumas variedades de cristais (MEHTA; MONTEIRO, 2008a).

As principais fases sólidas na pasta de cimento hidratada que podem ser observadas no MEV são (MEHTA; MONTEIRO, 2008a):

- silicato de cálcio hidratado (C-S-H): a fase mais importante, uma vez que constitui de 50 a 60% do volume dos sólidos da pasta de cimento totalmente hidratada e determina as suas propriedades. Além disso, não é um composto bem definido e a sua morfologia varia desde fibras pouco cristalinas até redes reticulares.
- hidróxido de cálcio: compõe 20 a 25% do volume de sólidos na pasta de cimento hidratada. É um composto de estequiometria definida, $(Ca(OH)_2)$, que tende a formar grandes cristais com morfologia prismática hexagonal distinta.
- sulfoaluminatos de cálcio: ocupam de 15 a 20% do volume sólido da pasta de cimento hidratada e nos estágios iniciais da hidratação favorecem a formação do trissulfato hidratado (etringita). Nas pastas de cimento puro a etringita pode se transformar em monossulfato hidratado.
- grãos de clínquer não hidratados: podem ser encontrados dependendo da distribuição do tamanho das partículas de cimento anidro e do grau de hidratação.

Na Figura 8, foi utilizado o MEV para analisar as fases da pasta de cimento hidratada de um concreto com relação $a/c=0,55$ e foram observados: A - cristais de hidróxido de cálcio, B – silicato de cálcio hidratado e C – etringita em forma de agulhas.

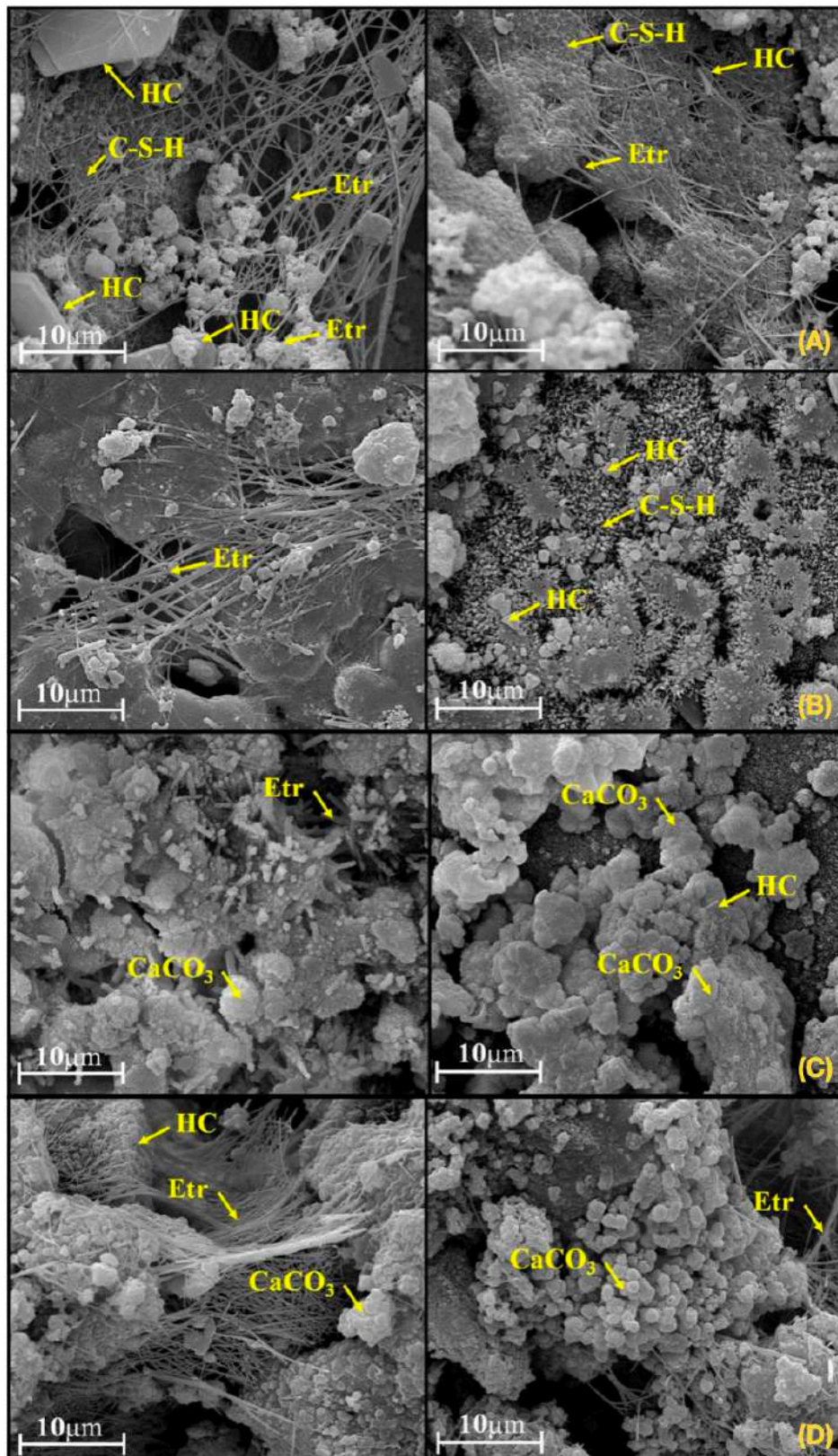
Figura 8: Fases sólidas da pasta de cimento hidratada obtida pelo MEV (A) Cristais de hidróxido de cálcio, (B) Silicato de cálcio hidratado e (C) Etringita.



Fonte: (SARKAR; AIMIN; JANA, 2001).

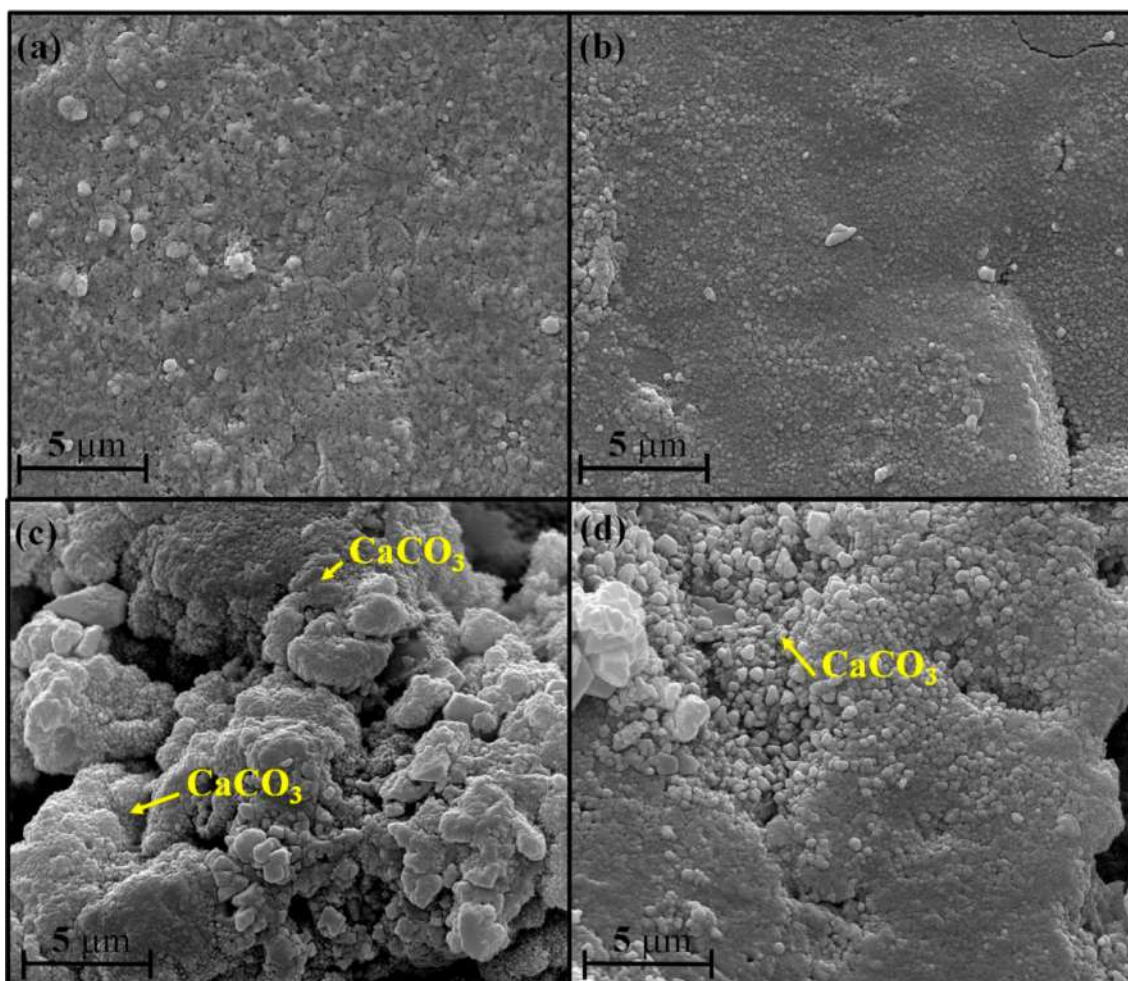
Schwantes (2017) analisou em seu estudo argamassas de traço 1:3 (cimento: areia) com relação a/c de 0,63. Aos 7 e 28 dias de cura a argamassa referência (AR), a argamassa com adição de tampão de fosfato no lugar da água de mistura (AR_TF), as argamassas com adição de solução contendo 10^5 esporos/mL do *Bacillus subtilis* suspensos em solução tampão fosfato imersos na água de cura (AB_IM) e outra com essa mesma solução substituindo a água de amassamento da mistura (AB_AM) foram observadas pelo MEV para verificar os produtos de hidratação do cimento e a ocorrência da precipitação de $CaCO_3$ nas argamassas bacterianas - Figura 9 e Figura 10.

Figura 9: MEV com ampliação de 6.000x das amostras com 7 dias de cura (A) AR, (B) AR_TF, (C) AB_IM e (D) AB_AM.



Fonte: Adaptado de (SCHWANTES, 2017).

Figura 10: MEV com ampliação de 12.000 x das amostras aos 28 dias de cura (A) AR, (B) AR_TF, (C) AB_IM e (D) AR_AM.

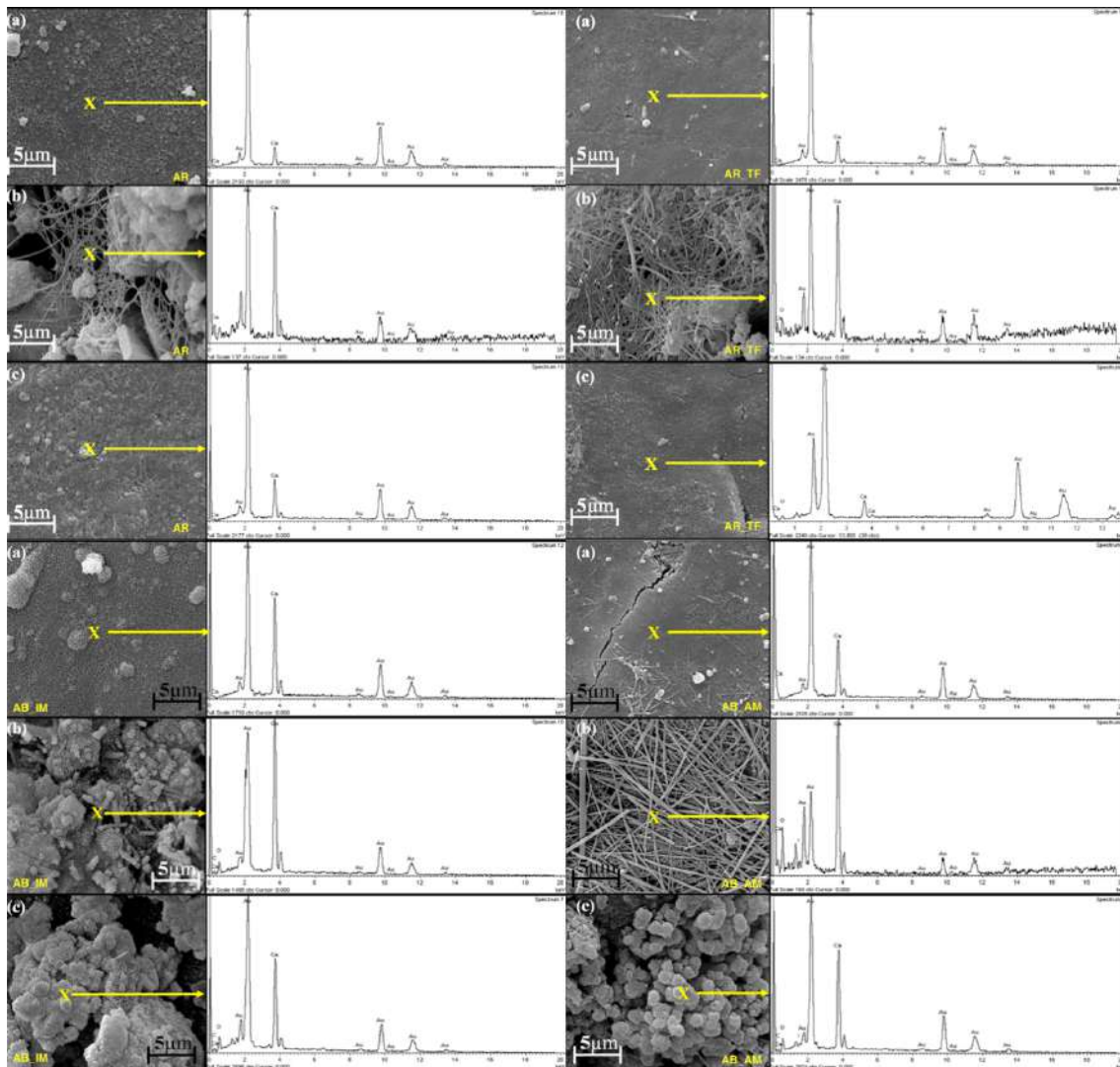


Fonte: (SCHWANTES, 2017).

A partir das imagens obtidas pelo MEV aos 7 dias de cura, é possível observar a formação dos produtos de hidratação do cimento, tais como, o silicato de cálcio hidratado (C-S-H), hidróxido de cálcio (HC) e etringita (Etr). Além destes, nas argamassas que tiveram contato com a bactéria, também se verificou a presença do carbonato de cálcio ($CaCO_3$). Já aos 28 dias, apenas as argamassas que continham esporos apresentaram cristais de $CaCO_3$ (SCHWANTES, 2017).

Schwantes (2017) também submeteu as amostras ao ensaio de energia dispersiva (EDS) que resulta em um gráfico de picos com os elementos químicos presentes no ponto observado (X) de cada uma delas - Figura 11.

Figura 11: EDS das argamassas aos (a) e (b) 7 dias e (c) aos 28 dias.



Fonte: Adaptado de (SCHWANTES, 2017).

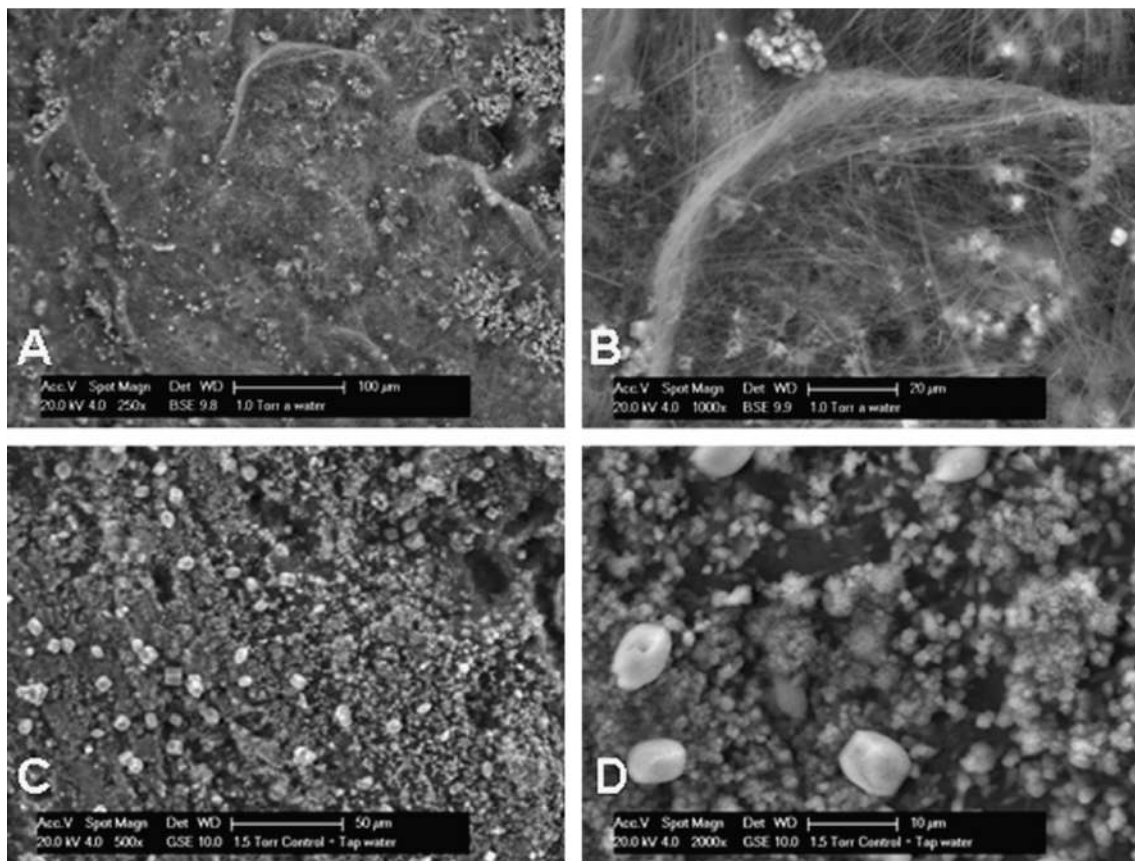
Os difratômetros da AR aos 7 dias mostraram em (a) uma superfície mais lisa com um pequeno pico de cálcio enquanto a (b) revelou a presença de produtos de hidratação do cimento, sendo que a área analisada continha etringita que é rica em cálcio. Aos 28 dias foi observado em (c) a inexistência dos cristais de etringita. Os resultados da AR_TF foram similares aos da AR, havendo também um pico grande de cálcio em (b), devido aos cristais de etringita. Nas AB_IM e AB_AM foram verificados picos maiores de cálcio em todos os pontos e para AB_IM (b) e (c) e AB_AM (c), foi observado a presença de moléculas de carbono e oxigênio, evidenciando a presença de cristais de $CaCO_3$ nestas amostras (SCHWANTES, 2017).

2.2.3.2 Análise dos cristais de carbonato de cálcio precipitados por bactérias do gênero *Bacillus*

Os diferentes tipos de cristais de carbonato de cálcio, conforme descritos na seção 2.1.1.1 podem ser identificados pelo MEV e, através do EDS, pode ser feita a verificação se eles apresentam picos de cálcio.

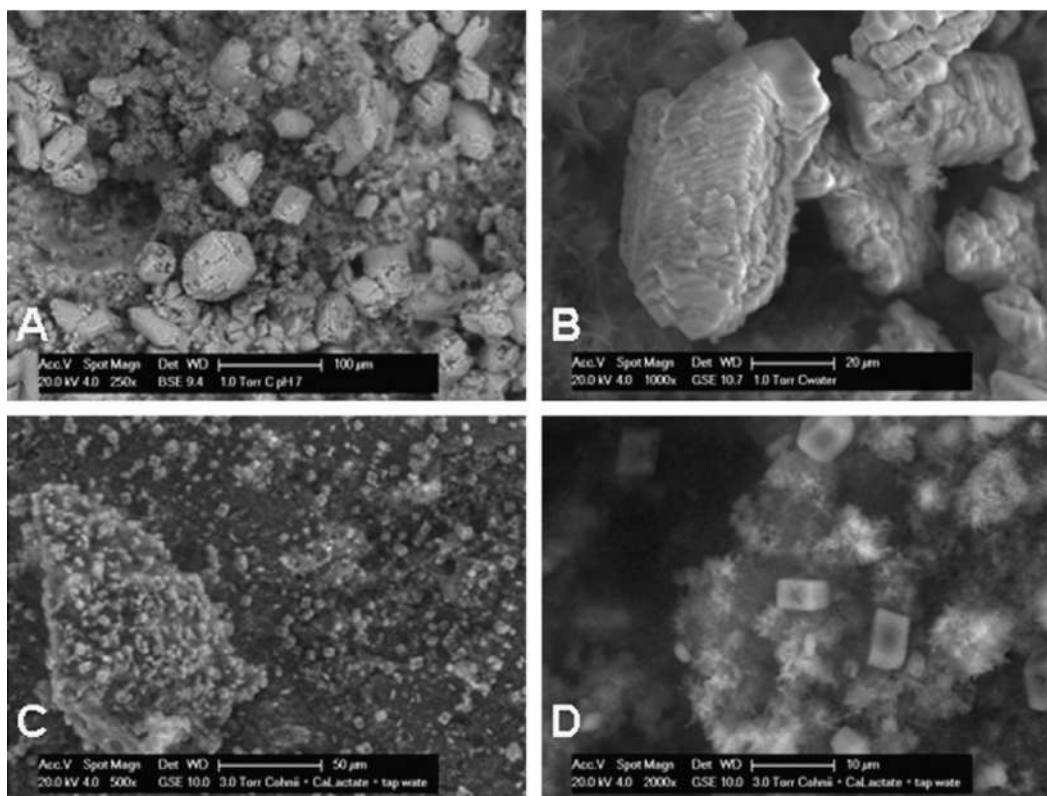
Jonkers et. al (2010) ao analisarem amostras da rocha de cimento sem - Figura 12 e com esporos do *Bacillus cohnii* e lactato de cálcio - Figura 13 aos 7 (A e B) e aos 28 dias (C e D), obtiveram as imagens, apresentadas a seguir, pelo MEV:

Figura 12: MEV das amostras referências com ampliação de (A) 250x, (B) 1000x, (C) 500x e (D) 2000x.



Fonte: (JONKERS et al., 2010).

Figura 13: MEV amostras bacterianas com ampliação de (A) 250x, (B) 1000x, (C) 500x e (D) 2000x.



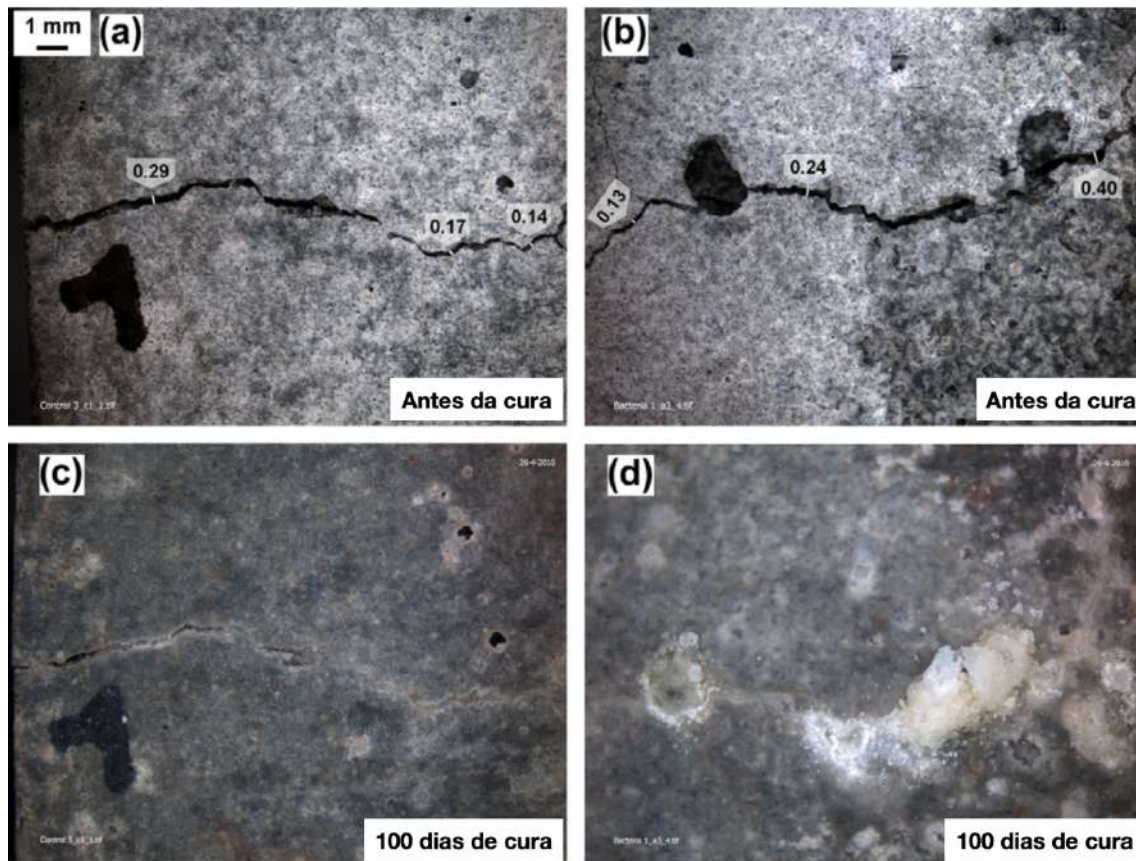
Fonte: (JONKERS et al., 2010)

É possível observar nas imagens aos 7 dias (A e B) de cura que as amostras que continham bactérias e lactato de cálcio apresentaram vários minerais precipitados, provavelmente à base de carbonato de cálcio, formados devido à conversão metabólica bacteriana do lactato de cálcio. Aos 28 dias de cura, os autores notaram uma diminuição de minerais precipitados e eles acreditam que esteja relacionada à perda da viabilidade dos esporos bacterianos incorporados à pedra de cimento, que parece estar ligada à redução contínua nos diâmetros dos poros da matriz. Aparentemente, os esporos bacterianos são esmagados pelos espécimes envelhecidos, que apresentam os poros reduzidos e também, reduzem a formação da quantidade de minerais. Uma sugestão para solução desses problemas seria o encapsulamento ou imobilização dos esporos em uma matriz protetora antes da adição da mistura de concreto (JONKERS et al., 2010).

Wiktor e Jonkers (2011) impregnaram esporos de *Bacillus alkalinitrilicus* e lactato de cálcio na argila expandida para confecção de argamassas. Após 56 dias de cura, os autores analisaram corpos de prova fissurados referência (AR) e com a bactéria (AB) antes e

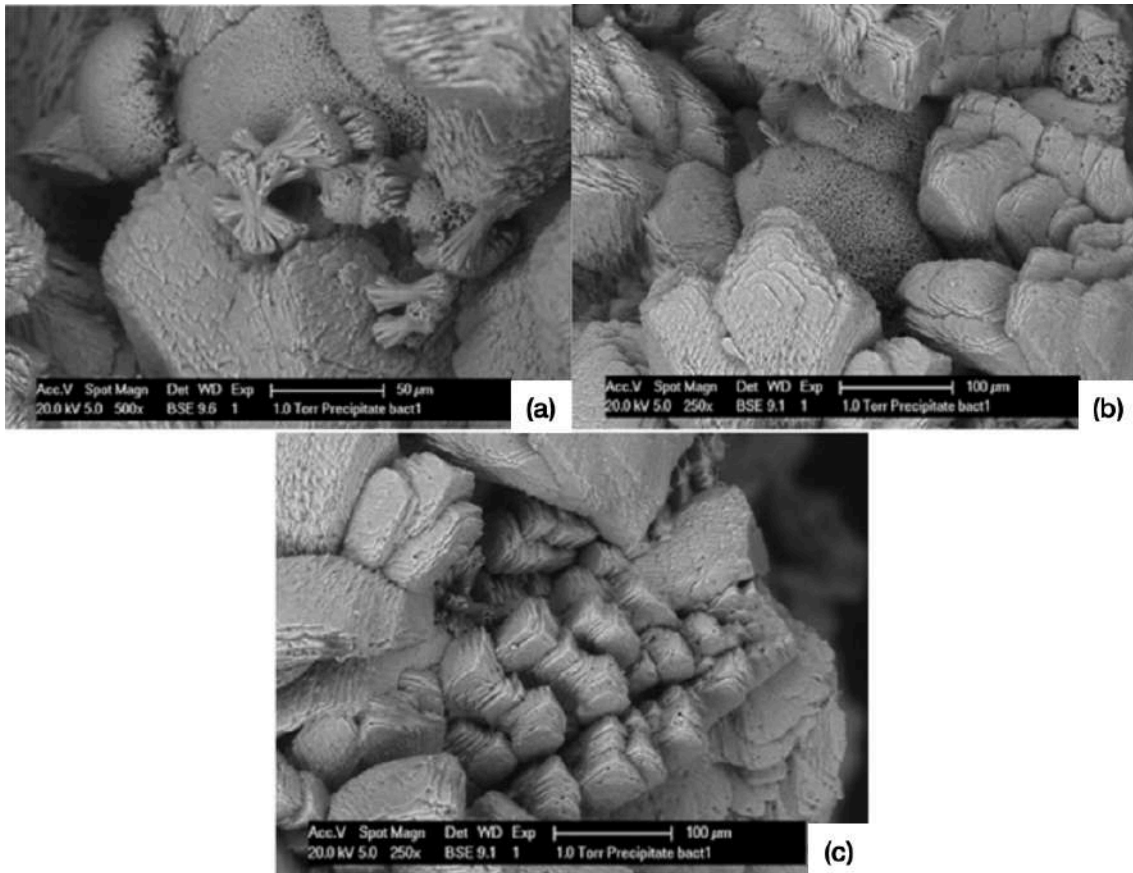
depois de 100 dias da imersão destes em água através do estereomicroscópio - Figura 14 e apenas as argamassas bacterianas submersas foram analisadas pelo MEV - Figura 15.

Figura 14: Espectrometria de argamassas (a) AR antes da cura, (b) AB antes da cura, (c) AR após a cura e (d) AB após a cura.



Fonte: Adaptado de (WIKTOR; JONKERS, 2011).

Figura 15: MEV da argamassa bacteriana submersa (a) Aglomerados de calcita com formato de halteres, (b) e (c) Calcita com formato de romboedros lamelares deformados.

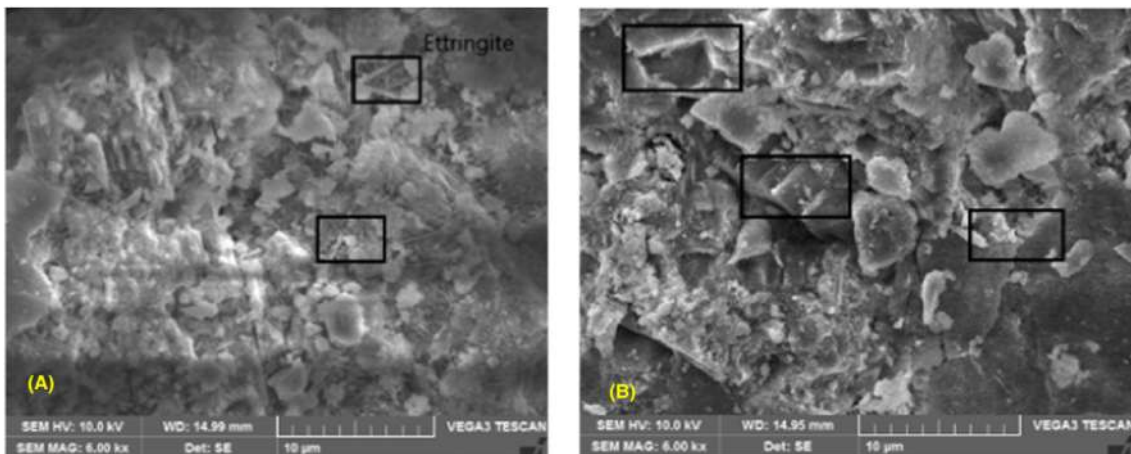


Fonte: Adaptado de (WIKTOR; JONKERS, 2011).

Nessas imagens, é possível notar que as fissuras foram completamente preenchidas por precipitados extensivos nas argamassas bacterianas após a cura Figura 15(c). Após uma análise da composição do elemento por EDS, a composição dos precipitados se revelou ser principalmente uma ligação de átomos de cálcio, oxigênio e carbono, o que indica que os mesmos eram à base de carbonato de cálcio ($CaCO_3$). Além disso, esses cristais retirados da argamassa bacteriana, foram visualizados via MEV e os autores observaram duas morfologias diferentes da calcita romboédrica tradicional: romboedros lamelares “deformados”(Figura 15 (b) e (c)) e aglomerados semelhantes a agulhas com formato de halteres (Figura 15 – a). Como a quantidade substancial desses polimorfos precipitados, visivelmente de $CaCO_3$, foi verificada apenas na superfície fissurada da amostra bacteriana, isso indica que a sua formação está relacionada com a atividade bacteriana.

Nain et. al (2019) analisaram *Bacillus subtilis* (Figura 16(A)) e *Bacillus megaterium* (Figura 16(B)) com concentração de 10^8 cell/mL em amostras de concreto pelo MEV conforme a Figura 16 e pelo EDS.

Figura 16: MEV em amostras de concreto (A) *Bacillus subtilis* e (B) *Bacillus megaterium*.

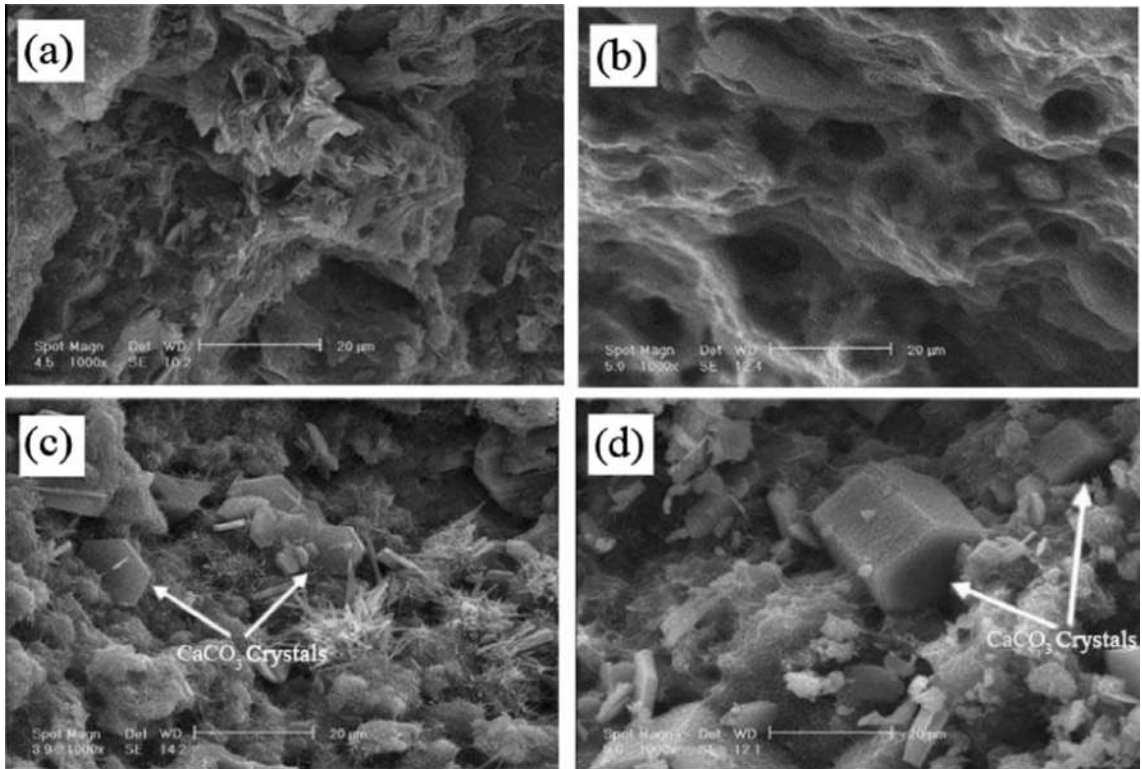


Fonte: (NAIN et al., 2019).

As imagens mostram a presença de etringita na forma de fibras e precipitação de calcita (forma romboédrica) branca que é resultado da reação química ocorrida devido à presença das bactérias. Após uma análise pelo EDS, o concreto bacteriano apresentou maior teor de CaO que o concreto convencional, com porcentagem desse composto na amostra por peso aos 28 dias de cura, de 79,08% para *B. subtilis* e 80,65% para *B. megaterium* (NAIN et al., 2019).

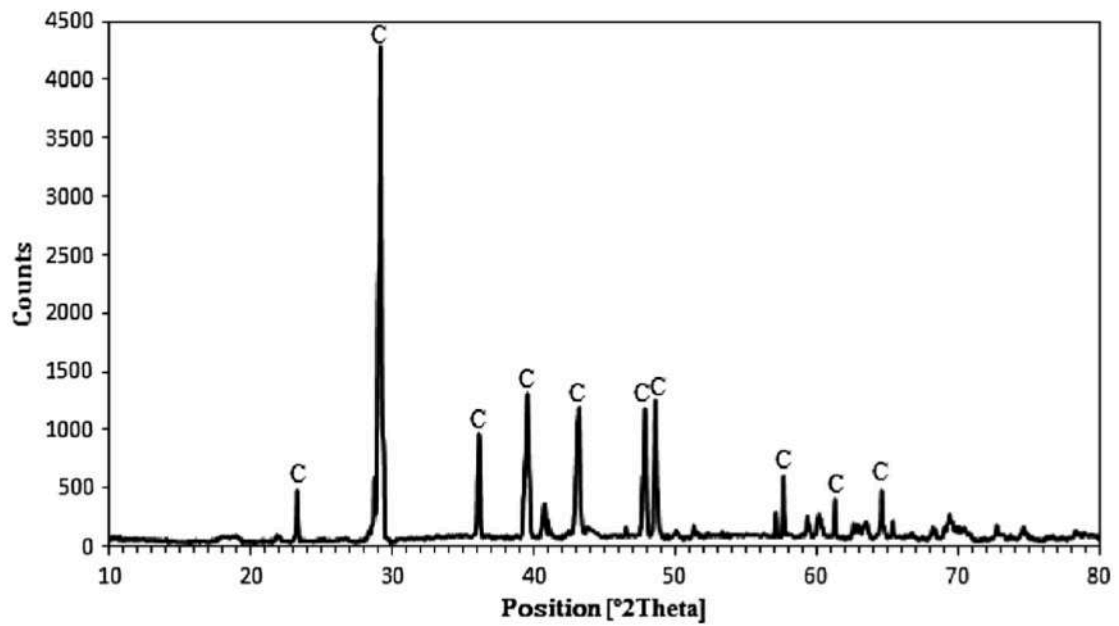
Já Kalhori e Bagherpour (2017) analisaram amostras de concreto contendo *B. subtilis* com concentração de $2,2 \times 10^6$ cell/mL adicionadas diretamente na água de amassamento Figura 17(c) e imersas durante a cura Figura 17(d), pelo MEV -Figura 17 e Difração de Raio X (DRX) - Figura 18 que também é utilizado para determinar a estrutura atômica e molecular de um cristal. Além das amostras de concreto contendo bactérias, os autores analisaram amostras referência curadas normalmente – Figura 17(a) e que foram imersas em solução contendo ureia e cloreto de cálcio - Figura 17 (b).

Figura 17: MEV das amostras após 28 dias de cura (a) Amostra referência, (b) Amostra referência imersa em solução, (c) e (d) Amostras bacterianas.



Fonte: (KALHORI; BAGHERPOUR, 2017).

Figura 18: Difractograma de DRX das precipitações na superfície das amostras.



Fonte: (KALHORI; BAGHERPOUR, 2017).

As amostras contendo bactérias (Figura 17 (c) e (d)) apresentaram estruturas cristalinas e regulares que não foram vistas nas demais. Elas também apresentaram uma estrutura mais densa e compacta devido à calcita produzida pela bactéria e, conseqüentemente, maior resistência que a controle. Após a análise por DRX das precipitações na superfície das amostras fissuradas, os resultados mostraram a presença de carbonato de cálcio e, dessa forma, os autores concluíram que a calcita induzida microbiologicamente foi a responsável pelo preenchimento dos poros no concreto (KALHORI; BAGHERPOUR, 2017).

Dessa forma, é possível concluir que as bactérias do gênero *Bacillus* são agentes promissores para promover autocura de materiais cimentícios, capazes de precipitar cristais de carbonato de cálcio, sob determinadas circunstâncias e cuidados.

3 METODOLOGIA

A metodologia deste estudo foi elaborada com base na investigação realizada por Mello e Santiago (2020). Os testes experimentais foram realizados nos laboratórios das empresas Consultare, Supermix e no Laboratório de Materiais de Construção da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas). Mello e Santiago (2020) encapsularam as bactérias do gênero *Bacillus subtilis* em argila expandida de acordo com a metodologia de Mors e Jonkers (2013); e escolheram os demais produtos utilizados (fungicida e bactericida microbiológico, lactato de cálcio e ureia), com base nas sugestões de Mors e Jonkers (2013) e Jonkers et. al (2010).

Mello e Santiago (2020) antes de iniciarem a confecção dos corpos de prova do concreto realizaram um teste preliminar para comprovar a existência das bactérias *Bacillus subtilis* no fungicida bactericida utilizado. Nesse procedimento foi utilizada a vermiculita, que possui características muito semelhantes à argila expandida, para a impregnação das bactérias. Após todo processo realizado por Mello e Santiago (2020), esses autores constataram o aglutinamento em diversos pontos da amostra de vermiculita impregnada com a solução bacteriana em condições ambientes e por meio do MEV, observaram a presença de esporos bacterianos na mesma amostra.

Desta forma, este estudo adotou a mesma metodologia e os mesmos materiais conforme abordados na pesquisa de Mello e Santiago (2020).

3.1 Materiais

Os materiais necessários para a realização deste experimento foram:

- cimento Portland CPIV-32 RS pega rápida;
- areia industrializada;
- agregado graúdo (Brita Gnaisse 0);
- água potável, proveniente da rede de distribuição da COPASA de Belo Horizonte;
- argila expandida da Cinexpan tipo 0500, de densidade aparente 850 Kg/m³, conforme o manual do fornecedor;

- fungicida bactericida microbiológico à base da bactéria *Bacillus subtilis* QST713, na concentração 13,68 g/L com mínimo de 1×10^9 UFC/g (unidade formadora de colônias/grama), denominado comercialmente de Serenade, do fabricante Bayer de Mexico S.A.;
- ureia – fertilizante mineral simples – natureza física granulada;
- lactato de cálcio.

3.2 Definição dos Traços

Para confecção dos corpos de prova deste experimento, o traço adotado em massa foi de 1:2,538:1,102 (cimento: areia: brita) – traço sugerido pela concreteira. Entretanto, houve a substituição de 30% do agregado graúdo pela argila expandida.

Foram confeccionados corpos de prova com adição de 500 mL e 250 mL de fungicida bactericida microbiológico à base da bactéria *Bacillus subtilis* (Serenade). Para os corpos de prova confeccionados com 500 mL do Serenade impregnado na argila expandida adotou-se a relação água/cimento de 0,50; enquanto os de 250 mL tiveram a relação a/c alterada para 0,55, para melhorar a trabalhabilidade. É importante ressaltar que, mesmo baseando na pesquisa de Mello e Santiago (2020), não foi o objetivo deste trabalho estudar o traço e os materiais adotados, nem comparar os resultados obtidos entre as análises realizadas.

Observa-se na Tabela 3 os traços para confecção dos corpos de prova com argila expandida com 500 mL (CB_500) e com 250 mL (CB_250) da solução bacteriana.

Tabela 3: Traços dos corpos de prova de concreto.

Traço	Cimento (Kg)	Areia (Kg)	Brita (Kg)	Argila com impregnação de bactéria (Kg)	Água/Cimento
CB_500	1	2,538	0,771	0,331	0,50
CB_250	1	2,538	0,771	0,331	0,55

Fonte: (AUTORA, 2022).

3.3 Impregnação das bactérias na argila expandida

O encapsulamento das bactérias na argila expandida foi o método escolhido para adicionar esses microorganismos à mistura de concreto devido ao fato de que elas são

muito sensíveis a alguns fatores, como o desgaste mecânico pela rotação da betoneira – conforme mencionado na revisão bibliográfica. Dessa forma, a chance de que as bactérias sobrevivam durante o processo de fabricação do concreto se torna maior (JONKERS, 2011; MELLO; SANTIAGO, 2020; MORS; JONKERS, 2013).

Antes de iniciar o processo de impregnação, a argila expandida da Cinexpan do tipo 0500 foi separada dentro da faixa granulométrica do agregado graúdo (brita 0) e do agregado miúdo (areia industrial) devido à grande quantidade de finos em sua composição, o que influenciaria na resistência final do concreto. Para isso, foi realizado o ensaio granulométrico deste material - Figura 19 - usando o agitador eletromagnético de peneiras (A) e, foi utilizada apenas a argila expandida que ficou retida entre as peneiras 1,18 mm e 4,75 mm (B).

Figura 19: Equipamentos para o ensaio granulométrico da argila expandida (A) Agitador eletromagnético de peneiras e (B) Peneiras.



Fonte: (AUTORA, 2022).

Em seguida, 9 kg (nove quilos) dessa argila foram separados para impregnação das bactérias. Para realizar este procedimento foram utilizados além da argila expandida e água, os seguintes materiais: ureia, lactato de cálcio e fungicida bactericida microbiológico Serenade que estão ilustrados, respectivamente, na Figura 20.

Figura 20: (A) Ureia, (B) Lactato de cálcio e (C) Serenade.



Fonte: (AUTORA, 2022).

Para a incorporação das bactérias na argila expandida com 500 mL e com 250 mL do produto Serenade, foram realizadas as seguintes etapas, separadamente, para cada quantidade a ser analisada:

- I. Aquecer 3 L de água a 80°C.
- II. Despejar a água em um recipiente e controlar a sua temperatura até atingir 30°C.
- III. Adicionar 4 g de ureia na água e misturar até a sua dissolução.
- IV. Adicionar 96 g de lactato de cálcio na solução (água + ureia) até dissolver completamente.
- V. Adicionar 500 mL ou 250 mL do produto Serenade até a solução ficar homogênea e aguardar 2 minutos para a sua estabilização.
- VI. Imergir 4 kg da argila expandida na solução (água + ureia + Serenade) e deixar em repouso por 24 horas - Figura 21.

Figura 21: Argila expandida imersa em 500 mL (bacia maior – à esquerda) e 250 mL (bacia menor – à direita) da solução bacteriana.



Fonte: (AUTORA, 2022).

- VII. Eliminar o excesso de líquido da mistura anterior através de uma peneira e colocar a argila expandida por 8 dias em uma estufa com temperatura de 37°C - Figura 22.

Figura 22: Argila expandida bacteriana: (A) e (B) sem o excesso de líquido; (C) e (D) dentro da estufa.



Fonte: (AUTORA, 2022).

Na etapa II, o controle da temperatura da água se deve ao fato de que as partículas de argila expandida, quando imersas em água aquecida com nutrientes e esporos bacterianos em suspensão, tem a sua absorção potencializada. Além disso, a temperatura de 37 °C constante na estufa estimula a estabilização da bactéria na argila, tornando-a inerte neste agregado (MELLO; SANTIAGO, 2020; MORS; JONKERS, 2013).

Após os oito dias, a argila expandida foi retirada da estufa e levada de volta ao laboratório, para iniciar a fabricação do bioconcreto.

3.4 Confeção dos Corpos de Prova

O traço adotado foi apresentado no item 3.2, de 1:2,538:1,102, com substituição de 30% do agregado graúdo pela argila expandida impregnada com bactérias e relação água/cimento de 0,5 para 500mL do produto Serenade e para 250mL a relação a/c foi de 0,545. O consumo dos materiais para cada traço do bioconcreto deste experimento encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Quantitativos dos materiais.

Bioconcreto	Cimento (kg)	Areia (kg)	Brita (kg)	Argila com impregnação de bactéria (kg)	Água (L)
CB_500	14,44	36,65	11,13	4,78	7,22
CB_250	14,44	36,65	11,13	4,78	7,87

Fonte: (AUTORA, 2022).

O procedimento para confeção do bioconcreto foi padronizado e os materiais foram adicionados em uma betoneira. Primeiramente, foi inserida a brita, seguida do cimento, da areia, da argila expandida impregnada com bactérias e por fim, da água, que foram misturados até se obter uma mistura homogênea - Figura 23.

Figura 23: Confeção do bioconcreto – (A) Materiais inseridos na betoneira; (B) Mistura homogênea



Fonte: (AUTORA, 2022).

Em seguida, para medir a consistência do concreto, ainda em seu estado fresco, foi realizado o ensaio de abatimento de tronco de cone ou slump test- Figura 24, conforme recomendações da NBR 67 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1998).

Figura 24: Slump test dos traços do bioconcreto.



Fonte: (AUTORA, 2022).

Após este ensaio, foram confeccionados 12 corpos de prova (CP) cilíndricos de 100 mm de diâmetro por 200 mm de altura - Figura 25(A), sendo 6 para cada traço. Cada CP foi moldado e curado conforme as recomendações previstas na NBR 5738 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2015) - Figura 25(B e C). Após a moldagem, os corpos de prova foram devidamente etiquetados, mantidos nos moldes por 24 horas e em seguida, desmoldados, permaneceram em câmara úmida com temperatura e umidade controladas até o dia dos ensaios não destrutivos (por meio do ultrassom), e destrutivos para determinar a resistência à compressão e tração por compressão diametral, realizados aos 28 dias de cura.

Figura 25: Confeção dos Corpos de Prova (A) Formas para moldagem dos corpos de prova cilíndricos, (B) Confeção dos CPs e (C) CPs moldados.



Fonte: (AUTORA, 2022).

3.5 Ensaio por Ultrassom

O ensaio ultrassônico é um método não destrutivo que possui o objetivo de detectar defeitos ou descontinuidades internas presentes nos materiais. Por meio da introdução de pulsos de ondas ultrassônicas no elemento em análise, este ensaio permite obter a velocidade e o tempo de propagação destes pulsos ao percorrerem uma determinada distância. Através das velocidades, é possível identificar falhas no interior da estrutura e estimar a resistência à compressão do concreto (ANDREUCCI, 2014; SCHIAVON, 2015).

Neste estudo foram utilizados dois transdutores separados, de forma que, quando acoplados na peça, um transmite e o outro recebe as ondas ultrassônicas, pelo arranjo de transmissão direta. O equipamento utilizado foi o Pundit Lab⁺ da Proceq para realizar o ensaio - Figura 26, que foi feito nos 12 corpos de prova do bioconcreto preparados, após 28 dias de cura, conforme as orientações da NBR 8802 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2013).

Figura 26: Ensaio de ultrassom - (A) CP preparado com uma fina camada de acoplante e o equipamento; (B) Transdutores acoplados no CP com medição direta.



Fonte: (AUTORA, 2022).

Após realizado o ensaio, os resultados da medição da velocidade e do tempo de propagação dos pulsos, da resistência à compressão estimada feitos pelo aparelho Pundit Lab⁺, foram tratados por meio do aplicativo Pundit Link, desenvolvido pela Proceq.

3.6 Ensaio de resistência à compressão

Para cada traço, três corpos de prova cilíndricos de 10x20 cm foram rompidos aos 28 dias para determinar a resistência à compressão, seguindo os requisitos da NBR 5739 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2018). Os CPs permaneceram em câmara úmida até o dia de ruptura e tiveram suas bases retificadas para garantir uma superfície lisa. Foi utilizada uma prensa hidráulica, da marca Forney, com capacidade de 125 toneladas, para realização deste ensaio - Figura 27.

Figura 27: Ensaio de resistência à compressão – (A) Corpos de prova retificados; (B) Prensa hidráulica Forney; (C) Início da ruptura do CP.



Fonte: (AUTORA, 2022).

3.7 Ensaio de resistência à tração por compressão diametral

Foi realizado o ensaio para determinar a resistência à tração por compressão diametral em 3 corpos de prova cilíndricos 10x20 cm, aos 28 dias, para cada traço, conforme requisitos da NBR 7222 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2011). Foi utilizado o equipamento universal da marca Emic, modelo DL20000, para romper os CPs e o programa Tesc versão 3.04, para computar os resultados obtidos Figura 28.

Figura 28: Prensa Universal da marca EMIC utilizada para realizar o ensaio de resistência à tração por compressão diametral.



Fonte: (AUTORA, 2022).

3.8 Análise microestrutural pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

A análise microestrutural pelo MEV foi realizada em fragmentos de três corpos de prova de cada traço, obtidos pela ruptura por resistência à compressão - Figura 29. Os testemunhos retirados dos bioconcretos rompidos ficaram armazenados e o ensaio para as amostras secas foi realizado após 96 dias da confecção dos CPs. Uma outra parte das amostras dos mesmos CPs foi molhada diariamente com água durante um mês, para então ser submetida à análise, que foi feita após 124 dias de moldagem.

Figura 29: Fragmentos do bioconcreto para análise microestrutural – (A) Traço referente a 250 mL de Serenade; (B) Traço com 500 mL de Serenade; (C) Arranjo para análise.



Fonte: (AUTORA, 2022).

O microscópio eletrônico de varredura utilizado para análise da microestrutura do bioconcreto foi do fabricante JEOL, modelo JSM-IT300 - Figura 30.

Figura 30: Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).



Fonte: (AUTORA, 2022).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, apresentam-se os resultados e análises obtidos pelos ensaios realizados e descritos no capítulo anterior.

4.1 Slump Test

Os resultados pelo ensaio de Slump Test foram obtidos ainda em seu estado fresco. Para o traço de 500 mL do produto Serenade (CB_500), o valor do slump foi igual a 10 cm, dentro do limite estipulado de 12 +/- 2 cm pela concreteira. Já para o traço de 250 mL (CB_250), devido a argila estar mais seca, foi necessário adicionar mais água até a mistura ter uma boa trabalhabilidade, e após isso, o valor do slump medido foi de 12 cm.

4.2 Ensaio por Ultrassom

Os resultados obtidos pelo ultrassom, a velocidade do pulso ultrassônico (VPU) média e o desvio padrão dos valores, referentes aos 12 corpos de prova de bioconcreto ensaiados aos 28 dias podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados do ensaio ultrassônico.

Bioconcreto	Tipo de medição	Velocidade (m/s)	Velocidade média (m/s)	Desvio Padrão (m/s)	Tempo (μ s)
CB_250(1)		4090			48,9
CB_250(2)		4049			49,4
CB_250(3)	Direta	4158	4105,67	38,00	48,1
CB_250(4)		4115			48,6
CB_250(5)		4132			48,4
CB_250(6)		4090			48,9
CB_500(1)		4292			46,6
CB_500(2)		4219			47,4
CB_500(3)	Direta	4292	4270,67	40,62	46,6
CB_500(4)		4292			46,6
CB_500(5)		4310			46,4
CB_500(6)		4219			47,4

Fonte: (AUTORA, 2022).

Um dos critérios utilizados para avaliar a qualidade do concreto é em função da velocidade de propagação de onda ultrassônica, que pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6: Relação entre a velocidade de propagação da onda e qualidade do concreto.

Velocidade de propagação linear (m/s)	Qualidade do concreto
V > 4500	Excelente
3500 < V < 4500	Ótimo
3000 < V < 3500	Bom
2000 < V < 3000	Regular
V < 2000	Ruim

Fonte: (CÁNOVAS, 1988 apud SAHUINCO; BITTENCOURT, 2012).

Quando o concreto não apresenta fissuras, vazios ou armaduras, as ondas sonoras percorrem o menor caminho, ou seja, uma linha reta entre os dois transdutores. Na presença de fissura, o caminho percorrido pelas ondas é interceptado de forma que elas precisam contornar a falha e, como consequência, o tempo de trânsito se torna maior (EVANGELISTA, 2002).

Dessa forma, conforme as informações dos quadros acima, pode-se considerar que os bioconcretos moldados nos dois traços, apresentaram uma ótima qualidade. É possível observar também, que a velocidade do pulso ultrassônico para o traço de 500mL (CB_500) – 4.270,67 m/s foi superior ao traço utilizando 250 mL (CB_250) do fungicida bactericida biológico (4.105,67m/s). Essa diferença pode estar relacionada a relação a/c que foi um pouco maior para o traço CB_250 que, por sua vez, pode levar a um aumento da porosidade e permeabilidade do material cimentício, provocando uma menor velocidade de propagação linear.

4.3 Resistência à compressão

Os resultados do ensaio para determinar a resistência à compressão em 6 corpos de prova aos 28 dias, sendo 3 de cada traço e a resistência média desses valores, podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7: Resultados da Resistência à compressão-

Bioconcreto	Resistência (MPa)	Resistência média (MPa)
CB_250(1)	23,0	23,33
CB_250(2)	22,6	
CB_250(4)	24,4	
CB_500(2)	27,5	27,97
CB_500(3)	28,2	
CB_500(5)	28,2	

Fonte: (AUTORA, 2022).

A partir desses resultados, observa-se uma resistência à compressão maior nos corpos de prova com 500 mL do produto Serenade. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por meio do ensaio de ultrassom, e podem estar relacionados ao desempenho do concreto ser melhor quando há um menor número de vazios neste material.

Entre os valores acima, observa-se um aumento de, aproximadamente, 17% da resistência à compressão para o traço utilizando 500 mL do fungicida e bactericida biológico (CB_500(3) e CB_500(5)) comparado ao traço de 250 mL (CB_250(2)). Além da relação água/cimento influenciar nesta propriedade, já que o número de vazios no material pode aumentar ou diminuir, é importante ressaltar que a quantidade do produto que contém a bactéria também pode ter influenciado neste resultado. Em alguns estudos como os de Afifudin et. al (2011) e Nugroho, Satyarno e Subaktyo (2015), os autores observaram que a concentração da bactéria do gênero *Bacillus* influencia a quantidade de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) precipitado, que por sua vez, é capaz de preencher os poros e selar pequenas fissuras, proporcionando um ganho da resistência à compressão.

Desta forma, é possível que no concreto com o traço de 500 mL do Serenade tenha ocorrido uma maior precipitação dos cristais de $CaCO_3$ por terem o dobro da quantidade do produto contendo as bactérias. Sendo assim, a maior resistência à compressão encontrada no traço do CB_500, pode estar relacionada a um menor número de vazios constatados pelo ultrassom, provavelmente em função da relação a/c ter sido menor e, a possibilidade de uma maior quantidade de $CaCO_3$ precipitado.

4.4 Resistência à tração na compressão diametral

Os resultados do ensaio para determinar a resistência à tração por compressão diametral em 6 corpos de prova aos 28 dias (sendo 3 de cada traço) e a resistência média desses valores se encontram na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados da Resistência à tração na compressão diametral.

Bioconcreto	Resistência (MPa)	Resistência média (MPa)
CB_250(3)	11,75	8,76
CB_250(5)	9,23	
CB_250(6)	5,30	
CB_500(1)	4,30	7,52
CB_500(4)	10,26	
CB_500(6)	7,99	

Fonte: (AUTORA, 2022).

Os corpos de prova que continham 250 mL do fungicida e bactericida biológico tiveram um valor médio superior, de aproximadamente, 16% comparado aos CPs que foram confeccionados com 500 mL do produto. Apesar do resultado da resistência à tração encontrado ser diferente dos resultados apresentados na revisão bibliográfica deste estudo, não se sabe ao certo o motivo desta diferença devido a quantidade de corpos de prova para análise ter sido pequena e valores dispersos.

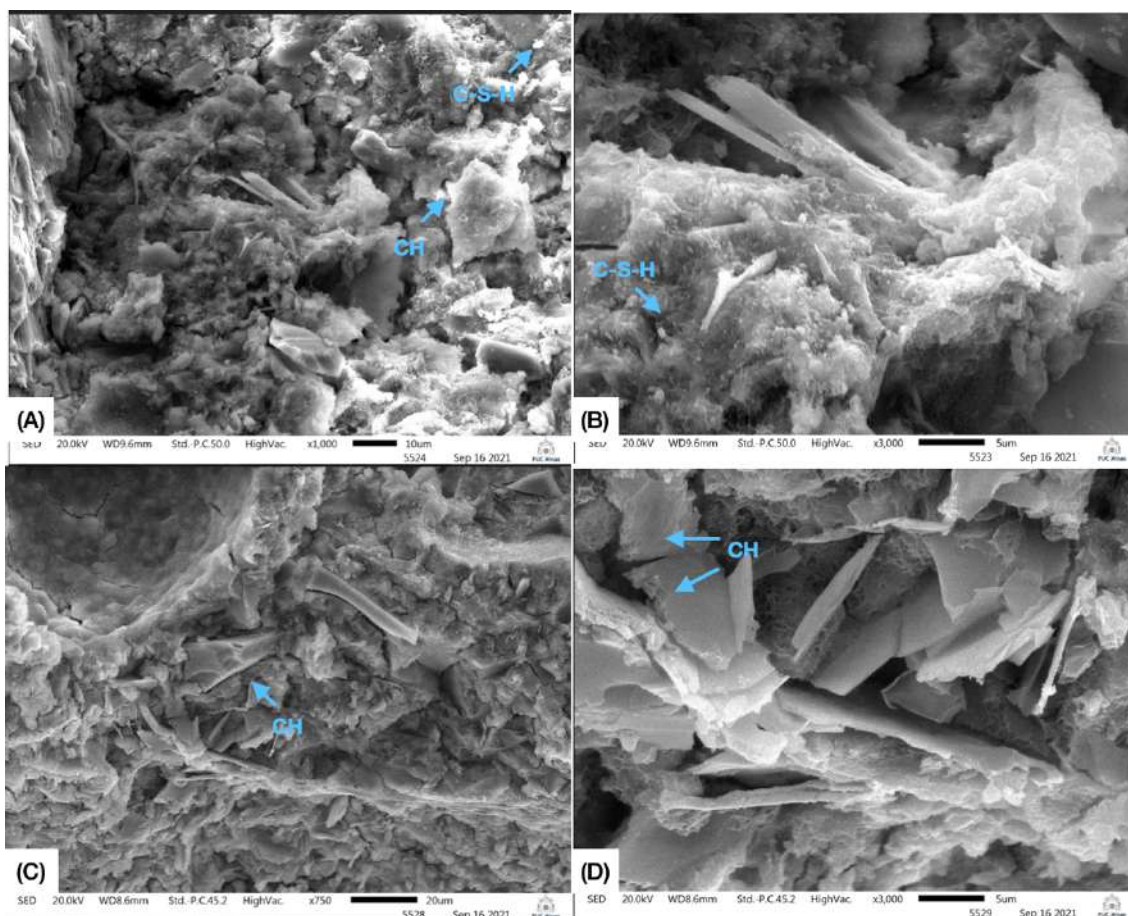
4.5 Análise da microestrutura no MEV

As amostras dos corpos de prova rompidos foram submetidas à análise microestrutural via MEV para verificar se houve precipitação de carbonato de cálcio nas amostras contendo o fungicida e bactericida biológico. Nas imagens foram adotadas as seguintes abreviações para identificar os cristais e produtos de hidratação:

- $CaCO_3$ – Carbonato de Cálcio
- C-S-H – Silicato de Cálcio Hidratado
- CH – Hidróxido de Cálcio
- *Etr* - Etringita

As imagens obtidas para duas amostras secas (CB_250(1) e CB_250(2)) com 250 mL do produto Serenade após 96 dias da confecção dos CPs, com ampliações de 750, 1000 e 3000x encontram-se na Figura 31.

Figura 31: MEV das amostras secas com 250 mL do produto Serenade (A) CB_250(1) com ampliação de 1000x, (B) CB_250(1) com ampliação de 3000x, (C) CB_250(2) com ampliação de 750x e (D) CB_250(2) com ampliação de 3000x.

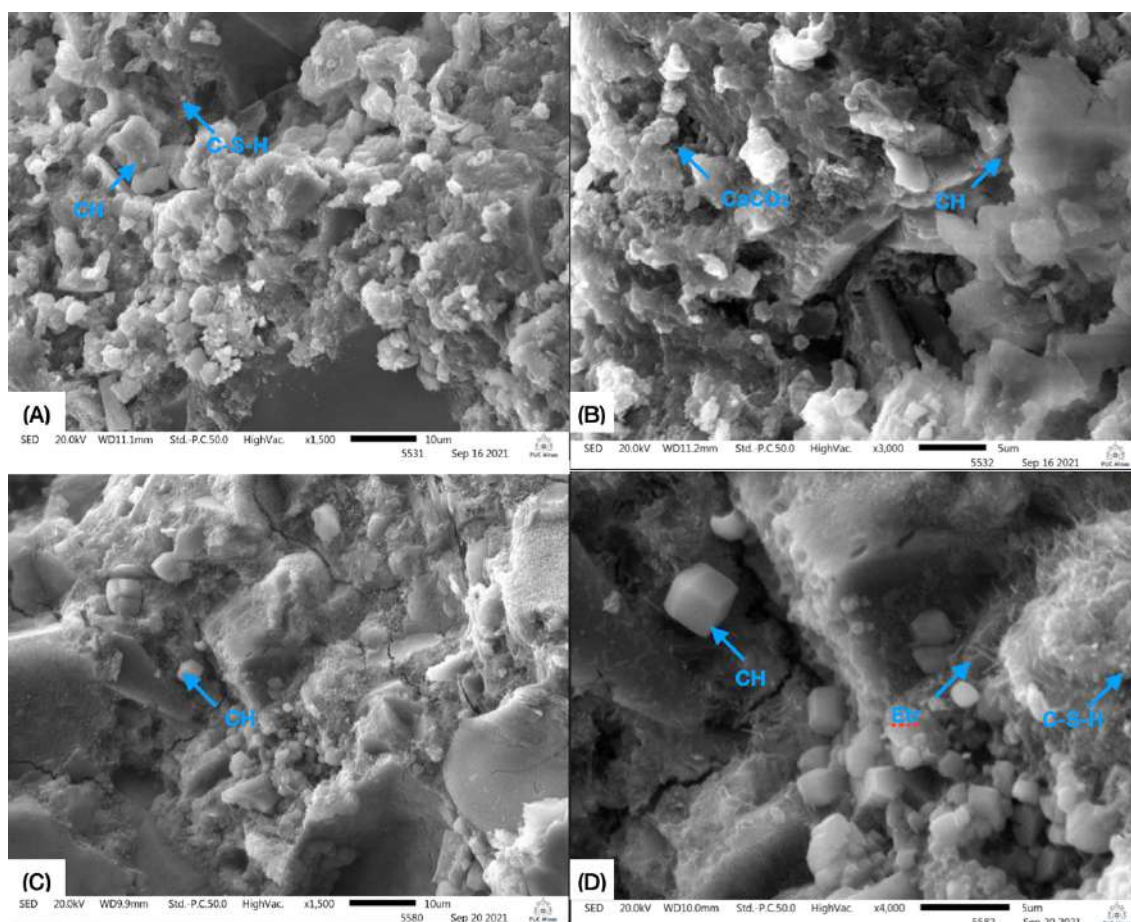


Fonte: (AUTORA, 2022).

É possível observar nessas imagens a formação dos produtos de hidratação do cimento como o hidróxido de cálcio (CH) e o silicato de cálcio hidratado (C-S-H). No entanto, não foram observados os cristais de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) nas amostras secas do concreto contendo 250 mL do bactericida e fungicida microbiológico.

As imagens para duas amostras secas (CB_500(1) e CB_500(2)) com 500 mL do produto Serenade após 96 dias da confecção dos CPs, com ampliações de 1500, 3000 e 4000x encontram-se na Figura 32.

Figura 32: MEV das amostras secas com 500 mL do produto Serenade (A) CB_500(1) com ampliação de 1500x, (B) CB_500(1) com ampliação de 3000x, (C) CB_500(2) com ampliação de 1500x e (D) CB_500(2) com ampliação de 4000x.



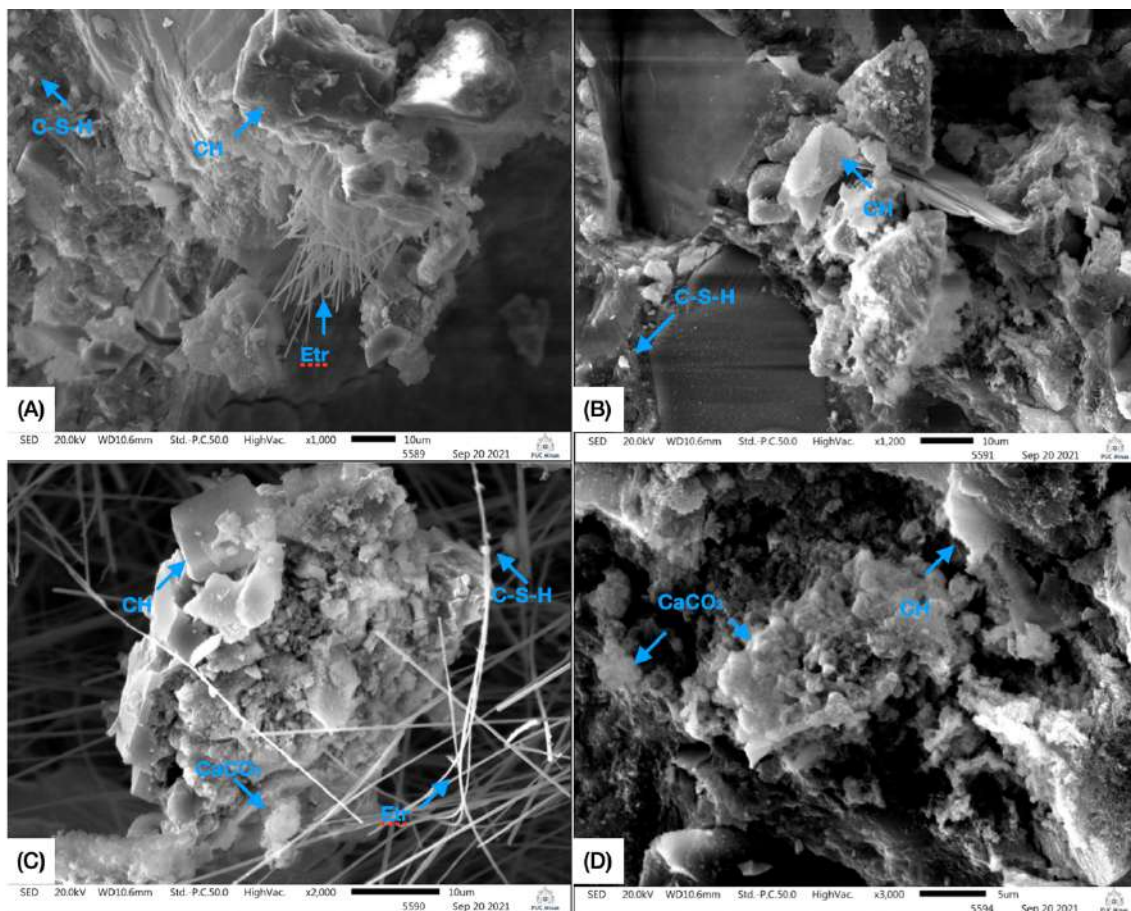
Fonte: (AUTORA, 2022).

Nas imagens acima pode-se observar a formação dos produtos de hidratação do cimento como o hidróxido de cálcio (CH), o silicato de cálcio hidratado (C-S-H) e a etringita (Etr). Além destes, alguns cristais de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) foram visíveis nas amostras.

Ao se comparar a Figura 31 e a Figura 32, foi observada uma maior formação de produtos de hidratação nas amostras contendo 500 mL do fungicida bactericida microbiológico. Essa quantidade superior pode estar relacionada com a maior concentração da bactéria *Bacillus Subtilis* nos corpos de prova confeccionados e sua consequente precipitação.

Após a molhagem por um mês dos fragmentos, eles foram novamente submetidos ao MEV. As imagens da amostra úmida (CB_250(U)) com 250 mL do produto Serenade após 124 dias da moldagem dos CPs, com ampliações de 1000, 1200, 2000 e 3000x podem ser observadas na Figura 33.

Figura 33: MEV das amostras úmidas com 250 mL do produto Serenade (A) CB_250(U) com ampliação de 1000x, (B) CB_250(U) com ampliação de 1200x, (C) CB_250(U) com ampliação de 2000x e (D) CB_250(U) com ampliação de 3000x.

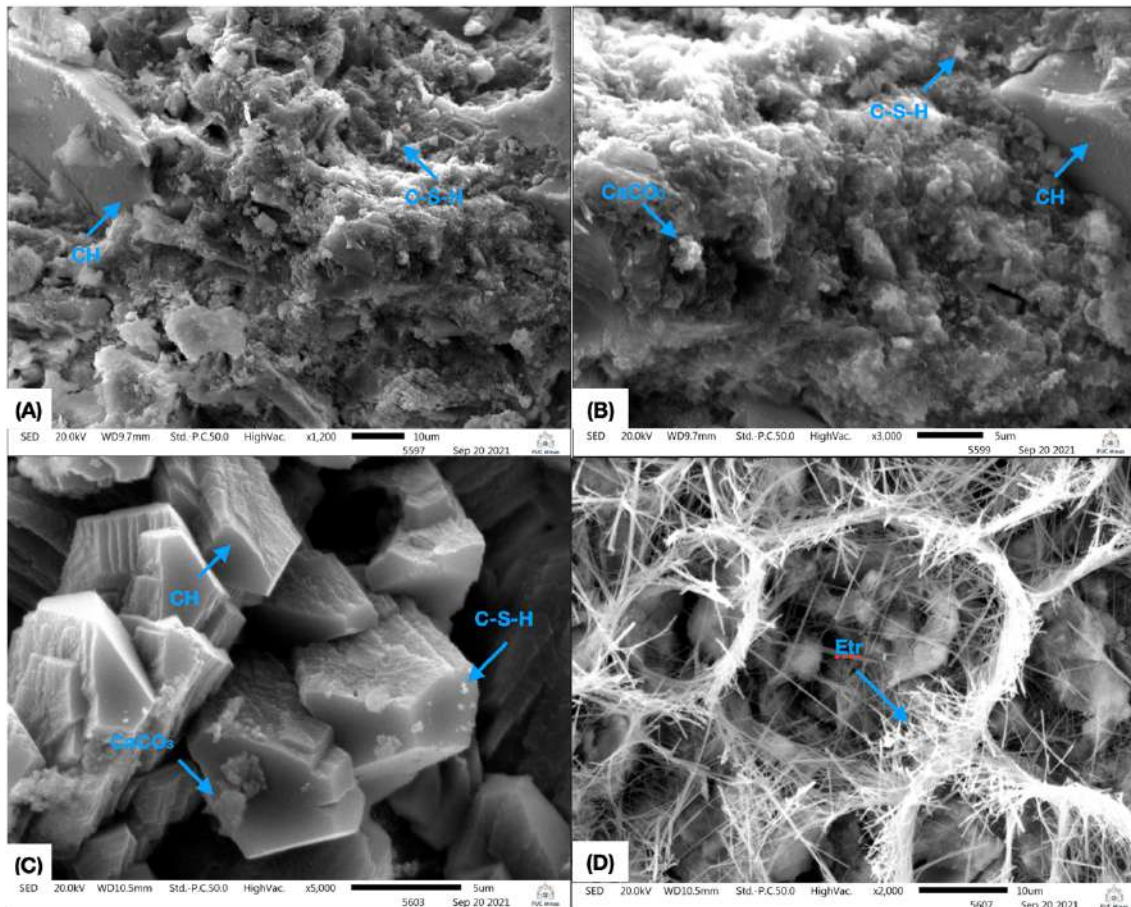


Fonte: (AUTORA, 2022).

As imagens acima mostram a formação do hidróxido de cálcio (CH), do silicato de cálcio hidratado (C-S-H) e etringita (Etr). Foram observados também alguns cristais de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) nas amostras secas do concreto contendo 250 mL do bactericida fungicida microbiológico.

A seguir, observa-se na Figura 34, as imagens via MEV das amostras úmidas (CB_500(U1) e CB_500(U2)) com 500 mL do produto Serenade após 124 dias da moldagem dos CPs, com ampliações de 1200, 2000 e 3000 e 5000x.

Figura 34: MEV das amostras úmidas com 500 mL do produto Serenade (A) CB_500(U1) com ampliação de 1200x, (B) CB_500(U1) com ampliação de 3000x, (C) CB_500(U1) com ampliação de 5000x e (D) CB_500(U2) com ampliação de 2000x.



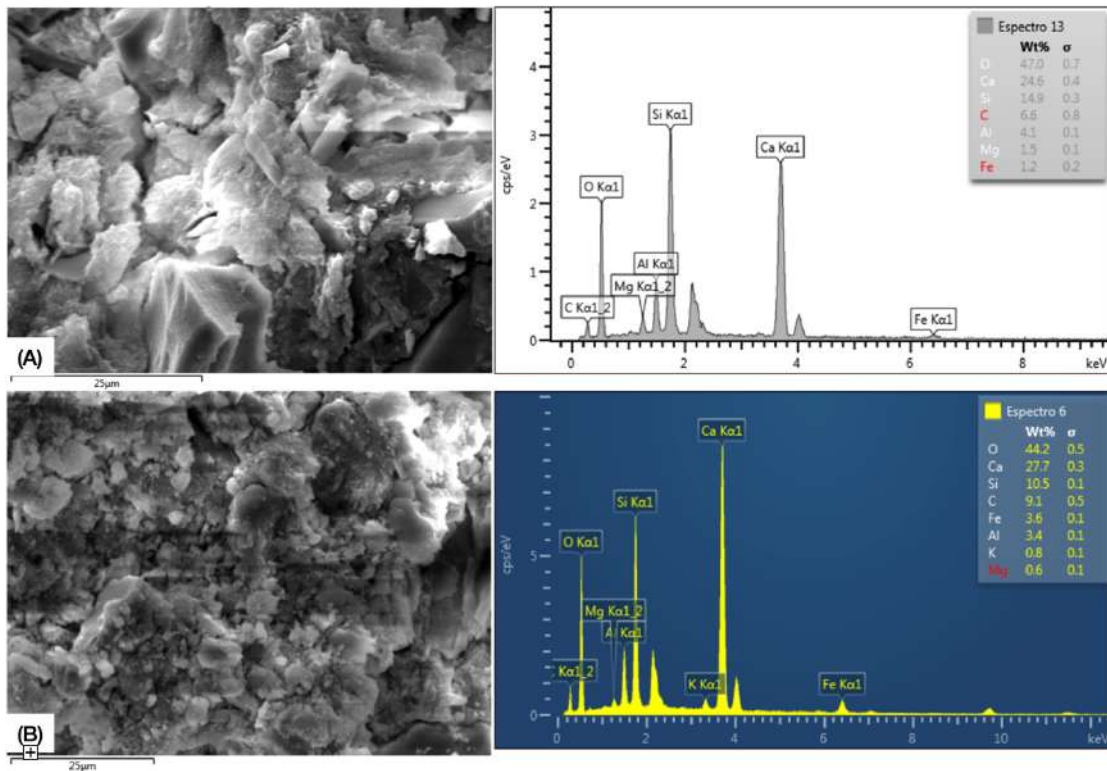
Fonte: (AUTORA, 2022).

É possível observar que também houve a formação do hidróxido de cálcio (CH), do silicato de cálcio hidratado (C-S-H) e da etringita (Etr). Além destes, alguns cristais de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) foram visíveis nas amostras analisadas.

Ao analisar a Figura 33 e a Figura 34, nota-se que os produtos de hidratação do cimento, entre eles a etringita que é rica em cálcio, assim como os cristais de ($CaCO_3$) foram encontrados em ambas as amostras. Vale ressaltar que nas amostras úmidas foi observada uma maior quantidade desses produtos quando comparadas às amostras secas, o que já era esperado, uma vez que a água influencia diretamente na precipitação do carbonato de cálcio.

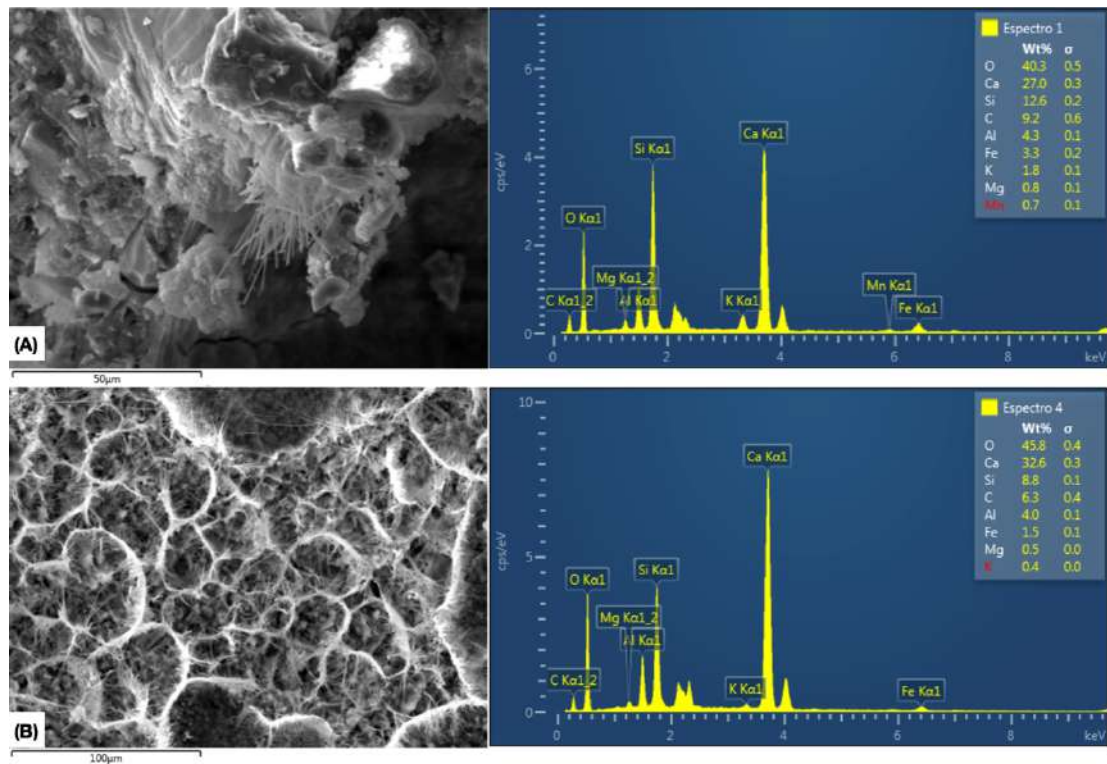
Por fim, com o objetivo de contribuir com a análise, alguns fragmentos foram submetidos a Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios-X (EDS), que identificou os elementos químicos presentes no local. A seguir estão as imagens obtidas pelo MEV e seus respectivos gráficos com os picos dos elementos químicos encontrados no local analisado, sendo a Figura 35 referente às amostras secas contendo 250 mL (CB_250) e 500 mL (CB_500) do fungicida bactericida microbiológico e a relativa às amostras úmidas contendo 250 mL (CB_250(U)) e 500 mL (CB_500(U)) do produto.

Figura 35: EDS das amostras secas (A) CB_250 e (B) CB_500.



Fonte: (AUTORA, 2022).

Figura 36: EDS das amostras úmidas (A) CB_250(U) e (B) CB_500(U).



Fonte: (AUTORA, 2022).

Observa-se que na Figura 35 e na Figura 36 houve picos de cálcio (Ca) em todas as amostras analisadas. Na Figura 36, os valores de porcentagem de Ca presentes foram ainda maiores, especialmente na Figura 36(B), podendo estar relacionado à etringita que estava presente nos pontos analisados. Além disso, esses resultados sugerem a possibilidade da presença dos cristais de carbonato de cálcio, uma vez que também estavam presentes carbono (C) e oxigênio (O) nestes fragmentos, produtos da reação da bactéria *Bacillus Subtilis* com o meio inserido e a água.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E FUTUROS DESENVOLVIMENTOS

5.1 Considerações Finais

Considerando os resultados obtidos e das pesquisas de referência utilizadas, é possível perceber que a precipitação mineral por meio da aplicação de bactérias no concreto é promissora. As bactérias podem agir como catalisadores quando um precursor mineral adequado rico em cálcio é adicionado à matriz cimentícia, promovendo assim a formação de cristais de carbonato de cálcio, quando esse processo é realizado de forma apropriada.

Os corpos de prova aqui analisados apresentaram bons resultados de resistência à compressão e a tração na compressão diametral, assim como no ensaio não destrutivo por meio de ultrassom.

Para a resistência à compressão, foi observado um aumento de, aproximadamente, 25% para o traço utilizando 500 mL do fungicida e bactericida biológico comparado ao traço de 250 mL. Além da relação água/cimento influenciar nesta propriedade, é possível que a quantidade inserida do produto também esteja relacionada a este resultado, uma vez que a concentração da bactéria do gênero *Bacillus* influencia na quantidade de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) precipitado que, por sua vez, também está ligado a um melhor desempenho da resistência à compressão.

Com relação à tração na compressão diametral, os resultados foram opostos aos da resistência à compressão. Os corpos de prova que continham 250 mL do produto Serenade tiveram um valor médio superior, de aproximadamente, 16% comparado aos CPs fabricados com 500 mL do produto. Dessa forma, para trabalhos futuros, recomenda-se uma maior quantidade de amostras de corpos de prova para análise.

Já a velocidade do pulso ultrassônico para o traço contendo 500 mL do fungicida e bactericida biológico foi superior à do traço utilizando 250 mL do produto. Como já mencionado, essa diferença pode estar relacionada a relação a/c que foi maior para o traço do CB_250 que, por sua vez, influencia na porosidade e permeabilidade do material cimentício, provocando uma menor velocidade de propagação linear.

Quanto à análise via MEV e EDS para as amostras, os resultados foram positivos para a presença dos produtos de hidratação do cimento e dos cristais de carbonato de cálcio. A variação da quantidade do bactericida e fungicida biológico inserida na fabricação dos corpos de prova, impactou na formação destes produtos, já que eles foram vistos em maiores quantidades nas amostras que continham 500 mL do Serenade, especialmente nas amostras úmidas, onde a Etringita e o $CaCO_3$ foram visivelmente identificados nos locais analisados.

Por fim, diante dos resultados apresentados, os corpos de prova do concreto bacteriano tiveram um bom desempenho nas propriedades analisadas. O bioconcreto, evidentemente, precisa ainda ser muito estudado, mas ele possui inúmeras vantagens para a construção civil, especialmente na área de Patologia das Estruturas de Concreto, bem como para o meio ambiente.

5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros

Muitos fatores envolvidos no processo de confecção do bioconcreto podem interferir na sua qualidade e no seu desempenho. Desta forma, para trabalhos futuros sugere-se:

- aumentar a quantidade de amostras para os mesmos traços adotados neste trabalho;
- analisar outros traços de bioconcreto com quantidades distintas do produto Serenade;
- comparar a presença dos produtos de hidratação do cimento e dos cristais de carbonato de cálcio em amostras de bioconcreto confeccionados com Serenade e com culturas de bactéria do gênero *Bacillus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-EL-ENEIN, S. A. et al. Application of microbial biocementation to improve the physico-mechanical properties of cement mortar. **HBRC Journal**, v. 9, n. 1, p. 36–40, 2013.
- ACHAL, V.; PAN, X. Influence of calcium sources on microbially induced calcium carbonate precipitation by *Bacillus* sp. CR2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 1, p. 307–317, 2014.
- AFIFUDIN, H. et al. Microbial Participation in the Formation of Calcium Silicate Hydrated (CSH) from *Bacillus subtilis*. **Procedia Engineering**, v. 20, p. 159–165, 2011.
- ANDREUCCI, R. **Ensaio por ultrassom**. Disponível em: <www.abendi.org.br>. Acesso em: 31 jan. 2022.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR NM 67 - Concreto - Determinação da consistência pelo abatimento do tronco de cone** Brasil ABNT, 1998.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7222 - Concreto e argamassa - Determinação da resistência à tração por compressão diametral de corpos de prova cilíndricos**, Brasil, ABNT, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 8802 - Concreto endurecido - Determinação da velocidade da onda ultrassônica** Brasil ABNT, 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 5738 - Concreto - Procedimento para moldagem e cura dos corpos de prova** ABNT Brasil, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 5739 - Concreto - Ensaio de compressão de corpos de prova cilíndricos** Brasil ABNT, 2018.
- BANG, S. S.; GALINAT, J. K.; RAMAKRISHNAN, V. Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 4–5, p. 404–409, 2001.
- BESSLER, K. E.; RODRIGUES, L. C. Os polimorfos de carbonato de cálcio - Uma síntese fácil de aragonita. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 178–180, 2008.
- CASTANIER, S.; LE MÉTAYER-LEVREL, G.; PERTHUISOT, J.-P. Ca-carbonates precipitation and limestone genesis — the microbiogeologist point of view. **Sedimentary Geology**, v. 126, n. 1–4, p. 9–23, jul. 1999.
- DE MUYNCK, W.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 2, p. 118–136, 2010.

- DHAMI, N. K.; REDDY, S. M.; MUKHERJEE, A. Biofilm and Microbial Applications in Biomineralized Concrete. **Advanced Topics in Biomineralization**, n. 2, 2012.
- EVANGELISTA, A. C. J. **Avaliação da resistência do concreto usando diferentes ensaios não destrutivos**. Tese de Doutorado—Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.
- FRANKEL, R. B.; BAZYLINSKI, D. A. Biologically Induced Mineralization by Bacteria. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 54, n. 1, p. 95–114, 2003.
- GOROSPE, C. M. et al. Effects of different calcium salts on calcium carbonate crystal formation by *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 5, p. 903–908, 2013.
- GUPTA, S.; PANG, S. D.; KUA, H. W. Autonomous healing in concrete by bio-based healing agents – A review. **Construction and Building Materials**, v. 146, p. 419–428, 2017.
- HAMMES, F.; VERSTRAETE, W. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. **Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology**, n. 2002, p. 3–7, 2002.
- JONKERS, H. M. et al. Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 2, p. 230–235, 2010.
- JONKERS, H. M. Bacteria based self healing concrete. **Heron**, v. 56, n. 1, 2011.
- KALHORI, H.; BAGHERPOUR, R. Application of carbonate precipitating bacteria for improving properties and repairing cracks of shotcrete. **Construction and Building Materials**, v. 148, p. 249–260, 1 set. 2017.
- KONOPACKA-ŁYSKAWA, D.; KOŚCIELSKA, B.; ŁAPIŃSKI, M. Precipitation of Spherical Vaterite Particles via Carbonation Route in the Bubble Column and the Gas-Lift Reactor. **Jom**, v. 71, n. 3, p. 1041–1048, 2019.
- KRUMBEIN, W. E. Calcification by bacteria and algae. **Studies in Environmental Science**, v. 3, n. C, p. 47–68, 1979.
- LV, Z.; CHEN, H. Self-healing efficiency of unhydrated cement nuclei for dome-like crack mode in cementitious materials. **Materials and Structures**, v. 46, n. 11, p. 1881–1892, 20 nov. 2013.
- MALISKA, A. M. **Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise**. Disponível em: <www.usp.br/nanobiodev/wp-content/uploads/MEV_Apostila.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- MEERA, C. M.; SUBHA, V. **Strength And Durability assessment Of Bacteria Based Self-Healing Concrete IOSR Journal of Mechanical and Civil Engineering**. India: [s.n.]. Disponível em: <www.iosrjournals.org>, 2016.

- MEHTA, P. K.; MONTEIRO, P. Microestrutura do Concreto. In: **Concreto: Microestrutura, Propriedades e Materiais**. 3. ed. São Paulo: Editora IBRACON, 2008a.
- MEHTA, P. K.; MONTEIRO, P. J. M. Resistência. In: **Concreto Microestrutura, Propriedades e Materiais**. São Paulo: Editora IBRACON, 2008b.
- MELLO, G. N. A.; SANTIAGO, S. A. Avaliação da microestrutura e da resistência à compressão do concreto com incorporação de bactérias do gênero *Bacillus subtilis*. In: OLIVEIRA, E. A.; BRANCO, L. A. M. N. (Eds.). **Tecnologia em materiais e processos construtivos**. 1. ed. Ponta Grossa: Atena, 2020. v. 1.
- MORS, R. M.; JONKERS, H. M. Practical approach for production of bacteria-based agent-contained light weight aggregates to make concrete self-healing. **Icshm**, p. 240–243, 2013.
- NAIN, N. et al. Enhancement in strength parameters of concrete by application of *Bacillus* bacteria. **Construction and Building Materials**, v. 202, p. 904–908, 2019.
- NUGROHO, A.; SATYARNO, I.; SUBYAKTO. Bacteria as self-healing agent in mortar cracks. **Journal of Engineering and Technological Sciences**, v. 47, n. 3, p. 279–295, 2015.
- OSMAN, K. M. et al. Role of different microorganisms on the mechanical characteristics, self-healing efficiency, and corrosion protection of concrete under different curing conditions. **Journal of Building Engineering**, v. 41, n. January, p. 102414, 2021.
- PINTO DA SILVA FILHO, L. C.; HELENE, P. Análise de Estruturas de Concreto com Problemas de Resistência e Fissuração. In: ISAIA, G. C. (Ed.). **Concreto: Ciência e Tecnologia**. São Paulo: IBRACON, 2011.
- PRIYOM, S. N.; ISLAM, MD. M.; SHUMI, W. Utilization of *Bacillus Subtilis* Bacteria for Improving Mechanical Properties of Concrete. **Journal of the Civil Engineering Forum**, v. 1000, n. 1000, p. 97–108, 2020.
- RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos**, 2015.
- RIVADENEYRA, M. A. et al. Biomineralization of carbonates by *Halobacillus trueperi* in solid and liquid media with different salinities. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, n. 1, p. 39–46, 2004.
- RODRIGUEZ-NAVARRO, C. et al. Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2182–2193, 2003.
- SAHUINCO, M. H. C.; BITTENCOURT, T. N. **Utilização de métodos não destrutivos e semi destrutivos na avaliação de pontes de concreto: estudo de caso: BT/PCC**. São Paulo: [s.n.]. Disponível em:

<www.pcc.usp.br/files/text/publications/BT_00575.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2022.

- SAIFEE, S. N.; LAD, D. M.; JUREMALANI, J. R. Critical appraisal on Bacterial Concrete. **IJRDO-Journal Of Mechanical And Civil Engineering**, n. 3, p. 1479–2456, 2015.
- SARKAR, S. L.; AIMIN, X.; JANA, D. Scanning Electron Microscopy, X-Ray Microanalysis of Concretes. In: **Handbook of Analytical Techniques in Concrete Science and Technology**, 2001.
- SCHIAVON, K. F. B. **Estudo da aplicação de ultrassom na medição de tensões em estruturas de concreto**. São Carlos, 2015.
- SCHWANTES, N. **Desempenho de Bacillus sp na biocimentação de materiais cimentícios**. Londrina, 2017.
- SCHWANTES-CEZARIO, N. et al. Effects of Bacillus subtilis biocementation on the mechanical properties of mortars. **Revista IBRACON de Estruturas e Materiais**, v. 12, n. 1, p. 31–38, 2019.
- SEIFAN, M.; SAMANI, A. K.; BERENJIAN, A. Bioconcrete: next generation of self-healing concrete. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2591–2602, 2016.
- SIVA, T. et al. Enhanced Polymer Induced Precipitation of Polymorphous in Calcium Carbonate: Calcite Aragonite Vaterite Phases. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 27, n. 3, p. 770–778, 2017.
- SOURADEEP, G.; KUA, H. W. Encapsulation Technology and Techniques in Self-Healing Concrete. **Journal of Materials in Civil Engineering**, v. 28, n. 12, p. 04016165, 2016.
- STANASZEK-TOMAL, E. Bacterial concrete as a sustainable building material? **Sustainability (Switzerland)**, v. 12, n. 2, 2020.
- STOCKS-FISCHER, S.; GALINAT, J. K.; BANG, S. S. Microbiological precipitation of CaCO₃. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 11, p. 1563–1571, 1999.
- TANG, H.; YU, J.; ZHAO, X. Controlled synthesis of crystalline calcium carbonate aggregates with unusual morphologies involving the phase transformation from amorphous calcium carbonate. **Materials Research Bulletin**, v. 44, n. 4, p. 831–835, 2009.
- VAN TITTELBOOM, K.; DE BELIE, N. **Self-healing in cementitious materials - a review**. v. 6, 2013.
- VIJAY, K.; MURMU, M. Effect of calcium lactate on compressive strength and self-healing of cracks in microbial concrete. **Frontiers of Structural and Civil Engineering**, v. 13, n. 3, p. 515–525, 2019.

- WANG, J. et al. X-ray computed tomography proof of bacterial-based self-healing in concrete. **Cement and Concrete Composites**, v. 53, p. 289–304, 2014.
- WANG, J. Y.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Diatomaceous earth as a protective vehicle for bacteria applied for self-healing concrete. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 567–577, 2012.
- WEINER, S. ; DOVE, P. M. An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 54, n. 1, p. 1–29, 1 jan. 2003.
- WIKTOR, V.; JONKERS, H. M. Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. **Cement and Concrete Composites**, v. 33, n. 7, p. 763–770, ago. 2011.
- WIKTOR, V.; JONKERS, H. M. Bacteria-based concrete: From concept to market. **Smart Materials and Structures**, v. 25, n. 8, 2016.