

**INFLUÊNCIA DA MINERALOGIA DO SOLO NA BIO-PRECIPITAÇÃO DE
CARBONATOS COMO TÉCNICA DE CIMENTAÇÃO DE SOLOS.**

VICTORIA ELENA MEZA OCHOA

**TESE DE DOUTORADO EM GEOTECNIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL**

**FACULDADE DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL

**INFLUÊNCIA DA MINERALOGIA DO SOLO NA BIO-
PRECIPITAÇÃO DE CARBONATOS COMO TÉCNICA DE
CIMENTAÇÃO DE SOLOS.**

VICTORIA ELENA MEZA OCHOA

ORIENTADOR: HERNAN EDUARDO MARTINEZ
CARVAJAL¹, D. Sc.

COORIENTADOR: MARCO ANTONIO MÁRQUEZ GODOY¹,
D. Sc.

TESE DE DOUTORADO EM GEOTECNIA

PUBLICAÇÃO: 153/19
BRASÍLIA/DF, MARÇO/2019.

¹ Universidad Nacional de Colombia - Medellín

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL

INFLUÊNCIA DA MINERALOGIA DO SOLO NA BIO-PRECIPITAÇÃO DE
CARBONATOS COMO TÉCNICA DE CIMENTAÇÃO DE SOLOS.

VICTORIA ELENA MEZA OCHOA

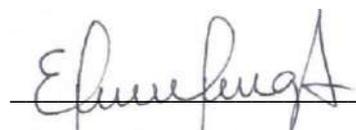
TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL
E AMBIENTAL DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR.

APROVADA POR:

JOSÉ CAMAPUM DE CARVALHO, Dr. (Universidade de Brasília)
(EXAMINADOR INTERNO)



CLAUDIA X. MORENO, D.Sc. (Universidad Nacional de Colombia)
(EXAMINADOR EXTERNO)



EDWIN GARCÍA ARISTIZÁBAL, D.Eng. (Universidad de Antioquia)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 29 de março de 2019.

FICHA CATALOGRÁFICA

MEZA OCHOA, VICTORIA ELENA

Influência Da Mineralogia Do Solo Na Bio-Precipitação De Carbonatos Como Técnica De Cimentação De Solos [Distrito Federal] 2019

xxiv, 247 p., 297 mm (ENC/FT/UnB, Doutora, Geotecnia, 2019)

Tese de doutorado - Universidade de Brasília. Faculdade de Tecnologia.

Departamento de Engenharia Civil e Ambiental

1. Biocimentação de solos

2. Biocalcita

3. Melhoria de solos

4. Carbonato de cálcio

5. Bioestabilização

6. Biogeotecnologia

I. ENC/FT/UnB

II. Título (série)

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

MEZA-OCHOA, V. E. (2019). Influência da mineralogia do solo na bio-precipitação de carbonatos como técnica de cimentação de solos. Tese de Doutorado, Publicação G.TD-março/19, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 247 p.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Victoria Elena Meza Ochoa.

TÍTULO DA TESE DE DOUTORADO: Influência da mineralogia do solo na bio-precipitação de carbonatos como técnica de cimentação de solos.

GRAU / ANO: Doutor / 2019

É concedida à Universidade de Brasília a permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Victoria Elena Meza Ochoa
vemeza@elpoli.edu.co
Medellín / Colômbia

Viver e não ter a vergonha
de ser feliz.

Cantar, e cantar a beleza de
ser um eterno aprendiz.

Beth Carvalho

DEDICATÓRIA

A meu Deus, Dios de amor. Eres un Dios de pactos, que cumples tu palabra y guías mi destino.

A meu amor, mi compañero de vida, MARCO ANTONIO, quien me alentó desde el principio y sacrificó todo, por verme cumplir este sueño. Sin ti, mi amor, esto no sería posible.

A mi hija JULIANA, el milagro de la vida que Dios me regaló justo en la mitad del camino. Hija, fuiste y serás siempre, el motor, el impulso que cada día necesito para comenzar de nuevo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar a oportunidade de viver esta experiência, por me dar a força para não vacilar apesar das dificuldades e por colocar anjos ao meu redor que me ajudaram a andar no caminho até que o sonho fosse realizado.

Ao Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, instituição que me deu seu apoio durante este tempo.

À Universidade de Brasília e ao programa de pós-graduação em Geotecnia da UnB, por me receber, pela oportunidade de estudar, adquirir uma experiência tão valiosa e por me permitir desenvolver a pesquisa na Colômbia, sem me separar da minha família. A o CNPq pelo apoio econômico.

Ao professor Hernán Martínez por sua vontade de me orientar e sempre tem a contribuição certa no momento certo.

À Universidade Nacional da Colômbia e especialmente ao Laboratorio de Biomineralogia e Biohidrometalurgia (LBB) que me recebeu para fazer o estágio acadêmico e o desenvolvimento experimental da tese. Não tenho palavras para agradecer ao professor Marco Antonio Márquez, que mais do que coorientador da tese, com sua experiência fez contribuições inestimáveis no desenvolvimento da pesquisa e conseguiu me transmitir sua paixão pela ciência e pela pesquisa, obrigada.

A meus colegas do LBB da Universidade Nacional da Colômbia, que estiveram sempre dispostos a esclarecer minhas dúvidas e contribuir para esta pesquisa com seus conhecimentos específicos, a Andrés Medina e especialmente a Marta Echeverry, que no caminho se tornou uma amiga para a vida toda.

RESUMO

INFLUÊNCIA DA MINERALOGIA DO SOLO NA BIO-PRECIPITAÇÃO DE CARBONATOS COMO TÉCNICA DE CIMENTAÇÃO DE SOLOS.

O desenvolvimento de vilas e cidades no mundo, gerou a necessidade de expandir a infraestrutura civil para novas áreas ou melhorar as já existentes. Sendo “o solo” um dos principais recursos para estes novos desenvolvimentos, é necessário desenvolver novas tecnologias, para a melhoria de suas propriedades e adaptá-las às necessidades específicas de cada projeto.

Nas últimas décadas, emerge a biogeotecnologia, oferecendo a aplicação de processos biológicos e microbiológicos, como alternativa para resolver diversos problemas da engenharia geotécnica, alternativa que pode ser ambientalmente sustentável e economicamente competitiva com as tecnologias existentes. Inicialmente as técnicas biológicas consistiam na aplicação de plantas para a prevenção e mitigação da erosão e estabilidade de encostas. Mais recentemente, os estudos focaram-se na utilização de microrganismos, que a partir da sua atividade metabólica e como consequência desta, podem modificar as propriedades de engenharia dos solos.

Neste sentido, foi desenvolvida esta pesquisa, buscando aprofundar no conhecimento do processo de precipitação de carbonatos mediado por microrganismos (*MICCP- Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation*”), que tem sido estudado para sua aplicação como técnica de melhoria do solo. Pesquisas em MICCP, mostraram que este processo biomediado é muito eficiente para bio-cimentar areias finas, compostas principalmente por quartzo.

Buscando ampliar o uso desse processo em solos de diversas composições mineralógicas, nesta pesquisa foi analisada a influência da mineralogia do solo na precipitação de carbonatos e foram utilizados como substratos uma areia de quartzo, um caulim e uma bentonita. A seleção do microrganismo foi feita a partir de uma triagem de 13 microrganismos comerciais. O estudo experimental foi realizado a diferentes níveis, iniciando em Erlenmeyer e terminando em colunas cilíndricas de solo. Os resultados verificaram a utilização da bactéria *Sporosarcina pasteurii*, como o melhor microrganismo para induzir a precipitação de carbonatos no solo. Nos ensaios em Erlenmeyer, o comportamento das variáveis pH, oxigênio dissolvido e cálcio em solução, foi influenciado

pelos diferentes substratos. A mineralogia do substrato teve grande influência no polimorfo e na quantidade de carbonato de cálcio precipitado. Finalmente, diferentes graus de cimentação foram obtidos nas colunas de solo, dependendo das dosagens utilizadas.

RESUMEN

INFLUENCIA DE LA MINERALOGÍA DEL SUELO EN LA BIO-PRECIPITACIÓN DE CARBONATOS COMO TÉCNICA DE CIMENTACIÓN DE SUELOS.

El desarrollo de pueblos y ciudades en el mundo, generó la necesidad de expandir la infraestructura civil hacia nuevas áreas o mejorar las ya existentes. Siendo "el suelo" uno de los principales recursos para estos nuevos desarrollos, es necesario desarrollar nuevas tecnologías, para mejorar sus propiedades y adaptarse a las necesidades específicas de cada proyecto.

En las últimas décadas, emerge la biogeotecnología, ofreciendo la aplicación de procesos biológicos y microbiológicos, como alternativa para resolver diversos problemas de la ingeniería geotécnica, alternativa que puede ser ambientalmente sostenible y económicamente competitiva con las tecnologías existentes. Inicialmente las técnicas biológicas consistían en la aplicación de plantas para la prevención y mitigación de la erosión y estabilidad de laderas. Más recientemente, los estudios se enfocaron en la utilización de microorganismos, que a partir de su actividad metabólica y como consecuencia de ésta, pueden modificar las propiedades de ingeniería del suelo.

En este sentido, se desarrolló esta investigación, buscando profundizar en el conocimiento del proceso de precipitación de carbonatos mediado por microorganismos (*MICCP-Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation*), que ha sido ampliamente estudiado para su aplicación como técnica de mejora del suelo. Investigaciones en MICCP, mostraron que este proceso biomediado es muy eficiente para bio-cementar de arenas de grano medio y fino, compuestas principalmente por cuarzo.

En esta investigación, se estudió la influencia de la mineralogía del suelo en la precipitación de carbonatos y se utilizaron como sustratos una arena de cuarzo de grano medio, un caolín y una bentonita. La selección del microorganismo, fue hecha de un *triagem* de 13 microorganismos comerciales. El estudio experimental fue realizado a

diferentes niveles, iniciándose en Erlenmeyer y terminando en columnas cilíndricas de suelo. Los resultados verificaron la utilización de la *Sporosarcina pasteurii*, como el mejor microorganismo para inducir la precipitación de carbonatos en el suelo. En los ensayos en Erlenmeyer, el comportamiento de las variables pH, oxígeno disuelto y calcio en solución fue influenciado por los diferentes sustratos. La mineralogía del sustrato tuvo principal influencia en el polimorfo y la cantidad de carbonato de calcio precipitado. Finalmente, diferentes grados de cementación fueron obtenidos en las columnas de suelo, dependiendo de las mezclas de suelos que se utilizaron.

INDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DA PESQUISA	2
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 OBJETIVO GERAL	3
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
1.3 ABRANGÊNCIA DA PESQUISA	4
1.4 ESTRUTURA DO TRABALHO	4
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	6
2.1 TÉCNICAS DE MELHORIA DE SOLOS	6
2.2 BIOGEOLOGIA	9
2.2.1 PROCESSOS BIOGEOQUÍMICOS POTENCIALMENTE APLICÁVEIS PARA MELHORIA DO SOLO	9
2.2.1.1 Biomineralização	10
2.2.1.2 Transformação de minerais	12
2.2.1.3 Geração de biofilmes e biopolímeros	13
2.2.1.4 Geração de biogás	13
2.2.2 PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO	14
2.3 PRECIPITAÇÃO DE CARBONATOS DE CÁLCIO INDUZIDA MICROBIOLOGICAMENTE- MICCP	16
2.3.1 PROCESSOS METABÓLICOS UTILIZADOS NA MICCP	17
2.3.2 MICCP POR HIDRÓLISE DA UREIA	19
2.3.3 APLICAÇÕES DA MICCP	22
2.3.4 FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DA MICCP	25
2.4 BIOCIMENTAÇÃO POR MICCP, PARA ESTABILIZAÇÃO DE SOLOS	30
2.4.1 SOLOS E MICRORGANISMOS UTILIZADOS NA MICCP PARA BIOCIMENTAÇÃO	32
2.4.2 MÉTODOS DE APLICAÇÃO DA MICCP PARA A BIOCIMENTAÇÃO DO SOLO	35
2.4.2.1 Bio-estimulação e Bio-aumento	35
2.4.2.2 Biocimentação in situ: Biogrouting	36
2.4.2.3 Introdução e fixação das bactérias (biocimentação <i>in situ</i>)	38
2.4.3 EFEITO DA MICCP NAS PROPRIEDADES DO SOLO	41
2.4.3.1 Resistência ao cisalhamento	42

2.4.3.2	Permeabilidade	43
2.4.3.3	Resistência à compressão simples, s_{usc}	44
2.4.4	PESQUISAS FOCADAS À ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA MINERALOGIA E O TAMANHO DE PARTÍCULA NA MICCP	46
2.4.5	APLICAÇÕES DA MICCP EM AMOSTRAS DE GRANDE TAMANHO E APLICAÇÕES NO CAMPO50	
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	54
3.1.1	MICROORGANISMOS	54
3.1.2	MINERAIS E SOLOS UTILIZADOS	55
3.1.3	CARACTERIZAÇÃO DOS SOLOS	56
3.1.3.1	Caracterização física	56
3.1.3.2	Caracterização química	56
3.1.3.3	Caracterização mineralógica	57
3.2	BIOENSAIOS PRELIMINARES DE TRIAGEM	58
3.2.1	CULTURA DOS MICROORGANISMOS	58
3.2.2	BIOENSAIO PARA TRIAGEM DE CEPAS EM MEIO LÍQUIDO (SEM E COM SUBSTRATO MINERAL)	58
3.2.3	VERIFICAÇÃO DA BIOPRECIPITAÇÃO DE CARBONATOS DE CÁLCIO	62
3.2.3.1	Bioensaios sem substrato mineral	62
3.2.3.2	Bioensaio com areia de quartzo como substrato mineral	62
3.2.4	SELEÇÃO DOS MICROORGANISMOS PARA OS ESTÁGIOS DE BIOENSAIOS DE SOLOS AO NÍVEL DE ERLNMEYER E BIOCIMENTAÇÃO DE SOLOS	62
3.3	BIOENSAIOS DE SOLOS - NÍVEL DE ERLNMEYER (SOLOS EM SUSPENSÃO)	62
3.3.1	REATIVAÇÃO E CULTURA DOS MICROORGANISMOS	63
3.3.2	BIOENSAIOS DE SOLOS	63
3.3.3	ACOMPANHAMENTO DA ATIVIDADE BACTERIANA DURANTE A MICCP EM SOLOS	64
3.3.4	CARACTERIZAÇÃO MINERALÓGICA DO PRECIPITADO NOS CONTROLES POSITIVOS	65
3.3.5	CARACTERIZAÇÃO MINERALÓGICA DOS SOLOS APÓS TRATAMENTO	66
3.3.6	QUANTIFICAÇÃO DOS CARBONATOS BIOPRECIPITADOS	67
3.4	BIOCIMENTAÇÃO DE SOLOS- NÍVEL DE COLUNAS CILÍNDRICAS DE SOLOS	67
3.4.1	SOLOS E MICROORGANISMOS UTILIZADOS	67
3.4.2	MONTAGEM NOS MOLDES CILÍNDRICOS DE ACRÍLICO	69

3.4.3	BIOTRATAMENTO PARA A MICCP EM COLUNAS DE SOLO	70
3.4.4	CARACTERIZAÇÃO DO MEIO LÍQUIDO DRENADO AO FINAL DE CADA TRATAMENTO	71
3.4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS SOLOS DEPOIS DO TRATAMENTO MICROBIOLÓGICO	73
3.4.5.1	Resistência à compressão simples	73
3.4.5.2	Susceptibilidade à erosão	73
3.4.6	ENSAIO DE RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO TRIAXIAL	75
4.	APRESENTAÇÃO E ANÁLISES DOS RESULTADOS	78
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS SOLOS	78
4.1.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA	78
4.1.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	80
4.1.3	CARACTERIZAÇÃO MINERALÓGICA	82
4.2	BIOENSAIOS PRELIMINARES DE TRIAGEM	84
4.2.1	BIOENSAIOS EM MEIO LÍQUIDO SEM SUBSTRATO MINERAL	84
4.2.1.1	Comportamento do pH	84
4.2.1.2	Conteúdo de carbonato de cálcio precipitado no meio líquido	86
4.2.1.3	Mineralogia do precipitado - análises por FTIR	89
4.2.2	BIOENSAIOS EM MEIO LÍQUIDO COM SUBSTRATO MINERAL	92
4.2.2.1	Características macroscópicas do processo	93
4.2.2.2	Comportamento do pH	96
4.2.2.3	Mineralogia da areia biotratada - análises por FTIR	98
4.2.3	ANÁLISES DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS PRELIMINARES DE <i>TRIAGEM</i>	100
4.2.3.1	Bioensaios em meio líquido sem substrato mineral	100
4.2.3.2	Bioensaios em meio líquido com areia de quartzo como substrato mineral	108
4.2.4	SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS PARA A CONTINUIDADE DOS ESTUDOS	110
4.3	BIOENSAIOS DE SOLOS- NÍVEL DE ERLNMEYER (SOLOS EM SUSPENSÃO)	111
4.3.1	CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DAS AMOSTRAS DEPOIS DO PROCESSO	112
4.3.2	COMPORTAMENTO DO pH DO MEIO LÍQUIDO	114
4.3.3	COMPORTAMENTO DO CÁLCIO EM SOLUÇÃO.	118
4.3.4	COMPORTAMENTO DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO NO MEIO LÍQUIDO.	121
4.3.5	ANÁLISE COMPORTAMENTO DO pH, CÁLCIO EM SOLUÇÃO E OXIGÊNIO DISSOLVIDO	123
4.3.6	CARACTERIZAÇÃO MINERALÓGICA DO PRECIPITADO NOS CONTROLES POSITIVOS	125
4.3.6.1	Análises por FTIR	125

4.3.6.2	Análises MEV/EDX	127
4.3.7	SOLOS BIOTRATADOS POR MICCP	128
4.3.7.1	Análises por FTIR	128
4.3.7.2	Análises por Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	134
4.3.8	QUANTIFICAÇÃO DA MASSA DE CARBONATO DE CÁLCIO BIOPRECIPITADO	146
4.4	BIO CIMENTAÇÃO DE SOLOS- NÍVEL DE COLUNAS DE SOLOS	148
4.4.1	ESTÁGIO 1	148
4.4.1.1	Estágio 1: caracterização do meio líquido drenado ao final de cada tratamento	148
4.4.1.2	Estágio 1: verificação da cimentação dos corpos de prova	166
4.4.1.3	Estágio 1: caracterização mineralógica dos solos depois do tratamento microbiológico.	173
4.4.1.4	Estágio 1: caracterização física, química e mecânica dos solos depois do tratamento microbiológico.	180
4.4.2	ESTÁGIO 2	189
4.4.2.1	Estágio 2: caracterização do meio líquido drenado ao final de cada tratamento	191
4.4.2.2	Estágio 2: verificação da cimentação dos corpos de prova	199
4.4.2.3	Estágio 2: caracterização mineralógica dos solos depois do tratamento microbiológico	202
4.4.2.4	Estágio 2: caracterização física, química e mecânica dos solos depois do tratamento microbiológico	209
4.4.3	RESISTÊNCIA AO CISALHAMENTO.	214
5.	CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS	219
5.1	CONCLUSÕES	219
5.2	SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS	227
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	230
	APENDICE A.	239
	APENDICE B.	244
	APENDICE C.	246

LISTA DE TABELAS

Tabela 2-1. Características físicas dos polimorfos do carbonato de cálcio. (Modificado - Karatas, 2008)	14
Tabela 2-2. Tipos de solos e microrganismos utilizados nas pesquisas sobre aplicações da MICCP em geotecnia.	33
Tabela 3-1. Bactérias com capacidade de calcificação utilizadas na pesquisa.	54
Tabela 3-2. Composição química dos meios usados para as cepas uréase positiva nos bioensaios de triagem	59
Tabela 3-3. Composição química dos meios usados para as cepas uréase negativa nos bioensaios de triagem.	60
Tabela 3-4. Condições gerais dos bioensaios de triagem em meio líquido com e sem mineral.....	60
Tabela 3-5. Solos utilizados no primeiro e segundo estágio dos ensaios de biocimentação de colunas de solos.....	69
Tabela 3-6. Condições gerais ensaios de biocimentação de solos em colunas cilíndricas. .	71
Tabela 4-1. Propriedades físicas dos solos selecionados para a pesquisa.....	78
Tabela 4-2. Valores dos pH obtidos na areia, caulim e bentonita; classificação do pH em KCl segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (2017).....	80
Tabela 4-3. Teor dos cátions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} e K^{+} ; e teor dos cátions trocáveis (removíveis) dos solos, em meq/100g de solo.	81
Tabela 4-4. Solos e microrganismos no primeiro estágio dos ensaios de biocimentação em colunas.....	148
Tabela 4-5 (%) de partículas passante pela peneira #200 (0,075 mm)	181
Tabela 4-6. Bases trocáveis e capacidade de troca catiônica (CTC) das amostras de areia de quartzo.	181
Tabela 4-7. Bases trocáveis e capacidade de troca catiônica (CTC) das misturas areia de quartzo- caulim, dosagem 90%-10% (Q-C10%).....	182
Tabela 4-8. Bases trocáveis e capacidade de troca catiônica (CTC) das misturas areia de quartzo- caulim, dosagem 90%-10% (Q-B10%).....	182
Tabela 4-9. Parâmetros físicos e mecânicos das amostras biocimentadas.....	186
Tabela 4-10. Solos e microrganismos no segundo estágio dos ensaios de biocimentação em colunas.....	189
Tabela 4-11. Bases trocáveis e capacidade de troca catiônica (CTC) das amostras do estágio 2.....	210
Tabela 4-12. Parâmetros físicos e mecânicos das amostras biocimentadas nos estágios 1 e 2.....	212
Tabela 4-13. Resumo dos parâmetros de resistência ao cisalhamento não drenados, amostra <i>Sp-Q</i>	218

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1. Técnicas de melhoria de solos.	7
Figura 2-2. Representação esquemática dos processos de Biocimentação e <i>Bioclogging</i> ...	17
Figura 2-3. Reações químicas durante a hidrólise da ureia e a precipitação de carbonato de cálcio induzida microbiologicamente (Van Paassen, 2009).....	20
Figura 2-4. Representação simplificada da MICCP. (Modificado de De Muynck <i>et al.</i> , 2010).....	21
Figura 2-5. Processo de formação de carbonato de cálcio.(Sondi e Matijevic, 2001).....	22
Figura 2-6. Variabilidade enzimática no comportamento atividade uréase Vs concentração de biomassa, para diferentes culturas de <i>S. pasteurii</i> . (Modificado de Whiffin, 2004).....	26
Figura 2-7. Comparação de tamanhos típicos de partículas e bactérias do solo, limitações geométricas e limites aproximados de vários métodos de tratamento.	27
Figura 2-8. Imagens no MEV de amostras de areia sílica biocimentadas utilizando MICCP. (Cheng <i>et al.</i> , 2013).	29
Figura 2-9. MICCP usando hidrólise da ureia (DeJong <i>et al.</i> , 2010).....	30
Figura 2-10. Precipitação de CaCO ₃ , ligando as partículas do solo na forma da ponte. (Mujah <i>et al.</i> , 2017).....	31
Figura 2-11. Distribuição do carbonato de cálcio precipitado dentro dos espaços vazios do solo (Modificado -DeJong <i>et al.</i> , 2010).	32
Figura 2-12. Imagens no MEV de um solo tropical sem e com a aplicação de um nutriente para induzir a precipitação de carbonato de cálcio.	36
Figura 2-13. MICCP em coluna de areia de 5 m de comprimento (Modificado -Whiffin <i>et al.</i> , 2007).	39
Figura 2-14. Comparação esquemática dos métodos de injeção da MICCP (Cheng and Cord-Ruwisch, 2012).	40
Figura 2-15. Tratamento de percolação (Modificado - Cheng e Cord-Ruwisch, 2012).	41
Figura 2-16. Comportamento q/p' de amostras biocimentadas comparadas com amostras não tratadas e tratadas como gesso. (DeJong <i>et al.</i> , 2006).....	43
Figura 2-17. MICCP coluna de areia de 50 cm de comprimento. (Modificado - Martinez <i>et al.</i> , 2013).	44
Figura 2-18. Variação da σ_{usc} com o teor de carbonato de cálcio. (Cheng <i>et al.</i> 2013 e Van Paassen, 2009).....	45
Figura 2-19. Nucleação dos cristais de carbonato nas superfícies minerais depois de 1 e 4 semanas. (Modificada – Rebata-Landa, 2007).....	47
Figura 2-20. Relação entre o conteúdo de carbonato de cálcio precipitado (%) e o tamanho da partícula. (Rebata-Landa, 2007).	48
Figura 2-21. Imagens no MEV da areia de sílica.(Van Paassen, 2009).....	49
Figura 2-22. Imagens no MEV da areia calcária (Tomado de Van Paassen, 2009).	50
Figura 2-23. Avaliação da MICCP em volumes de 1 m ³ (Van Paassen <i>et al.</i> , 2009).	51
Figura 2-24. <i>Biogrout</i> a corpo de areia de 100 m ³ . (Van Paassen, 2009).	52
Figura 2-25. Primeira aplicação do <i>biogrout</i> . cimentação de cascalho para estabilidade de perfurações horizontais. (Van Paassen, 2011).	53

Figura 3-1. Solos utilizados na pesquisa: (a) areia, (b) caulim, (c) bentonita.....	55
Figura 3-2. Esquema dos bioensaios preliminares de triagem.....	61
Figura 3-3. Esquema dos bioensaios de solos.....	64
Figura 3-4. Microscópio Eletrônico de Varredura do Laboratório de Biomateriais, da UNAL.....	66
Figura 3-5. Montagem ensaios de biocimentação de solos.....	70
Figura 3-6. Grau de dispersão do solo no teste do torrão (ASTM D6572).	74
Figura 3-7. Equipamento triaxial do Laboratório de solos, PCJIC.....	75
Figura 3-8. Montagem do equipamento triaxial no estágio da saturação das amostras por contrapressão.....	76
Figura 3-9. Equipamentos utilizado no ensaio triaxial, estágio de cisalhamento.	77
Figura 4-1. Curvas granulométricas dos solos: A) areia de quartzo. B) caulim e bentonita.	79
Figura 4-2. Espectros FTIR (a) areia de quartzo, (b) mineral de cor preta presente na amostra da areia de quartzo (analisado individualmente).	83
Figura 4-3. Espectros FTIR (a) caulim, (b) bentonita.....	83
Figura 4-4. Comportamento do pH no tempo, ensaio meio líquido (sem mineral), cepas uréase positiva.....	85
Figura 4-5. Comportamento do pH no tempo, ensaio meio líquido (sem mineral), cepas uréase negativa.	86
Figura 4-6. Precipitado dos ensaios com cepas uréase positiva (triagem) em meio líquido.	87
Figura 4-7. Precipitado dos ensaios com cepas uréase negativa (triagem) em meio líquido.	88
Figura 4-8. Carbonato de cálcio precipitado (g) no meio líquido (sem mineral).....	88
Figura 4-9. FTIR <i>triagem</i> - cepas uréase positiva em meio líquido (sem mineral).	90
Figura 4-10. FTIR <i>triagem</i> - cepas uréase negativa em meio líquido (sem mineral).	91
Figura 4-11. Evidencia da biocimentação da areia com <i>S. pasteurii</i> DSM 323.....	94
Figura 4-12. Areia biotratada com cepas uréase positiva (<i>triagem</i>).	94
Figura 4-13. Areia biotratada com cepas uréase negativa (<i>triagem</i>).....	95
Figura 4-14. Comportamento do pH - tempo, 10% de mineral areia de quartzo no meio líquido, cepas uréase positiva.....	96
Figura 4-15. Comportamento do pH - tempo, 10% de mineral areia de quartzo no meio líquido, cepas uréase negativa.	97
Figura 4-16. FTIR areia de quartzo biotratada com cepas uréase positiva.....	99
Figura 4-17. FTIR areia de quartzo biotratada com cepas uréase negativa. Nota: Q: quartzo.	100
Figura 4-18. Comportamento do pH na MICPP segundo Van Paassen (2009). a (Modificado de Van Paassen, 2009).	106
Figura 4-19. Evidência visual da cimentação da areia biotratada com <i>S. pasteurii</i>	112
Figura 4-20. Evidência visual da cimentação da bentonita biotratada e comparação com o controle negativo.	113
Figura 4-21. Secagem das amostras de bentonita depois de 5 dias.....	113
Figura 4-22. Comparação amostras de caulim depois do tratamento.	114

Figura 4-23. Comportamento do pH no tempo, dos bioensaios de solos em suspensão....	115
Figura 4-24. Comportamento do pH – tempo nos controles positivos usando <i>S. pasteurii</i> , <i>B. cohnii</i> e <i>C. ammoniagenes</i>	118
Figura 4-25. Cálcio em solução nos bioensaios de solos em suspensão.....	119
Figura 4-26. Comportamento do OD, oxigênio dissolvido nos bioensaios de solos em suspensão.....	122
Figura 4-27. Comparação comportamento pH e Ca^{2+} disponível no meio.	124
Figura 4-28. FTIR controles positivos (sem mineral).	126
Figura 4-29. Imagens no MEV do CC bioprecipitado nos bioensaios com <i>S. pasteurii</i> e <i>B. cohnii</i> (imagem SE, em 200X).	127
Figura 4-30. Imagens no MEV do CC bioprecipitado nos bioensaios com <i>C. ammoniagenes</i>	128
Figura 4-31. FTIR da areia de quartzo biotratada usando MICCP.	129
Figura 4-32. FTIR do precipitado de grão fino nas amostras de areia.	130
Figura 4-33. FTIR do caulim bio-tratado usando MICCP.	131
Figura 4-34. FTIR da bentonita biotratada usando MICCP.	132
Figura 4-35. Mapa composicional obtido no MEV da amostra de areia de quartzo biotratada com <i>S. pasteurii</i>	134
Figura 4-36. Imagem no MEV modo BSE da amostra de areia de quartzo biotratada com <i>C. ammoniagenes</i>	135
Figura 4-37. Mapa composicional obtido do MEV da amostra de areia de quartzo biotratada com <i>C. ammoniagenes</i>	135
Figura 4-38. Imagem no MEV em modo SE das amostras de areia de quartzo biotratada com <i>C. ammoniagenes</i>	136
Figura 4-39. Imagem no MEV em modo SE das amostras de caulim biotratada com <i>C. ammoniagenes</i> . Imagem em 200 X, 400 X e 750 X.	137
Figura 4-40. Análise EDX do caulim tratado com <i>C. ammoniagenes</i>	138
Figura 4-41. Mapa de composição química da amostra de caulim biotratado com <i>C. ammoniagenes</i>	139
Figura 4-42. Imagem no MEV de amostras de caulim biotratada com <i>S. pasteurii</i>	140
Figura 4-43. Mapa composicional obtido do MEV da amostra do caulim biotratada com <i>S. Pasteurii</i> , da imagem com 750 X.	140
Figura 4-44. Mapa de composição química da amostra de caulim biotratado com <i>S. pasteurii</i>	141
Figura 4-45. Amostra de bentonita biotratada com <i>B. cohnii</i>	142
Figura 4-46. Mapa de composição química da amostra de bentonita biotratada com <i>B. cohnii</i>	142
Figura 4-47. Imagem no MEV, em 2000 X, modo BSE, da amostra de bentonita biotratada com <i>B. cohnii</i>	143
Figura 4-48. Mapa de composição química da amostra de bentonita biotratada com <i>B. cohnii</i>	144
Figura 4-49. Imagem no MEV, em 2000 X, modo BSE, da amostra de bentonita biotratada com <i>B. cohnii</i> , zona do carbonato de cálcio precipitado na figura 4.45 (a). ...	144

Figura 4-50. Mapa de composição química da amostra de bentonita biotratada com <i>B. cohnii</i> , da Figura 4.49.....	145
Figura 4-51. Imagem no MEV, em 5000 X (modo BSE), da Figura 4.49, amostra de bentonita biotratada com <i>B. cohnii</i> , zona do carbonato de cálcio.....	145
Figura 4-52. Carbonato de cálcio precipitado nas amostras de areia, caulim e bentonita, em gramas de CC precipitado por 1 grama de solo (g/g).....	146
Figura 4-53. pH ao final de cada tratamento, amostras de Q, dosagem Q-C 10%, Q-B 10% biotratadas com (A) <i>S.pasteurii</i> . (B) <i>B.cohnii</i> . (C) <i>C. ammoniagenes</i>	149
Figura 4-54. pH ao final de cada tratamento, amostras controles de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10%, (sem microrganismo)	151
Figura 4-55. Oxigênio dissolvido (OD) ao final de cada tratamento, nas amostras de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10% biotratadas com (A) amostras com <i>S.pasteurii</i> . (B) <i>B.cohnii</i> . (C) <i>C. ammoniagenes</i>	152
Figura 4-56. Oxigênio dissolvido (OD) ao final de cada tratamento, nas amostras controles (sem microrganismos) de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10%. (A) amostras com <i>S.pasteurii</i> . (B) <i>B.cohnii</i> . (C) <i>C. ammoniagenes</i> . (D) amostras controles.	153
Figura 4-57. Cálcio em solução (mg/l) ao final de cada tratamento, nas amostras de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10% biotratadas com A) <i>S. pasteurii</i> . B) <i>B. cohnii</i> . C) <i>C. ammoniagenes</i>	154
Figura 4-58. Carbonato de cálcio precipitado (g), ao final de cada tratamento nas amostras de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10% biotratadas com A) <i>S. pasteurii</i> . B) <i>B. cohnii</i> . C) <i>C. ammoniagenes</i>	157
Figura 4-59. Eficiência do processo em cada tratamento (cálcio precipitado como percentagem do cálcio fornecido) nas amostras de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10% biotratadas com A) <i>S. pasteurii</i> . B) <i>B. cohnii</i> . C) <i>C. ammoniagenes</i>	158
Figura 4-60. Percentagem de cálcio precipitado nas amostras controles, ao final de cada tratamento.....	160
Figura 4-61. Relação cálcio em solução (Ca^{2+}) e o oxigênio dissolvido (OD), em cada tratamento das amostras de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10% biotratadas com A) <i>S. pasteurii</i> , B) <i>B. cohnii</i> , C) <i>C. ammoniagenes</i>	163
Figura 4-62. O amônio (NH_4) ao final de cada tratamento, amostras de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10% biotratadas com (A) <i>S.pasteurii</i> . (B) <i>B.cohnii</i> . (C) <i>C. ammoniagenes</i>	164
Figura 4-63. Relação amônio gerado (NH_4) e o cálcio precipitado, em cada tratamento com A) <i>S. pasteurii</i> , B) <i>B. cohnii</i> , C) <i>C. ammoniagenes</i>	166
Figura 4-64. Amostra de areia de quartzo-bentonita (Q-B10%).	167
Figura 4-65. Imagens das amostras de Q e mistura Q-C10% ao final do tratamento de biocimentação.....	168
Figura 4-66. Imagens da mistura Q-B10% ao final do ensaio de biocimentação.....	169
Figura 4-67. Amostras biotratadas com <i>B. cohnii</i> , com biocimentação parcial do volume total das amostras. A-B) areia de quartzo (Q). C) mistura Q-C 10%. D) mistura Q-B 10%	170

Figura 4-68. Amostras biotratadas com <i>C. ammoniagenes</i> , com biocimentação parcial do volume total das amostras. A) areia de quartzo (Q). B) mistura Q-C 10%. C-D) mistura Q-B 10%.....	171
Figura 4-69. FTIR das amostras de solos (Q, Q-C10% e Q-B10%) biotratadas usando <i>S. pasteurii</i>	173
Figura 4-70. FTIR das amostras de solos (Q, Q-C10% e Q-B10%) biotratadas usando <i>B. cohnii</i>	174
Figura 4-71. FTIR das amostras de solos (Q, Q-C10% e Q-B10%) biotratadas usando <i>C. ammoniagenes</i>	175
Figura 4-72. Montagem no MEV dos torrões das amostras biocimentadas de Q e Q-C10% com <i>S. pasteurii</i>	177
Figura 4-73. Imagem no MEV da amostra de areia de quartzo biotratada com <i>S. pasteurii</i> . imagem em 50 X.	177
Figura 4-74 Mapa de composição de elementos da amostra <i>Sp-Q</i>	178
Figura 4-75. Imagem no MEV da amostra de areia de quartzo biotratada com <i>S. pasteurii</i>	178
Figura 4-76. Imagens de MEV da amostra de Q-C10% biotratada com a <i>S. pasteurii</i>	179
Figura 4-77 Mapa de composição de elementos da amostra <i>Sp-Q-C10%</i>	180
Figura 4-78. Ensaio de resistência à compressão simples, amostra <i>Sp-Q</i>	184
Figura 4-79. Ensaio de resistência à compressão simples, amostra <i>Sp-Q</i> (ensaio 2).....	185
Figura 4-80. Ensaio de resistência à compressão simples, amostra <i>Sp-Q-C10%</i>	186
Figura 4-81. Imagens no estereoscópio, em 3 aumentos.	187
Figura 4-82. Teste de <i>Crumb</i> em amostras de solos biocimentadas com MICCP, usando a <i>S. pasteurii</i>	188
Figura 4-83. Curva granulométrica da areia de grão médio (Q) e da areia de grão fino (Q_{fino}).	190
Figura 4-84. Análises FTIR da areia de Yarumal de grão médio (Q) e da mesma areia depois do processo de fratura mecânica (Q_{fino}).	190
Figura 4-85. Comportamento do pH no efluente. Amostras biotratadas com <i>S. pasteurii</i> , comparação estágios 1 e 2. A) diferentes dosagens Q-C e Q-B. B) diferentes tamanhos da areia de quartzo.	191
Figura 4-86. Comportamento do OD no efluente. Amostras biotratadas com <i>S. pasteurii</i> , comparação estágios 1 e 2. A) diferentes dosagens Q-C e Q-B. B) diferentes tamanhos da areia de quartzo.	193
Figura 4-87. Cálcio em solução das amostras biotratadas com <i>S. pasteurii</i> , comparação estágios 1 e 2. A) misturas Q-C dosagem 98%-2% e 90%-10%. B) misturas Q-B dosagem 98%-2% e 90%-10%.	194
Figura 4-88. Cálcio precipitado (g) no processo de MICCP, nas amostras biotratadas com <i>S. pasteurii</i> , comparação estágios 1 e 2. A-) misturas Q-C2% e QC10%. B) misturas Q-B2% e Q-B10%.	195
Figura 4-89. Eficiência do processo da MICCP, nas amostras biotratadas com <i>S. pasteurii</i> , comparação estágios 1 e 2. A) misturas Q-C2% e Q-C10%. B) misturas Q-B2% e Q-B10%.....	196

Figura 4-90. Eficiência do processo de MICCP nas amostras de areias de grão médio (Q) e grão fino, (Q _{fino}), biotratadas com <i>S. pasteurii</i>	198
Figura 4-91. Imagens das amostras ao final do ensaio de biocimentação..	200
Figura 4-92. Imagens da amostra Q _{fino} ao final do ensaio de biocimentação.	201
Figura 4-93. Comparação da biocimentação por MICCP em solos de diferente tamanho de partícula e mineralogia semelhante. A) areia grão meio, Q. B) areia grão fino, Q _{fino}	201
Figura 4-94. FTIR da amostra de areia de quartzo peneirada Q _{fino} , biotratada com <i>S. pasteurii</i> , e comparação com a amostra <i>Sp-Q</i> do estágio 1, e a amostra sem tratamento e amostra controle.	203
Figura 4-95. FTIR das misturas Q-C2% e Q-B2% biotratadas com <i>S. pasteurii</i> e comparação com as misturas Q-C10% e Q-B10%, do estágio 1.	204
Figura 4-96. Imagens oriundas do MEV, modo SE, mistura quartzo-caulim 98%-2%.....	205
Figura 4-97. Análise EDX da amostra <i>Sp-Q-C2%</i>	206
Figura 4-98. Mapa de composição de elementos da amostra <i>Sp-Q-C2%</i>	206
Figura 4-99. Imagens no MEV, modo SE, quartzo-bentonita 98%-25%.....	207
Figura 4-100 Análise EDX da amostra <i>Sp-Q-B2%</i>	208
Figura 4-101. Mapa de composição de elementos da amostra <i>Sp-Q-B2%</i>	208
Figura 4-102. Análise granulométrica das amostras biotratadas com <i>S. pasteurii</i> e controles.	209
Figura 4-103. Análise granulométrica amostras de areia de quartzo: Q e Q _{fino} , biotratadas com <i>S. pasteurii</i> e comparação com amostras sem tratamento.	210
Figura 4-104. Curva tensão – deformação, do ensaio de resistência à compressão simples, amostra <i>Sp-Q-C2%</i>	211
Figura 4-105. Curva tensão – deformação, do ensaio de resistência à compressão simples, amostra <i>Sp-Q-B2%</i>	212
Figura 4-106. Teste de <i>Crumb</i> em amostras de solos biocimentadas com MICCP, usando a <i>S. pasteurii</i>	214
Figura 4-107. Montagem da amostra de areia de quartzo para ensaio triaxial.	214
Figura 4-108. Resistência ao cisalhamento não drenada da amostra de areia de quartzo biocimentada por MICCP com <i>S. pasteurii</i> . Corpo de prova # 1.....	215
Figura 4-109. Resistência ao cisalhamento não drenada da amostra de areia de quartzo biocimentada por MICCP com <i>S. pasteurii</i> . Corpo de prova # 2.....	215
Figura 4-110. Modo de falha do corpo de prova # 2.....	216
Figura 4-111 Resistência ao cisalhamento não drenada da amostra de areia de quartzo biocimentada por MICCP com <i>S. pasteurii</i> . Corpo de prova # 3.....	217
Figura 4-112. Círculos de Mohr e envoltórias de ruptura do solo (Q), em tensões totais e tensões efetivas.....	218

LISTA DE SÍMBOLOS, NOMENCLATURA E ABREVIACÕES

AA	Espectroscopia por Absorção Atômica
ACC	Carbonato de cálcio amorfo
Al	Alumínio
Ag/AgCl	Prata/cloreto de prata
ASE	Área superficial específica
ATP	Trifosfato de adenosina
<i>B</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Bc</i>	<i>Bacillus cohnii</i>
BSE	Análises em modo de elétrons retroespalhados no MEV
B4	Meio nutriente B4 composto por acetato de cálcio, extrato de levedura, glicose
c	Coesão
c'	Coesão efetiva
C	Caulim, Carbono
<i>C</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Ca</i>	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>
Ca	Cálcio
Ca ²⁺	Cátions de cálcio
cal	Calcita
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CC	Carbonato de cálcio cristalino
CH	Argila de alta compressibilidade
CL	Argila de baixa compressibilidade
CO ₂	Dióxido de carbono
CO ₃ ²⁻	Carbonato
CO(NH ₂) ₂	Ureia
CTC	Capacidade de troca catiônica
CID	Carbono inorgânico dissolvido
d _n	Diâmetro das partículas do n% da amostra
D _R	Densidade relativa dos sólidos

DRX	Difração de raios X
DSMZ	Coleção Alemã de Microrganismos e Cultura de Células
e	Índice de vazios
EDX	Analisador de energia dispersiva de raios-X
EDTA	<i>Ethylenedinitrilo - tetraacetic acid disodium salt</i>
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
E ₅₀	Módulo secante a 50% da tensão máxima na falha
Fe (II)	óxido ferroso
Fe (III)	óxido férrico
FeS	Sulfeto de ferro
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
fd	Feldspatos
Hd	Hidroargilita
HCO ₃ ⁻¹	Bicarbonato
H ₂ O	Água
IAP	Produto da atividade iônica
ICP- MS	Espectroscopia por Absorção Atômica acoplado ao plasma induzido
Ip	Índice de plasticidade
K	Caulinita, condutividade, potássio (K ⁺)
KBr	Brometo de Potássio
KCl	Cloreto de potássio
K _{ps}	Produto de solubilidade termodinâmico
K _{so}	Constante de solubilidade
LB	Meio nutriente Luria Bertani, composto de: cloreto de sódio, de extrato de levedura e peptona de caseína
LBB	Laboratório de Biomineralogia e Biohidrometalurgia
Mg	Magnésio
mM	Mil molares
M	Molar, Montmorilonita
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
MICCP	Precipitação da carbonato de cálcio induzida microbiologicamente
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
N ₂	Nitrogênio

NaOH	Hidróxido de sódio
NBR	Normas Brasileiras
NH ₃	Amoníaco
NH ₃ -N/L	Nitrogênio amoniacal
NH ₄	Amônio
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
O, O ₂	Oxigênio
OD	Oxigênio dissolvido
OH	Grupamento hidroxila
PCZ	Ponto de carga zero
pH	Potencial hidrogeniônico
pH _{H2O}	pH medido numa suspensão de solo: água
pH _{KCl p}	H medido numa suspensão de solo: KCl 1M
Q	Quartzo
Q-C2%	Dosagem quartzo 98%-caulim 2%
Q-B2%	Dosagem quartzo 98%-bentonita 2%
Q-C10%	Dosagem quartzo 90%-caulim 10%
Q-B10%	Dosagem quartzo 90%-bentonita 10%
<i>S</i>	<i>Sporosarcina</i>
<i>Sp</i>	<i>Sporosarcina pasteurii</i>
SE	Análises em modo de elétrons secundários no MEV
Si	Sílicio
Sr	Grau de saturação
T	Tratamento microbiológico
UFC	Unidades formadoras de colônia
UV	Espectrofotômetro de raios Ultravioleta
Vp	Meio nutriente utilizado pelo Van Paasen (2008), composto por cloreto de amônio, extrato de levedura e cloreto de níquel.
v	Vaterita
w	Teor de umidade
wL	Limite de liquidez
wP	Limite de plasticidade
X	Aumentos
ΔpH	Delta de potencial hidrogeniônico

γ	Peso específico
γ_d	Peso específico seco
ϵ_a	Deformação axial
ϕ	Ângulo de atrito
ϕ'	Ângulo de atrito efetivo
σ_c	Tensão confinante
σ_{ucs}	Resistência à compressão
E_{50}	Modulo secante na metade da falha
τ_f	Resistência ao cisalhamento pico
τ_R	Resistência ao cisalhamento residual
Ω	Estado de saturação do sistema
μl	Micro litros
μM	Micro molares
μm	Micro metros
ν_1	Modo de vibração ν_1 , estiramento simétrico
ν_2	Modo de vibração ν_2 , flexão fora do plano
ν_3	Modo de vibração ν_3 , estiramento assimétrico
ν_4	Modo de vibração ν_4 , flexão no plano

1. INTRODUÇÃO

As propriedades de engenharia dos solos definem o seu comportamento como material estrutural, se este é usado como suporte para a infraestrutura física, como material de construção ou como parte essencial de uma estrutura natural como taludes e encostas (Márquez, 1982). Sendo um material natural, suas características são o resultado do processo de formação e, para abordar possíveis deficiências na sua resistência, rigidez, deformabilidade ou permeabilidade, entre outros aspectos, é necessária a aplicação de técnicas para modificar ou melhorar suas propriedades.

As técnicas geralmente utilizadas para melhorar as propriedades do solo vão, desde a substituição de solos, estabilização com mistura de outros solos ou adição de cal, cimento ou outros aditivos químicos e adensamento ou compactação (Ivanov e Chu, 2008), as quais, no geral são soluções com grande impacto ambiental (Ozdogan, 2010) e/ou custo econômico elevado (Ivanov e Chu, 2008).

Nas últimas décadas, tem adquirido importância a aplicação de processos geoquímicos mediados por organismos e microrganismos (processos bio-mediados), na solução de problemas em diferentes campos, como na medicina (Trushina *et al.*, 2014), processos industriais (Hammes *et al.*, 2003), arquitetura (Tiano *et al.*, 1999), construção (Ramachandran *et al.*, 2001; Jonkers, 2007) e mitigação de processos erosivos (Valencia, 2009), entre outros.

Especificamente na geotecnia, emerge a biogeotecnologia como uma sub-área, que lida com a aplicação de processos biológicos para resolver problemas da engenharia geotécnica (Ivanov e Chu, 2008). Inicialmente as técnicas biológicas versavam na aplicação de plantas para a prevenção e mitigação da erosão e para a estabilidade de encostas (Ivanov e Chu, 2008). Mais recentemente, os estudos focaram-se na utilização de microrganismos (bactérias e fungos), que, a partir da sua atividade metabólica e como consequência desta, podem modificar as propriedades de engenharia dos solos (Valencia, 2009; Gómez, 2013).

Dentro destes processos, a precipitação de carbonato de cálcio induzida microbiologicamente ou - "*Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation*"- tem um grande potencial na geotecnia, oferecendo por uma parte, soluções sustentáveis para uma grande variedade de aplicações: estabilidade de encostas, controle de erosão,

aumento da capacidade de carga, facilidade de escavação no solo sem coesão, redução do potencial de liquefação de areias, etc (Ivanov e Chu, 2008), e por outra parte, para a melhora das propriedades de materiais utilizados na construção em geral, aterros e na infraestrutura rodoviária (Gómez, 2013).

As pesquisas pioneiras na MICCP aplicada na geotecnia, foram desenvolvidas principalmente a partir do ano 2004, na Austrália, na *Murdoch University*, e centraram-se na melhoria da resistência dos solos por biocimentação (Whiffin, 2004); posteriormente, outros trabalhos foram desenvolvidos nos Estados Unidos, pela *University of California* (DeJong *et al.*, 2006) e pelo *Georgia Institute of Technology* (Rebata-Landa, 2007), e na Holanda (Van Paassen, 2009) na *Delft University of Technology*. No Brasil, alguns estudos sobre o uso dos processos biológicos para melhorar as propriedades de engenharia dos solos, têm sido desenvolvidos no Programa de Pós-graduação em Geotecnia da Universidade de Brasília (Valencia, 2009; Gómez, 2013; Valencia *et al.*, 2014) e na Universidade de São Paulo (Shirakawa *et al.*, 2011).

As discussões interdisciplinares e a priorização de temas de pesquisa neste campo emergente, ocorreram em congressos e workshops internacionais, por exemplo *The first international workshop on biogeotechnical engineering* (2007), *The bio-geo-civil engineering* (2008, 2019), *The second international workshop on Bio-soils engineering and interactions* (2011), entre outros. O interesse nesta área contínua e o próximo maio de 2019, terá lugar *The 1st international workshop on Bio-inspired geotechnics* (University of California, Davis).

A aplicação da MICCP nos solos, a fim de melhorar suas propriedades físico-mecânicas, exige estudos mais profundos e abrangentes, que ajudem a entender o processo microbiológico, as reações geoquímicas e a relação causa e efeito no solo, tendo em vista a geração de conhecimento que seja transferível a processos tecnológicos eficientes, seguros e dentro de uma escala de tempo de interesse para a engenharia.

1.1 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

A potencialidade oferecida pelo uso de processos geoquímicos bio-mediados para a melhoria das propriedades de engenharia dos solos, já foi comprovada por diversos estudos internacionais. As diversas pesquisas têm demonstrado que a aplicação da MICCP em engenharia geotécnica, pode ser uma alternativa eficaz, relativamente de

baixo custo, sustentável e aplicável em um curto período de tempo (Whiffin, 2004; Ivanov e Chu, 2008).

Além disso, a MICCP imita processos naturais de bio-precipitação, mas, a uma taxa muito mais rápida (Fujita *et al.*, 2004). Na natureza, o processo de precipitação de carbonatos leva centenas de anos, enquanto que, a precipitação de carbonatos bio-mediada pode ser concluída em poucos dias (Dhami *et al.*, 2013).

Em particular, a MICCP via hidrólise da ureia, tem sido mostrada como muito eficiente para a biocimentação de areias de grãos médios a finos, compostas principalmente por quartzo, como mineral predominante (Whiffin, 2004; Whiffin *et al.*, 2007; Harkes *et al.*, 2010). Poucas pesquisas têm sido desenvolvidas em solos com outra composição mineralógica (Rebata-Landa, 2007; Van Paassen, 2009; Mortensen *et al.*, 2011).

Van Paassen (2009), mostrou que a mineralogia do solo tem influência na aderência das bactérias às partículas e na taxa de hidrólise, que por sua vez afeta, por exemplo, o tipo do cristal gerado. Considerando que muitas das regiões da Colômbia e Brasil, onde estes processos bio-mediados podem ser aplicados, estão constituídas por solos tropicais produto do intemperismo, compostos por uma grande variedade de minerais, é possível que o processo de bioprecipitação (MICCP), até agora estudado e otimizado ao nível de coluna 1D, fluxo 2D e 3D, seja influenciado pela composição mineralógica dos solos.

Neste sentido, com o intuito de avançar no conhecimento do processo de precipitação bio-mediada de carbonatos em solos e sua aplicação na engenharia geotécnica, é necessário conduzir estudos em nível de laboratório em solos com diversas composições mineralógicas, focados numa variável que não tem sido completamente avaliada como é a mineralogia do solo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Analisar a influência da mineralogia do solo na precipitação de carbonato de cálcio induzida microbiologicamente, como técnica de melhoria de solos, para aplicações em engenharia geotécnica, através da aplicação de microrganismos calcificantes.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Definir o(s) melhor(es) microrganismo(s) com capacidade de precipitar carbonato de cálcio nos solos selecionados.
- b) Avaliar a produção de carbonato de cálcio das diversas bactérias em substratos minerais diferentes: quartzo, caulinita e montmorilonita.
- c) Analisar a influência da mineralogia do substrato na bioprecipitação de carbonatos de cálcio em relação à quantidade e ao tipo de polimorfo precipitado.
- d) Estudar o efeito da MICCP em propriedades físico-mecânicas dos solos com diferentes composições mineralógicas.

1.3 ABRANGÊNCIA DA PESQUISA

O escopo desta pesquisa consiste no estudo da influência da mineralogia do solo na MICCP, como uma contribuição para a compreensão de um processo complexo que envolve aspectos microbiológicos (microrganismos, meio de cultura, condições de crescimento), condições do solo (física, mineralógica e hidráulica) e o acoplamento entre eles.

O estudo não tem a intenção de aperfeiçoar o processo ou implementar a MICCP como técnica de melhoria de solos, uma vez que a implementação real de sistemas biológicos requer abordagem e estudos muito específicos a fim de garantir o desempenho e a durabilidade do tratamento.

Nesta pesquisa a quantidade de substratos será limitada a três: areia de quartzo, caulim e bentonita. A limitação está fundamentada na possibilidade de controlar completamente a qualidade destes substratos no ambiente de laboratório e na sua disponibilidade comercial. Da mesma forma, a quantidade de microrganismos será limitada a três cepas bacterianas com capacidade de bioprecipitação de carbonatos de cálcio, selecionadas de uma triagem preliminar de treze cepas comerciais da Coleção Alemã de Microrganismos e Cultura de Células (DSMZ).

1.4 ESTRUTURA DO TRABALHO

A presente tese encontra-se dividida nos seguintes capítulos:

Capítulo 1 – Introdução

Na introdução, é apresentado o problema de pesquisa e sua justificativa. Além de descrever o objetivo geral e os objetivos específicos do estudo. Finalmente ele delimita a abrangência da pesquisa.

Capítulo 2 – Revisão da literatura

Neste capítulo é apresentada a revisão bibliográfica, começando por uma breve apresentação das técnicas de melhoria dos solos e continuando com a definição de biogeotecnologia e descrição do processo de precipitação de carbonato de cálcio e finalmente foca-se, na precipitação de carbonato de cálcio induzida microbiologicamente (MICCP), no processo, nas variáveis, em suas aplicações, especificamente na geotecnia e seu efeito nas propriedades do solo.

Capítulo 3 – Materiais e métodos

Neste capítulo é apresentada a seleção e descrição dos materiais usados na execução da pesquisa. Apresenta os procedimentos e metodologias que foram utilizados na execução dos ensaios compreendidos em cada um dos estágios da pesquisa.

Capítulo 4 – Apresentação e análise de resultados

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos durante o estágio experimental no laboratório. São realizadas as discussões relativas ao comportamento dos diferentes solos durante o tratamento para induzir a precipitação de carbonato de cálcio, nos diferentes estágios da pesquisa.

Capítulo 5 – Conclusões e sugestões para pesquisas futuras

São apresentadas as principais conclusões obtidas a partir dos dados e discussões feitas no capítulo 4 e finalmente apresenta-se sugestões para pesquisas futuras.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

A revisão da literatura se desenvolverá em dois temas importantes para o entendimento desta pesquisa: primeiro uma abordagem geral das técnicas de melhora dos solos e segundo concentram-se em a biogeotecnologia, focado no processo de precipitação de carbonato de cálcio, avanços e aplicações.

2.1 TÉCNICAS DE MELHORIA DE SOLOS

O solo é um material natural e no mundo há uma necessidade de melhorar suas propriedades para adaptá-lo às necessidades do homem, para fins da engenharia civil e da geotecnia. Em diversas regiões existem os solos problemáticos: solos expansivos, colapsáveis, solos moles, que devido a sua capacidade de mudança de volume (expansão, contração, diminuição súbita de volume, grandes recalques), geram problemas nas estruturas construídas sobre eles. Existem depósitos de areias fofas e saturadas, susceptíveis à laqueação sob carregamentos cíclicos e não drenados, como no caso dos terremotos. Em outras regiões do mundo, são desenvolvidos processos erosivos que geram instabilidades dos terrenos, pela presença (entre outros fatores) de solos erodáveis, devido a suas propriedades químicas, mineralógicas e biológicas, que influem no estado de agregação das partículas. O termo erodibilidade é referido à falta de capacidade do solo em resistir aos processos erosivos (Camapum de Carvalho *et al.*, 2006).

Por um lado, a existência de solos com propriedades mecânicas inadequadas que podem gerar problemas e instabilidades, e por outro lado, a necessidade de expandir a infraestrutura civil e a limitada disponibilidade de solos competentes, tornou-se uma prioridade no âmbito da engenharia civil e engenharia geotécnica, desenvolver técnicas e tecnologias para melhora do solo, de forma sustentável (DeJong *et al.*; 2010) e assim conseguir aperfeiçoar o recurso "solo".

Segundo Palmeira (2014), as técnicas de melhora de solos, podem ser classificadas em duas grandes categorias: de reforço de solos e de estabilização de solos. O reforço de solos é a inclusão de materiais diferentes na massa de solo para melhorar as suas propriedades mecânicas: geossintéticos, fibras, barras, etc. Estabilizar o solo consiste em melhorar as condições de resistência e de compressibilidade, incluindo a redução da permeabilidade. As técnicas de estabilização geralmente procuram aumentar a

resistência ao cisalhamento do solo para evitar uma falha catastrófica (escorregamentos e movimentos de massas) e uma redução na compressibilidade do solo para evitar movimentos excessivos (recalques).

Modificar o solo, implica uma pequena mudança nas propriedades do solo, porém, estabilizar o solo implica qualquer alteração que converta os solos num material competente, nas suas propriedades de resistência ou permeabilidade, ou ambas (Karol, 2003).

A estabilização de solos pode ser alcançada de diversas maneiras: através do aumento da densidade (compactação, explosivos), aumento de tensões efetivas e/ou redução de poro pressões (drenagem), compensação ou alívio de esforços (alívio de carregamentos, bermas de equilíbrio), processos elétricos e térmicos, pela mistura de materiais no solo (mistura de solo com cal/cimento) e a adição de substâncias como as injeções de argamassa ou *grouting* (Palmeira, 2014).

As técnicas de mistura de solos e adição de substâncias como o *grouting*, são técnicas de cimentação do solo; a primeira é utilizada na construção de estradas, ferrovias e aeroportos para o aumento da capacidade de suporte do subleito no solos fofos (Bergado *et al.* em 1996, citado por Ozdogan, 2010) e a segunda (*grouting*), é uma cimentação *in situ*, onde agentes de cimentação são injetados nos vazios do solo, ligando às partículas, aumentando sua resistência e reduzindo sua permeabilidade. A Figura 2-1 mostra um resumo das técnicas de melhoria de solos classificadas por Palmeira (2014).

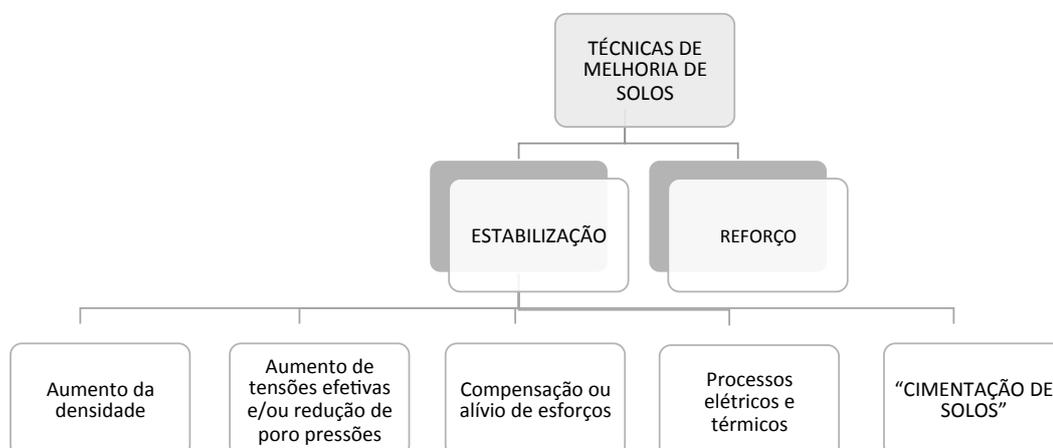


Figura 2-1. Técnicas de melhoria de solos. (Modificado de Palmeira, 2014).

O *grouting* é uma das técnicas de construção comuns, com aplicações na engenharia geotécnica e tradicionalmente o *grouting* químico ou o *grouting* de cimento são amplamente utilizados na indústria da construção. Os agentes de cimentação utilizados são materiais sintéticos fabricados pelo homem, como o cimento *micro-fine*, epóxi, fenoplastos, acrilamidas, silicatos e poliuretano (Ivanov e Chu, 2008). Todos os *grouting* químicos, exceto o silicato de sódio, são tóxicas e/ou perigosas (Karol, 2003), outros aditivos utilizados como cal e asfalto, alteram o pH e podem contaminar o solo. Esses métodos de estabilização afetam gravemente o fluxo de água subterrânea e liberam dióxido de carbono poluindo tanto no ar quanto na água (Sukumaran e Poulouse, 2018).

A maioria das técnicas de melhoria do solo, utilizam energia mecânica e/ou materiais feitos pelo homem, os quais requerem energia substancial para sua produção e/ou instalação (DeJong *et al.*, 2010), são técnicas caras e exigem máquinas pesadas que alteram a infraestrutura urbana. As anteriores limitações e por outro lado, a toxicidade associada e o potencial risco ambiental dos muitos dos agentes de cimentação, estimulam o desenvolvimento de métodos alternativos de melhoria do solo que sejam mais ecológicos e mais sustentáveis (Ozdogan, 2010), e capaz de atender às crescentes demandas de melhoria do solo, especialmente para empreendimentos de infraestrutura de engenharia civil.

A fim de abordar as desvantagens das técnicas atuais de melhoria do solo, pode-se considerar alternativas naturais. Por exemplo, a litificação natural de sedimentos (diagênese), ocorre como resultado de processos físicos, químicos e biológicos. Após a deposição, os sedimentos são compactados à medida que são enterrados sob camadas sucessivas de sedimentos e cimentados por minerais que precipitam das águas subterrâneas. Em geral, essas transições naturais do solo para a rocha são processos lentos, porém, os processos biológicos podem acelerar ainda mais a cimentação, pois ativamente induzem conversões bioquímicas no subsolo, alterando a química da água dos poros, o que poderia resultar na precipitação (ou dissolução) de minerais inorgânicos e agir como agentes de cimentação naturais (Van Paassen, 2009).

Assim, novas oportunidades para a utilização de processos biológicos tem sido recentemente propostas, o que tem sido possível através de pesquisa interdisciplinar na confluência de microbiologia, geoquímica e engenharia geotécnica.

2.2 BIOGEOTECNOLOGIA

A biogeotecnologia é um ramo da engenharia geotécnica que lida com a aplicação de processos biológicos para resolver problemas da engenharia geotécnica (Ivanov e Chu, 2008). Atualmente, a biogeotecnologia está relacionada principalmente, à aplicação de plantas e coberturas vegetais para o controle da erosão e proteção de encostas, prevenção de deslizamentos pouco profundos e diminuição da infiltração de água em encostas. Outros termos utilizados são: bioengenharia de solos, bio-estabilização, engenharia ecológica, construção verde.

Nos últimos anos, a aplicação de processos microbiológicos ou processos geoquímicos mediados por microrganismos, promete ser a próxima prática transformadora em engenharia geotécnica, devido à grande evidência de que processos biológicos ocorrendo em nível microscópico podem influenciar propriedades geotécnicas em nível macroscópico, a fim de melhorar as propriedades do solo para fins de engenharia, embora, ainda permanece amplamente inexplorada. Das primeiras discussões explícitas sobre a aplicação de processos biológicos em engenharia geotécnica foi apresentada por Mitchell e Santamarina (2005) e paralelamente, foi identificada como um importante tema de pesquisa do século 21, pelo Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos (NRC, 2006). O primeiro *workshop* internacional sobre biogeotecnologia em 2007, facilitou discussões interdisciplinares e priorização de tópicos de pesquisa neste campo emergente (DeJong *et al.*, 2013) e continuaram em outros *workshop* como *The bio-geo-civil engineering* (2008, 2019) e *The second international workshop on Bio-soils engineering and interactions* (2011).

A questão agora a resolver são: ¿Quais são esses processos biomediados, além do uso das plantas e coberturas vegetais, potencialmente aplicáveis na geotecnia? ¿Quais são os mecanismos que fazem com que os microrganismos modifiquem as propriedades dos solos para obter a melhoria desejada?

2.2.1 Processos biogeoquímicos potencialmente aplicáveis para melhoria do solo

Os processos geoquímicos mediados pelos microrganismos podem ser explicados pela geomicrobiologia, que estuda o papel dos microrganismos nos processos geológicos e as interações entre minerais e microrganismos (DeJong *et al.*, 2013).

Os processos biogeoquímicos podem influenciar a mudança na microestrutura do solo, por exemplo, a disposição dos grãos de areia e os espaços vazios ou a agregação das argilas, e esta mudança pode modificar diversas propriedades do solo: propriedades físicas (mudanças na densidade, porosidade, distribuição granulométrica), propriedades de condutividade (hidráulica, elétrica, térmica), propriedades mecânicas (rigidez, compressibilidade, expansão/contração, coesão, cimentação, ângulo de atrito, erodibilidade e curva de retenção solo-água) e composição química (reatividade, capacidade de troca catiônica), (DeJong *et al.*, 2013).

Os microrganismos participam de reações de redução-oxidação (redox), ganham energia reduzindo ou oxidando produtos químicos e usam essa energia para crescimento, manutenção, mobilidade e outras atividades. Através destas reações, os microrganismos podem diretamente precipitar / dissolver / transformar minerais ou indiretamente afetar sua formação, alterando a geoquímica do meio ambiente e produzindo substâncias poliméricas extracelulares (DeJong *et al.*, 2013).

Segundo Karatas (2008), os processos biogeoquímicos potencialmente aplicáveis para a melhoria do solo, podem ser divididos em três categorias: precipitação de minerais (Biomineralização), transformação de minerais e no ultimo os biopolímeros e geração de biofilmes. Outro processo adicional é a geração de biogás, descrito por DeJong *et al.* (2013).

2.2.1.1 Biomineralização

Na natureza a biomineralização é um processo comum e consiste na precipitação de um mineral proveniente da atividade celular de um ser vivo (Gómez, 2013). A biomineralização ocorre por reações químicas entre íons específicos ou compostos, como resultado das atividades metabólicas de um organismo em certas condições ambientais (Lee, 2003).

Os precipitados da biomineralização, são sólidos inorgânicos, que podem ser cristalinos ou amorfos e foram chamados “biomineral”. Porém, segundo Weiner e Dove (2003), o termo biomineral é referido, não só à produção de minerais pelo organismo, também ao fato de que esses precipitados são compostos de componentes orgânicos e minerais.

No processo de biomineralização como técnica de melhoria do solo, os sólidos inorgânicos precipitados tem um efeito mecânico no solo: redução do espaço poroso, cimentação frágil do contato entre partículas, aumento das partículas finas no espaço poroso e aumento da rigidez dos solos. Segundo DeJong *et al.* (2014), estes efeitos, podem resultar em: diminuição de condutividade hidráulica, aumento da rigidez a pequenas deformações, aumento da resistência a grandes deformações.

Mais de 60 tipos de minerais (por exemplo, carbonatos, silicatos, óxidos, sulfetos) tem sido expostos na literatura, como gerados direta ou indiretamente por organismos sob uma ampla variedade de condições (Lowenstam e Weiner, 1989). O controle exercido por muitos organismos sobre a formação de minerais é diferente do processo abiótico de mineralização, portanto, desde 1924, este processo tem sido discutido e até hoje, a biomineralização é de muito interesse para a comunidade científica (Weiner e Dove, 2003).

A biomineralização foi dividida em dois grupos, de acordo com o grau de controle biológico durante o processo: biomineralização controlada e biomineralização induzida (Lowenstam e Weiner, 1989).

- **Biomineralização controlada:** a principal característica da biomineralização controlada é que os organismos utilizam seu metabolismo celular para controlar o processo de nucleação e crescimento mineral, sintetizando o mineral em uma forma que é única para aquela espécie, independentemente das condições ambientais (De Muynck *et al.*; 2010). Neste caso, os minerais são sintetizados diretamente em um lugar específico dentro da célula (intracelular) ou na célula (extracelular). Na maioria dos casos, a biomineralização controlada ocorre intracelularmente, onde lipídios, proteínas, polissacarídeos, formam uma matriz estável para os cátions e para os minerais crescerem em um espaço limitado (Weiner e Dove, 2003).

- **Biomineralização induzida:** na biomineralização induzida, um organismo cria um microambiente local, com condições que permitem a ótima precipitação química extracelular de fases minerais (Hamilton, 2003).

Os minerais que são formados por biomineralização induzida, geralmente são nucleados e crescem extracelularmente como resultado da atividade metabólica do organismo e as reações químicas subsequentes, que envolvem derivados metabólicos.

Neste processo, superfícies bacterianas tais como as paredes celulares ou materiais poliméricos exsudados pelas bactérias (lodos ou *slimes*, biofilme, esporos inativos) podem agir como sítios importantes para a adsorção de íons e a nucleação e o crescimento dos minerais (Weiner e Dove, 2003).

O sistema biológico tem pouco controle sobre o tipo e o hábito do mineral depositado, embora, segundo Weiner e Dove (2003), o processo metabólico utilizado pelo organismo é particular e controlado pelo pH e a composição dos produtos secretados, favorecendo indiretamente a formação de certos tipos de minerais, no entanto, a característica principal do processo, é a heterogeneidade dos minerais precipitados, com diversas formas, composição, estrutura e tamanho.

O processo de biomineralização mais amplamente estudado é a precipitação de carbonatos, chamado de “carbonatogênese” (Lee, 2003). Além dos carbonatos, os microrganismos podem induzir a precipitação de outros minerais que podem cimentar as partículas do solo. Por exemplo, a precipitação de sulfeto de ferro (FeS), como resultado da redução microbiana de sulfato para sulfeto, foi relatado em laboratório e no campo. Também foi relatado, que as bactérias redutoras de sulfato estão envolvidas na precipitação de silicatos, e a precipitação de sílica foi atribuída à modificação do pH como resultado da atividade metabólica de sulfato-redutores (Karatas, 2008).

2.2.1.2 Transformação de minerais

Alguns processos dos microrganismos podem promover a transformação de minerais. Kim *et al.* (2004) relataram a transformação da esmectita em ilita através da redução do Fe (III) estrutural, para Fe (II), que leva à captação de potássio (K^+) nas inter-camadas. Esmectita refere-se a uma família de argilominerais compostos principalmente de silicato hidratado de sódio-cálcio-alumínio. Minerais da esmectita são a causa predominante do potencial excessivo de expansão (expansão) nos solos. Ilita refere-se a minerais das argilas ricos em potássio (K^+), com menor potencial de expansão o que esmectita, sem afetar o solo desde o ponto de vista da engenharia (Karatas, 2008). Kim *et al.* (2004) relatam que a transformação microbiana da esmectita em ilita ocorreu sob condições ambientais em 14 dias, em experimentos de laboratório, nos quais a esmectita rica em Fe (III) foi incubada com *Shewanella oneidensis*. Esta transformação requer tipicamente de 4 a 5 meses, a uma temperatura de 300°C a 350°C e uma pressão de 100

MPa na ausência de atividade microbiana (Kim *et al.*, 2004). Estes resultados sugerem que os processos microbianos podem ser usados para mitigar o potencial de expansão em alguns solos expansivos (Karatas, 2008).

2.2.1.3 Geração de biofilmes e biopolímeros

A formação de biofilme e a geração de outras substâncias poliméricas extracelulares (EPS), são processos biogeoquímicos que podem impactar o comportamento do solo.

O biofilme é formado quando os microrganismos se aderem a uma superfície e excretam o EPS como parte de seu metabolismo. Estes EPS aumenta a adesão de mais microrganismos e outras partículas, formando um biofilme que pode afetar as propriedades físicas dos solos (DeJong *et al.*, 2013).

Estes processos geram sólidos orgânicos que podem ocupar parte dos espaços vazios do solo, entupindo-os com material mole, dúctil, semelhante ao elastômero, que diminuem o tamanho dos poros e aumentando a ductilidade do solo (DeJong *et al.*, 2013), e por isso, sua aplicação a fim de diminuir a permeabilidade do solo, é chamada de *bioclogging* (Ivanov e Chu, 2008). Além da redução significativa na permeabilidade, pode modificar a resistência ao cisalhamento não drenada, resistência ao cisalhamento drenada e o módulo de cisalhamento (Karatas, 2008). Este mecanismo é potencialmente utilizado para diminuir o potencial de liquefação do solos induzida por terremotos.

Além de alterar as propriedades do material através de sua presença física, os microrganismos presentes no biofilme podem induzir a precipitação e/ou transformação dos minerais (Karatas, 2008).

Porém, uma preocupação com as mudanças no solos devidas à presença de biofilme e EPS, é que elas podem não ser permanentes, isto é, que as mudanças na propriedade do solo podem ser reversíveis. No entanto, existem muitas situações em que a melhoria "temporária" dos solos é suficiente, por exemplo, a estabilização e controle das águas subterrâneas para escavações e escavações subterrâneas (Karatas, 2008).

2.2.1.4 Geração de biogás

A atividade biológica abaixo da superfície é frequentemente acompanhada pelo desenvolvimento de bolhas de gás discretas em ambientes saturados. Uma variedade de

gases pode ser produzida por processos microbianos (por exemplo, dióxido de carbono, hidrogênio, metano e nitrogênio). A geração de gás a partir de processos biogeoquímicos pode permitir a redução a longo prazo do grau de saturação de um solo. A redução no grau de saturação aumenta a compressibilidade do espaço poroso e pode reduzir o excesso de poro pressão durante o carregamento cíclico, mitigando o potencial de liquefação induzido por terremotos em alguns solos (DeJong *et al.*, 2013).

2.2.2 Precipitação de Carbonato de cálcio

O carbonato de cálcio é um mineral comumente encontrado na natureza, constituído por íons cálcio e carbonato (CaCO_3). Existem três polimorfos na forma anidra de carbonato de cálcio: calcita, aragonita e vaterita, duas fases cristalinas hidratadas: monohidrocalcita ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e ikaita ($\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), e também é possível encontrar fases amorfas do carbonato de cálcio (ACC) (Weiner e Dove, 2003).

A calcita é a forma mais comum de carbonato de cálcio, é encontrada como parte de rochas sedimentares, corais e conchas. No solo, a calcita é normalmente encontrada em áreas onde existem raízes e/ou as concentrações de dióxido de carbono (CO_2) são elevadas ou herdadas de material de origem calcária (Ozdogan, 2010). Segundo Karatas (2008), a calcita é termodinamicamente o polimorfo mais estável e a transformação para calcita a partir de formas menos estáveis de carbonato de cálcio, por exemplo, aragonita e vaterita, ocorre através de dissolução e re-precipitação. A vaterita pode ser encontrada, especialmente em cálculos biliares e em sedimentos precipitados por alguns microrganismos (Karatas, 2008). A Tabela 2-1 mostra algumas características físicas e mineralógicas dos polimorfos do carbonato de cálcio.

Tabela 2-1. Características físicas dos polimorfos do carbonato de cálcio. (Modificado - Karatas, 2008)

CaCO_3	Densidade (g/cm^3)	Produto de solubilidade termodinâmico a 25°C – log K _{sp}	Dureza (escala de Mohs)	Sistema cristalino
Calcita	2,71	8,33 – 8,58	3	Trigonal, rômbo
Aragonita	2,93	8,18 – 8,42	3,5 - 4	Ortorrômbo
Vaterita	2,54	7,78	3	Hexagonal, ortorrômbo

Lowenstam e Weiner (1989) indicam que num processo de precipitação sequencial, uma fase precursora do mineral precipitado, que é termodinamicamente menos estável

se forma primeiro, que a forma madura do mineral. Assim, espera-se que a formação de calcita ocorra em um estágio posterior no desenvolvimento do carbonato de cálcio do que a aragonita e a vaterita, e a abundância relativa desses polimorfos depende da temperatura e da presença de inibidores.

A precipitação de carbonato de cálcio é um fenômeno que pode ocorrer naturalmente no solo, na água do mar e água doce (Castanier *et al.*, 1999). Segundo Hammes e Vestraete (2002), a precipitação do carbonato de cálcio é um processo químico simples, governado principalmente por quatro fatores:

- i) Concentração de cálcio (Ca^{2+})
- ii) Concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID)
- iii) pH (ambiente com pH alcalino é necessário para dissolver e dissociar o carbono inorgânico)
- iv) Disponibilidade de sítios de nucleação

É um processo químico que ocorre quando uma solução contendo íons de cálcio (Ca^{2+}) e carbonatos (CO_3^{2-}) é supersaturada, promovendo a formação de carbonato de cálcio (CaCO_3) (Lee, 2003). A precipitação de carbonato de cálcio precisa de suficiente íons cálcio e carbonato de modo que o produto da atividade iônica (IAP) exceda a constante de solubilidade (K_{so}). O estado de saturação do sistema (Ω), pode ser definido comparando o IAP com o K_{so} (Equação 2-1).

$$\Omega = \frac{\text{IAP}}{K_{so}} = \frac{\{\text{Ca}^{2+}\}\{\text{CO}_3^{2-}\}}{K_{so}} \quad \text{Equação 2-1}$$

$\{\text{Ca}^{2+}\}$ e $\{\text{CO}_3^{2-}\}$ representam a atividade dos íons Ca^{2+} e CO_3^{2-} e K_{so} da calcita a 25°C
 $= 4,8 \times 10^{-9}$

Sim $\Omega > 1$, o sistema é supersaturado em relação ao CaCO_3 e a precipitação de CaCO_3 é favorecida termodinamicamente (Equação 2-2) (Phillips *et al.*, 2013; De Muynck *et al.*, 2010):



Segundo Castanier *et al.* (1999), a precipitação de carbonatos pode ocorrer através de vários processos: i) precipitação química abiótica de uma solução saturada por evaporação, aumento da temperatura e/ou diminuição da pressão, ii) produção de esqueleto externo ou interno por eucariotas, iii) redução da pressão de CO_2 sob efeito de

processos autotróficos (fotossíntese, metanogênese), iv) mediação de fungos e v) mediação de bactérias heterotróficas.

Sob condições naturais, a precipitação de carbonatos ocorre muito lentamente, em tempo geológico, por isso, a fim de produzir grandes quantidades de carbonatos em pouco tempo, é necessário procurar outros mecanismos, como alguns microrganismos com capacidade de criar condições para a precipitação de carbonatos em tempos mais curtos (Dhami *et al.*, 2013).

2.3 PRECIPITAÇÃO DE CARBONATOS DE CÁLCIO INDUZIDA MICROBIOLOGICAMENTE- MICCP

Diferentes espécies bacterianas precipitam carbonatos em ambientes alcalinos, ricos em íons Ca^{2+} . Os microrganismos podem promover a precipitação do carbonato de cálcio, alterando qualquer um dos fatores mencionados (Ca^{2+} , CID, ou pH), tornando-se um processo de biomineralização e como qualquer processo de biomineralização pode ser biologicamente controlado ou biologicamente induzido (Rivadeneira *et al.*, 1994).

Alguns autores acreditam que o mecanismo que os microrganismos usam para precipitar carbonatos, não é geneticamente regulado e não cumpre uma função biológica específica, argumentando que a função do microrganismo no processo é criar um microambiente local com condições que permitam uma ótima precipitação química extracelular de fases minerais (Hamilton, 2003), por conseguinte, é um processo de biomineralização induzida: precipitação de carbonato de cálcio induzida microbiologicamente, MICCP -*Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation*- ou precipitação de calcita induzida microbiologicamente (MICP).

Segundo Van Paassen (2009), o papel dos microrganismos na MICCP é atribuído a:

- i) Produção de carbonato (por exemplo, por hidrólise, respiração, etc.).
- ii) Produzir alcalinidade (aumentando o pH localmente, o que causa a dissolução do carbono inorgânico que está presente principalmente como bicarbonato para dissociar causando um aumento na concentração de carbonato).
- iii) Atuando como sítio de nucleação em uma solução supersaturada.

Como a precipitação de carbonato de cálcio é um processo de biomineralização induzido, o principal papel das bactérias tem sido atribuído à sua capacidade de criar um ambiente alcalino através de diversos processos metabólicos (Hammes e Verstraete, 2002).

O carbonato de cálcio precipitado no solo, atua como agente de cimentação entre os grãos, aumentando a resistência ao cisalhamento do solo e/ou preenchendo os poros no solo para reduzir a condutividade da água. Então, a MICCP torna-se um processo biogeoquímico potencialmente aplicáveis para a melhoria do solo. Os dois processos, para aumentar a resistência ao cisalhamento e reduzir a permeabilidade do solo, foram chamados de biocimentação e *bioclogging*, respectivamente (Ivanov e Chu, 2008), como é ilustrado esquematicamente na Figura 2-2.

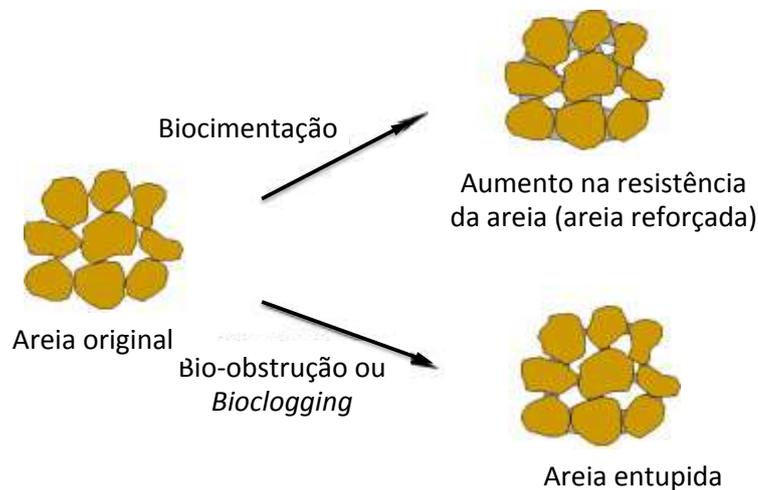


Figura 2-2. Representação esquemática dos processos de Biocimentação e *Bioclogging*. (Modificado de Chu *et al.*, 2015).

2.3.1 Processos metabólicos utilizados na MICCP

Principalmente quatro grupos de microrganismos estão envolvidos no processo de precipitação de carbonatos: organismos fotossintéticos (como cianobactérias e algas), bactérias redutoras de sulfatos (responsáveis da redução dos sulfatos), organismos que utilizam ácidos orgânicos e organismos envolvidos no ciclo do nitrogênio: amonificação de aminoácidos / redução de nitratos / hidrólise de ureia (Stocks-Fischer *et al.*, 1999; Hammes e Verstraete, 2002).

Castanier *et al.*, (1999) explicam a bioprecipitação do carbonato de cálcio (MICCP), a través da utilização de duas vias metabólicas: via autotrófica e heterotrófica.

Na via autotrófica, os microrganismos utilizam o dióxido de carbono (CO_2) como fonte de carbono para produzir matéria orgânica. Assim, eles induzem a depleção do CO_2 do meio ou do ambiente imediato da bactéria. Quando os íons de cálcio estão presentes no meio das bactérias, a depleção de CO_2 favorece a precipitação de carbonato de cálcio (Castanier *et al.*, 1999).

Na via heterotrófica, dois processos podem acontecer: precipitação passiva e precipitação ativa do carbonato de cálcio. Na precipitação passiva ou carbonatogênese passiva, são produzidos íons carbonato e bicarbonato e são induzidas modificações químicas no meio que levam à precipitação do carbonato de cálcio. Para isto, as bactérias podem utilizar dois ciclos metabólicos: o ciclo do nitrogênio e o ciclo do enxofre (Castanier *et al.*, 1999).

Os caminhos metabólicos do ciclo do nitrogênio são: i) a amonificação de aminoácidos em aerobiose, em presença de matéria orgânica e o cálcio, ii) a redução de nitrato, em anaerobiose, na presença de matéria orgânica, cálcio e nitrato, iii) a degradação da ureia ou do ácido úrico, em aerobiose, na presença de matéria orgânica, cálcio e ureia ou ácido úrico. Estas três vias do ciclo do nitrogênio induzem a produção de íons carbonato e bicarbonato e, como produto metabólico final, o amônio (NH_4^+), que induz o aumento do pH. Quando a concentração de íons hidrogênio (H^+) diminui, o equilíbrio de carbonato-bicarbonato muda para a produção de mais íons carbonatos (CO_3^{2-}) e se os íons de cálcio (Ca^{2+}) estão presentes, ocorre a precipitação de carbonato de cálcio (Castanier *et al.*, 1999).

No ciclo do enxofre, as bactérias usam uma única via metabólica: a redução do sulfato, em ambiente sem oxigênio e rico em matéria orgânica, cálcio e sulfato. Usando esta via, as bactérias produzem carbonato, íons de bicarbonato e sulfeto de hidrogênio. Se o cálcio estiver presente, a precipitação dos carbonatos de cálcio depende do comportamento do sulfeto de hidrogênio (Castanier *et al.*, 1999).

Por outra parte, na precipitação ativa ou a carbonatogênese ativa, as partículas de carbonato são produzidas por trocas iônicas através da membrana celular, por ativação de bombas ou canais iônicos de cálcio e/ou magnésio, provavelmente acoplados à produção de íons carbonato. Numerosos grupos bacterianos são capazes de operar tais processos (Castanier *et al.*, 1999).

Castanier *et al.*, (1999) resumem o processo de MICCP pela via heterotrófica, como a resposta da comunidade de bactérias heterótrofas ao enriquecimento do meio em matéria orgânica e a precipitação de carbonato ocorre durante a fase de crescimento exponencial e termina depois do início da fase estacionária. A acumulação de produtos finais do metabolismo durante a fase exponencial, induz à acumulação de íons de carbonato e bicarbonato e de diversas maneiras induz o acréscimo do pH no meio, o que favorece a precipitação de carbonato de cálcio.

Das anteriores vias metabólicas descritas, a MICCP através da hidrólise da ureia é o método mais simples e mais amplamente utilizado para a precipitação de carbonatos com várias aplicações técnicas (Dhami *et al.*, 2013).

2.3.2 MICCP por hidrólise da ureia

Segundo Dhami *et al.* (2013), a MICCP utilizando o caminho metabólico da hidrólise da ureia é o método de precipitação de CaCO_3 mais desejado pelos pesquisadores, devido a que o processo é direto e fácil de controlar e segundo Al-Thawadi (2011), pode gerar até 90% de eficiência de conversão química em a quantidade de CaCO_3 precipitado, em um curto período de tempo (menos de 24 h).

De acordo como Mobley e Hausinger (1989), o microrganismo utiliza a ureia como fonte de nitrogênio e energia para a geração de trifosfato de adenosina (ATP) necessária para seus processos fisiológicos, porém, neste processo, a enzima uréase secretada pelo microrganismo, catalisa a hidrólise da ureia e adicionalmente é produzido amônio e carbonato.

Van Paassen (2009) divide o mecanismo de precipitação do CaCO_3 pela hidrólise da ureia em três etapas: (1) hidrólise da ureia, (2) equilíbrio ácido-base e (3) precipitação de CaCO_3 . A Figura 2-3 apresenta as reações químicas durante as três etapas da MICCP.

As reações químicas durante a MICCP, são descritas por De Muynck *et al.*, (2010), da seguinte forma:

A enzima uréase catalisa a hidrólise da ureia e um mol de ureia é hidrolisada intracelularmente para formar um mol de amoníaco e um mol de ácido carbâmico, que

espontaneamente se hidrolisa a outro mol de amoníaco e ácido carbônico (Equação 2-3 e 2-4).

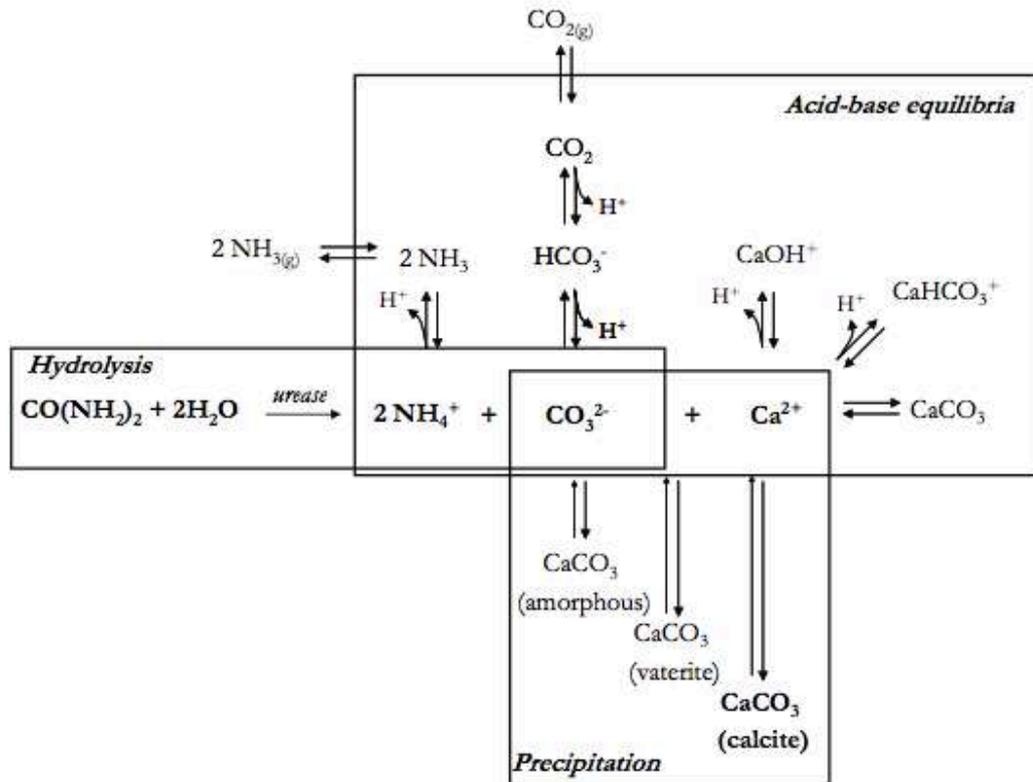
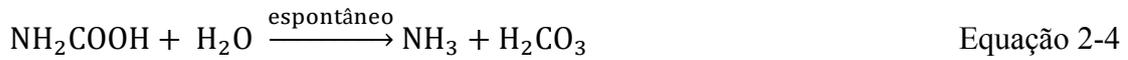


Figura 2-3. Reações químicas durante a hidrólise da ureia e a precipitação de carbonato de cálcio induzida microbiologicamente (Van Paassen, 2009).

Estes produtos subsequentemente, são equilibrados em meio aquoso para formar bicarbonato (Equação 2-5) e dois mols de amônio (NH_4^+) e dois mols de íons hidróxido (Equação 2.6).



A produção do amônio (NH_4^+) resulta num aumento líquido do pH, causado pelo aumento dos íons hidróxido (OH^-). Este aumento do pH do meio, altera o equilíbrio do bicarbonato com a subsequente formação de íons carbonato (Equação 2-7) e essa mudança precipita íons metálicos.



A reação global pode ser escrita, como na Equação 2-8:



Na presença de suficiente atividade do íon cálcio, a condição de saturação é favorável para a precipitação de carbonato de cálcio (Equação 2-9)



Como a superfície da bactéria tem carga elétrica negativa, facilita a adesão do cátion cálcio (Ca^{2+}), e pode resultar na formação de cristais na célula bacteriana, (De Muynck *et al.* 2010). Uma visão geral esquemática da precipitação de carbonato na parede celular microbiana é dada na Figura 2-4.

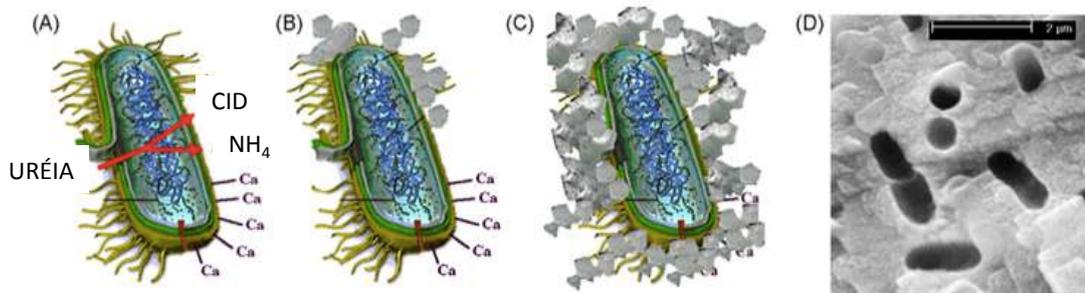


Figura 2-4. Representação simplificada da MICCP. (A) Íons cálcio na solução são atraídos para a parede celular bacteriana devido à carga negativa da célula. Após a adição de ureia às bactérias, o carbono inorgânico dissolvido (CID) e o amônio (NH_4) são liberados no microambiente da bactéria. (B) Na presença de íons cálcio, pode resultar em uma supersaturação local e, portanto, uma precipitação heterogênea do carbonato de cálcio na parede da célula bacteriana. (C) Depois de um tempo, a célula inteira fica encapsulada, limitando a transferência de nutrientes, resultando em morte celular. A imagem (D) mostra as impressões de células bacterianas envolvidas na precipitação de carbonato. (Modificado de De Muynck *et al.*, 2010).

Quando a precipitação é gerada, inicialmente são formados precipitados amorfos, que posteriormente se cristalizam (Sondi e Matijevic, 2001). A Figura 2-5 mostra o processo de formação de carbonato de cálcio desde o material amorfo até a calcita bem estruturada.

A hidrólise química da ureia, quando não é catalisada, é uma reação muito lenta, enquanto que a enzima uréase catalisa a reação 10^{14} vezes mais rápido (Van Paassen, 2009). A uréase é uma enzima comumente encontrada em muitos organismos, incluindo muitas bactérias, algumas leveduras e várias plantas superiores (Whiffin, 2004). Nesta

reação a enzima uréase é descarregada de uma bactéria ureolítica. A presença de bactérias não ureolíticas também aceleram a MICCP, devido a que eles agem como sítios de nucleação (Van Paassen, 2009).

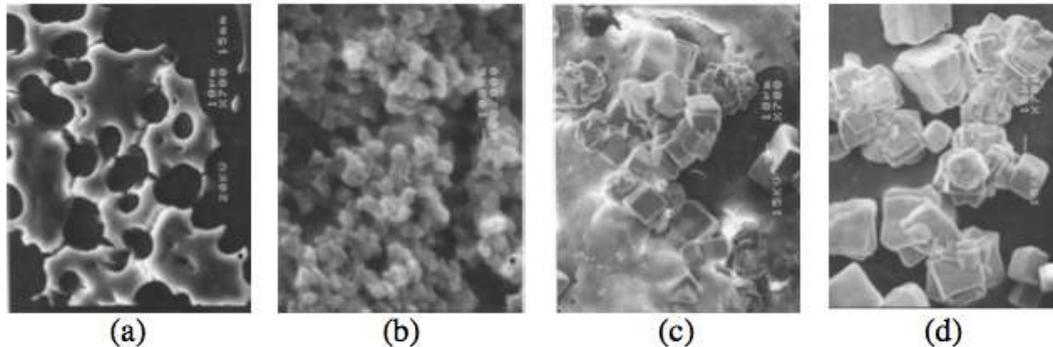


Figura 2-5. Processo de formação de carbonato de cálcio. a) etapa inicial de formação de um material amorfo. b) ampliação da figura (a) com partículas nanométricas (100 nm). c) início da formação de partículas de calcita bem formadas. d) calcita bem estruturada. (Sondi e Matijevic, 2001).

A atividade específica da uréase, que é definida como a taxa na qual a ureia em solução aquosa é hidrolisada por grama de biomassa seca, difere de espécie para espécie (Hammes *et al.*, 2003; Whiffin, 2004).

A principal fonte bacteriana de uréase é a *Sporosarcina pasteurii*. Este microrganismo, anteriormente conhecido como *Bacillus pasteurii*, também é bem conhecido por sua alta atividade ureolítica. A *Sporosarcina pasteurii* é a espécie bacteriana mais utilizada e relatada na literatura para o processo de MICCP por hidrólise da ureia, devido à sua capacidade de produzir alta quantidade de precipitados em um curto período de tempo (Bang *et al.*, 2001; Dhimi *et al.*, 2013).

Mais recentemente, tem sido pesquisado o uso da enzima uréase livre para a melhoria do solo, num processo chamado de Precipitação de Carbonato Induzida por Enzimas EICP, (Carmona *et al.*, 2016; Almajed *et al.*, 2019). Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) é a fonte mais comum de uréase comercialmente disponível (Whiffin 2004).

2.3.3 Aplicações da MICCP

A MICCP tem sido estudada por décadas para sua aplicação em vários campos como indústria, medicina, arquitetura, construção, entre outros (Hammes *et al.*, 2003; Trushina *et al.*, 2014; Tiano *et al.*, 1999; Ramachandran *et al.*, 2001). A través da

MICCP é desenvolvido um novo material de construção, o biocimento, como alternativa a utilizar em todas as aplicações onde são utilizados cimentos químicos.

O biocimento é feito utilizando microrganismos que ocorrem naturalmente à temperatura ambiente e, portanto, requer muito menos energia para produzi-lo. É sustentável porque os microrganismos são abundantes na natureza e podem ser reproduzidos facilmente a baixo custo e os microrganismos que são adequados para produzir biocimento são geralmente não-patogênicos e amigável com o meio ambiente (Chu *et al.*, 2015).

No campo da bioremediação, a MICCP tem sido estudada em aplicações para captura de CO₂ atmosférico e armazenamento em reservatórios geológicos subterrâneos muito profundos (Shaffer, 2010). Na natureza, o dióxido de carbono é sequestrado pela fixação química em carbonatos, mas a reação é muito lenta (Dhami *et al.*, 2013). Portanto, os pesquisadores estudaram o uso de processos biológicos, através da anidrase carbônica, enzima que contém zinco e que catalisa a reação reversível da hidratação do CO₂ ao bicarbonato. Este método é seguro com no ambiente e fácil de usar, mais do que os métodos convencionais de sequestro de dióxido de carbono ambiental (Chaparro *et al.* 2017).

Na remoção de metais pesados das águas subterrâneas (Fujita *et al.*, 2004), a MICCP pode ser aplicada pela incorporação dos metais pesados na estrutura cristalina do carbonato precipitado (incorporados ou retidos). Com MICCP, entre 88 e 99% de níquel, cobre, chumbo, cobalto, zinco e cádmio, foram removidos usando *S. pasteurii* após um período de incubação de 48 horas e finalmente, metais foram depositados ao redor da cobertura celular (Li *et al.*, 2013). Outros estudos com estrôncio descobriram, que a precipitação de carbonato de cálcio é possível capturando em 24 horas até o 95% do metal, em uma fase sólida (Warren *et al.*, 2001). Também tem sido utilizada a MICCP para remoção de cálcio das águas residuais (Hammes *et al.*, 2003).

Na construção civil e arquitetura, a MICCP tem sido estudada para a melhoria e recuperação de monumentos históricos (Tiano *et al.*, 1999) e no intuito de melhorar a durabilidade dos materiais de construção. Neste sentido, o biocimento é utilizado em substituição do cimento e colas químicas (De Muyneck *et al.*, 2010), ligando os materiais a través da MICCP, para selar fraturas e melhorar a dureza e durabilidade dos materiais (Dhami *et al.*, 2013; Phillips *et al.*, 2013). Além disso, é possível reduzir a absorção da

água, proporcionando um aumento na resistência ao congelamento e degelo, o que é relevante para reduzir a degradação do material (De Muynck, *et al.*, 2008). Outros desenvolvimentos foram para aumentar a resistência à compressão do concreto e a argamassa e reparação de trincas no concreto (Ramachandran *et al.*, 2001).

✓ *E na engenharia geotécnica??*

Desde finais dos anos 90's e o início do 2000, começou-se a desenvolver pesquisas da MICCP para modificar as propriedades dos solos e em diversas aplicações na engenharia geotécnica.

O carbonato de cálcio precipitado, atua como ligante entre as partículas do solo, aumentando a resistência ao cisalhamento do solo, processo que é chamado de Biocimentação de solos, ou o carbonato pode preencher os espaços vazios, diminuindo a condutividade da água, e neste caso, o processo é chamado de *Bioclogging* (Ivanov e Chu, 2008). A ligação entre as partículas para produzir a biocimentação, pode, ao mesmo tempo, reduzir a permeabilidade do solo devido à redução do espaço poroso, no entanto, de acordo com Chu *et al.* (2015), existem processos que só produzem biocimentação ou *bioclogging*, dependendo do método de aplicação do tratamento no solo e segundo Kadhim e Zheng (2016) dependendo da concentração dos reagentes utilizados (ureia-fonte de cálcio).

- **Biocimentação:** a biocimentação melhora as propriedades de resistência e de rigidez do solo e rochas através da atividade microbiana ou produtos microbianos. A cimentação microbiana ou biocimentação consiste em formar material de ligação (mineral) entre partículas do solo, após a introdução de microrganismos e aditivos específicos no solo. A biocimentação por MICCP, ocorre pela ligação das partículas com carbonatos produzidos devido à hidrólise da ureia. Porém, outros dos processos microbianos podem levar potencialmente à biocimentação: a ligação das partículas do solo com sulfetos de metais produzidos por bactérias redutoras de sulfato e ligação das partículas com sais e hidróxidos ferrosos e férricos, produzidos devido à atividade de bactérias redutoras de ferro (Ivanov e Chu, 2008).

A biocimentação é diferente da bio-ligação, que é a formação das cadeias celulares de ligação entre as partículas e não é utilizada para operações de grande escala, como

o aumento da resistência à liquefação, porque todas as ligações biológicas são instáveis e podem ser degradadas por outros microrganismos (Ivanov e Chu, 2008).

A biocimentação pode ser utilizada para reduzir o potencial de expansão de solos argilosos e mitigar ou reduzir o potencial de liquefação da areia (Ivanov e Chu, 2008; DeJong *et al.*, 2006), para melhorar a capacidade de carregamento e a estabilidade de encostas, facilitar a escavação de túneis (Whiffin *et al.*, 2007; Van Paassen, 2009), controlar a erosão em áreas costeiras ou rios (Ivanov e Chu, 2008), etc.

- **Bioclogging:** consiste em reduzir a condutividade hidráulica de solos e rochas porosas, a partir da atividade de microrganismos e seus produtos. Neste caso, Ivanov e Chu (2008), chamam de *bioclogging* estável e é devida à precipitação de uma substância inorgânica nos espaços vazios do solo, o carbonato de cálcio. Devido à reação enzimática, o pH é aumentado e são produzidos carbonatos que entope os poros e liga as partículas do solo. Esta abordagem pode ser aplicada para reduzir a porosidade e a permeabilidade de uma formação geológica subsuperficial e prevenir a erosão interna (*piping*) em barragens e diques, selagem da filtração e fluxo da água retida nas estruturas (Gómez, 2013).

2.3.4 Fatores que afetam a eficiência da MICCP

Existem vários fatores que influenciam a atividade da uréase e a quantidade de CaCO_3 precipitada: o tipo de bactéria, concentrações de células bacterianas, pH, temperatura e concentrações de cálcio e ureia (Al Qabany *et al.*, 2012; Hammes *et al.*, 2002).

- ✓ **O tipo de bactéria:** o tipo de bactéria é essencial para a produção da enzima uréase e, portanto, o tipo de bactéria mais adequadas para MICCP são bactérias capazes de catalisar a hidrólise da ureia, bactérias uréase positiva do gênero *Bacillus* e *Sporosarcina* (Kucharski *et al.*, 2012). As bactérias aeróbias são preferíveis, uma vez que liberam CO_2 da respiração celular, e a produção de CO_2 é acompanhada pelo aumento do pH devido à produção de amônio. Muitas bactérias com atividade uréase tem sido estudadas para aplicação na MICCP, por exemplo, a *Sporosarcina pasteurii* tem sido usada para remoção de metais pesados (estrôncio), remediação de concreto e melhoria do solo (Phillips *et al.*, 2013; Whiffin, 2004; Van Paassen, 2009 e Harkes *et al.*, 2010), *B. megaterium* tem sido usada para melhorar a dureza do concreto e para reduzir a compressibilidade de solos residuais (Dhami *et al.*, 2013b, Lee *et al.*, 2013), a

Sporosarcina ureae, tem sido usada em pesquisas para melhora de solos (Mavroulidou et al., 2011).

✓ **Concentração de células bacterianas:** a taxa de hidrólise da ureia é diretamente proporcional à concentração de bactérias. Uma alta concentração de bactérias produz mais uréase por unidade de volume para iniciar a hidrólise da ureia (Kadhim e Zheng, 2016). A fim de otimizar as condições de produção do carbonato de cálcio, é necessário determinar a concentração celular ótima para o processo de biocimentação, estabelecendo o tempo específico em que as bactérias estão em sua fase exponencial, onde ocorre a maior produção enzimática. Altas concentrações de células bacterianas (de 10^6 a 10^8 células) aumentam a concentração de uréase para a hidrólise da ureia (Okwadha e Li em 2010, citado por Kadhim e Zheng, 2016). Porém, Whiffin (2004) encontrou um comportamento contrario em seus experimentos com *S. pasteurii*, com uma grande variabilidade da enzima ao relacionar com a concentração de biomassa (Figura 2-6), no entanto, a atividade uréase da *S. pasteurii* foi o suficientemente alta para a MICCP.

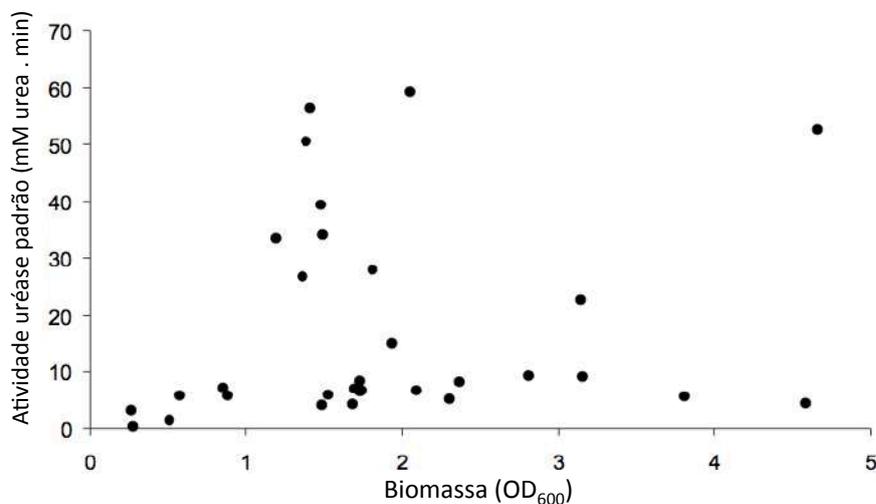


Figura 2-6. Variabilidade enzimática no comportamento atividade uréase Vs concentração de biomassa, para diferentes culturas de *S. pasteurii*. (Modificado de Whiffin, 2004)

✓ **Compatibilidade do tamanho da partícula – tamanho da bactéria:** o tamanho dos vazios do solo deve ser suficiente para permitir a mobilização das bactérias. A eficácia do MICCP, pode ser atribuída à capacidade das bactérias de se mover livremente pelo espaço dos poros e o adequado contato partícula-partícula por unidade de volume (Kadhim e Zheng, 2016).

Segundo Mitchell e Santamarina (2005) as bactérias tem comprimentos entre 0,5 e 3,0 μm e a pesquisa desenvolvida por Rebata-Landa (2007), demonstraram melhores resultado de biocimentação, nos solos como tamanho de grãos por acima de 100 μm (na faixa de 50 e 400 μm). De acordo com Holtz e Kovacs (1981), o tamanho da garganta dos poros depende da menor fração das partículas no solo, e pode ser estimada em 20% do d_{10} . (tamanho de partícula que corresponde a 10% passando em uma análise mecânico de peneira). De acordo com DeJong *et al.* (2010), o tratamento com MICCP por injeção *in situ*, tem um limite inferior que depende do tamanho da partícula relativa ao tamanho da bactéria (Figura 2-7). No entanto, a mistura *ex situ* das bactérias, nutrientes e solo, pode aumentar os tipos de solos possíveis de tratamento em argilas puras.

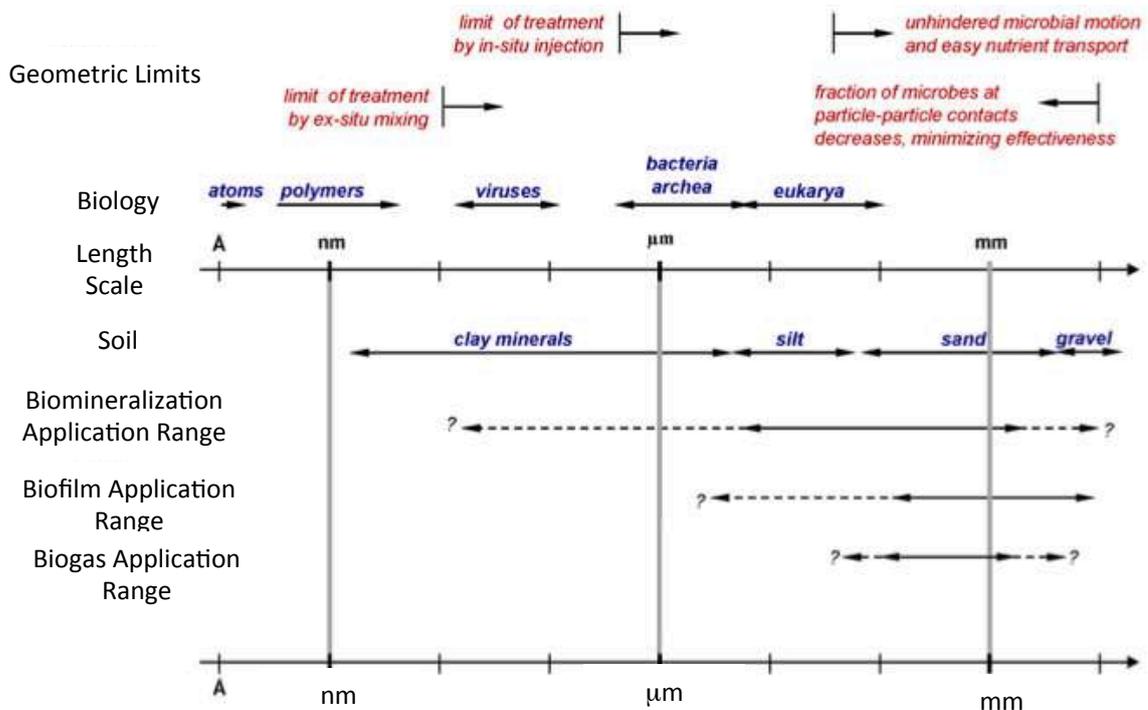


Figura 2-7. Comparação de tamanhos típicos de partículas e bactérias do solo, limitações geométricas e limites aproximados de vários métodos de tratamento. (DeJong *et al.*, 2010).

✓ **O pH:** no processo da MICCP, o aumento do pH, é devido à formação das hidroxilas (OH^-), gerados a partir da produção de íons de amônio (NH_4^+) e o ambiente alcalino favorece a geração de carbonatos. A MICCP ocorre para uma faixa de pH de 8,3 e 9,0, na qual a atividade de uréase permanece alta (Stocks-Fischer *et al.*, 1999). Diversas pesquisas com *S. pasteurii*, encontraram o pH adequado em valores de 7,5,

7,7, 8, 9, entre outros. Whiffin (2004) encontrou que o pH teve um efeito bioquímico significativo na atividade da uréase, que exibiu uma atividade ótima entre pH 7 e 8.

✓ **Temperatura:** a faixa de temperatura para a hidrólise enzimática varia muito com a espécie, mas a hidrólise enzimática da ureia depende da temperatura, variando de 20 a 37°C (Al-Thawadi, 2008). Mitchell e Ferris em 2005 (citado por Chaparro *et al.*, 2018) relataram que a atividade da uréase aumenta de 5 a 10 vezes quando a temperatura aumenta de 15 a 20°C e de 10 a 20°C, respectivamente. Dhami *et al.* (2014) descobriram que a uréase é completamente estável a 35°C, mas quando a temperatura subiu para 55°C, sua atividade enzimática foi reduzida para 47%.

✓ **Concentração de ureia e cálcio:** as concentrações e fontes de íons cálcio são relevantes para os processos MICCP. Achal e Pan (2014), estudaram a influência da fonte de cálcio (cloreto de cálcio, óxido de cálcio e acetato de cálcio), na precipitação de carbonatos e encontraram que o cloreto de cálcio foi a melhor fonte de cálcio para MICCP, uma vez que proporciona maior atividade uréase e maior produção de calcita.

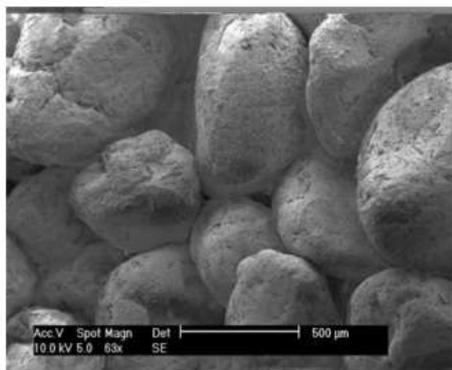
Vários estudos mostraram que formação de CaCO₃ é mais eficaz para baixas concentrações da solução de cimentação. Em ensaios com *S. pasteurii*, a altas concentrações de cálcio e ureia (acima de 0,5 M), a eficiência de precipitação dos carbonatos é reduzida e, ao contrário, com baixas concentrações (0,05 a 0,25 M), a eficiência é aumentada (Al Qabany e Soga, 2013; Ng *et al.*, 2014).

A quantidade de soluções químicas adicionadas determina a diferença entre o *bioclogging* e a biocimentação, assim, em baixa quantidade das soluções químicas adicionadas, a precipitação de carbonato de cálcio ocorre principalmente nos pontos de contatos entre partículas, selando os micro canais (efeito de *bioclogging*), enquanto em maior quantidade de soluções químicas adicionadas, a precipitação estará nos poros gerando alta resistência (biocimentação) (Kadhim e Zheng, 2016).

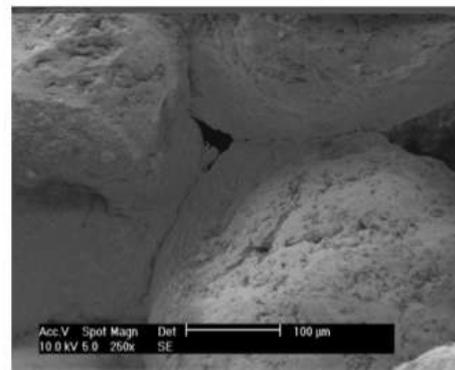
✓ **Grau de saturação:** na maioria das pesquisas em MICCP, as areias são biocimentadas com amostras saturadas Sr=100%. Cheng *et al.* (2013), avaliaram a influência do grau de saturação em amostras de areia preparadas ao 20%, 40%, 80% e 100% de saturação, utilizando *B. sphaericus*. Os resultados mostraram que para a mesma quantidade de CaCO₃ precipitação, a resistência e rigidez aumentaram com a redução no grau de saturação. Acredita-se que as micro fraturas dos cristais precipitados

ao redor dos grãos de areia podem ser responsáveis pelas diferentes respostas mecânicas dos materiais porosos tratados com MICCP, obtidos em diferentes condições de saturação.

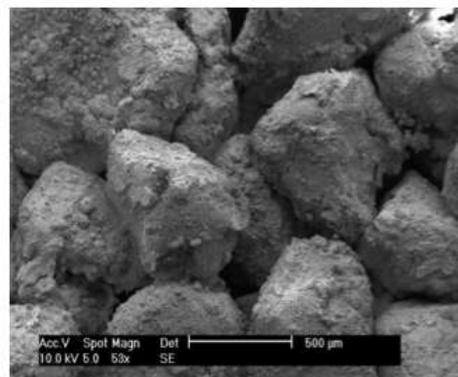
As imagens no MEV (Figura 2-8) em amostras ao 20% e 100% de saturação, apresentaram diferenças na distribuição do carbonato de cálcio nos vazios do solo. Os cristais de CaCO_3 produzidos a 100% de saturação (Figura 2-8 c, d), precipitaram, nos pontos de contato entre as partículas, mas também na superfície do grão, ou estiveram suspensos no espaços porosos, levando a conexões insuficientes entre os grãos de areia.



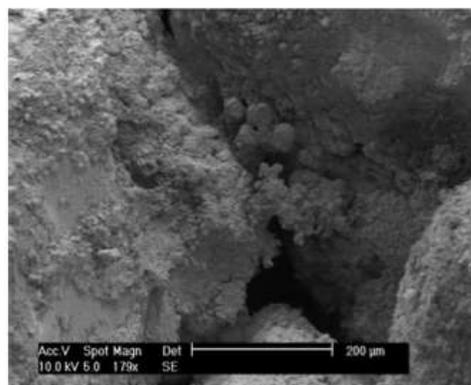
a) Imagem no MEV, modo SE, 63X, CaCO_3 na areia sílica biocimentada com 20% de grão de saturação.



b) Imagem no MEV, modo SE, 250X, CaCO_3 na areia sílica biocimentada com 20 % de grão de saturação.



c) Imagem no MEV, modo SE, 53X, CaCO_3 na areia sílica biocimentada com 100% de grão de saturação.



d) Imagem no MEV, modo SE, 179X, CaCO_3 na areia sílica biocimentada com 1000 % de grão de saturação.

Figura 2-8. Imagens no MEV de amostras de areia sílica biocimentadas utilizando MICCP. As figuras mostram os cristais de carbonato de cálcio em (a) e (b) areia tratada ao 20% de saturação, (c) e (d) areias tratadas ao 100% da saturação.(Cheng *et al.*, 2013).

Na areia tratada ao 20% de saturação (Figura 2-8 a, b), foi observado um forte efeito de revestimento dos cristais de carbonato de cálcio nos grãos de areia. Este efeito de revestimento foi atribuído à solução homogênea adsorvida na superfície dos grãos

de areia, devido à força de tensão superficial, que permitiu que a solução MICCP tivesse acesso à superfície total dos grãos.

Cheng *et al.* (2013), concluíram que a resistência mecânica das amostras tratadas com MICCP é devida à efetividade da formação de CaCO_3 precipitado nos pontos de contato entre partículas, em vez do que a quantidade total de cristais de carbonato formados.

2.4 BIOCIMENTAÇÃO POR MICCP, PARA ESTABILIZAÇÃO DE SOLOS

O processo biogeoquímico da MICCP via hidrólise da ureia, tem sido amplamente estudado para a bioestabilização de solos. A Figura 2-9 mostra um diagrama esquemático do processo da MICCP no solo, proposto por DeJong *et al.*, (2010), e é observada uma célula bacteriana (*Sporosarcina pasteurii*), aderida à partícula de solo. No interior da célula acontecem as reações da hidrólise de ureia, e os produtos metabólicos (NH_3 e CO_2) saem no microambiente da bactéria, aumentando o pH da solução em torno da partícula de solo, e favorecendo a formação de carbonatos. Na presença de íon de cálcio, que são atraídos à superfície da bactéria, ocorre a precipitação de carbonato de cálcio na matriz de solo.

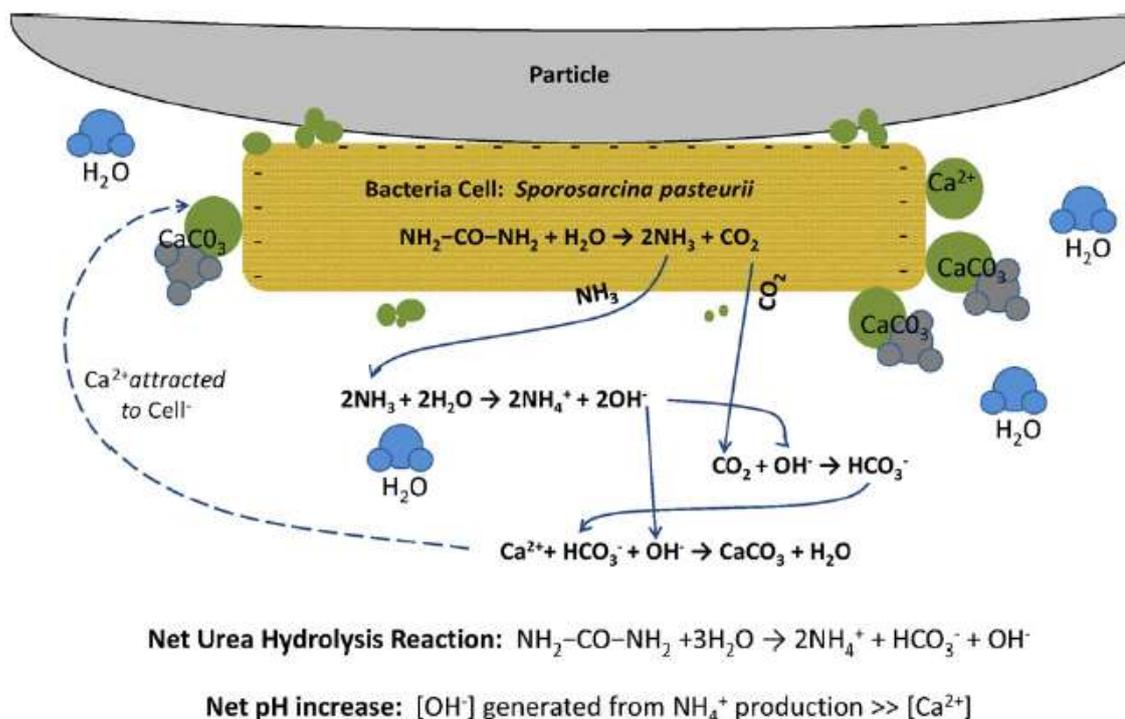


Figura 2-9. MICCP usando hidrólise da ureia (DeJong *et al.*, 2010).

O termo biocimentação é utilizado para se referir ao aumentando da resistência ao cisalhamento do solo, devida ao carbonato de cálcio precipitado, agendo como agente de cimentação entre os grãos (Chu *et al.*, 2015). Mujah *et al.*, (2017), afirmam que a biocimentação por MICCP, acontece quando os cristais de CaCO_3 precipitados, ligam as partículas do solo por meio de uma “ponte eficaz”, concentrada predominantemente no ponto de contato.

A Figura 2-10 mostra em (a) um esquema da distribuição da precipitação de CaCO_3 na matriz do solo é em (b) apresenta um exemplo de uma imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) que verifica o fenômeno da “ponte efetivo”. Pode ser visto que o CaCO_3 precipitado não preencheu completamente os poros entre as partículas do solo, permitindo a drenagem e o movimento do fluido (Mujah *et al.*, 2017).

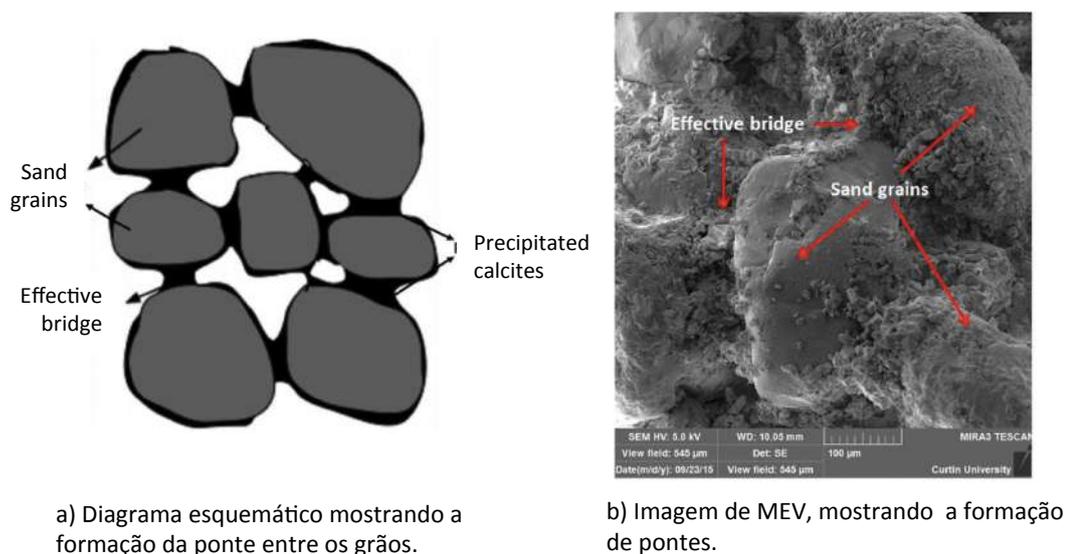
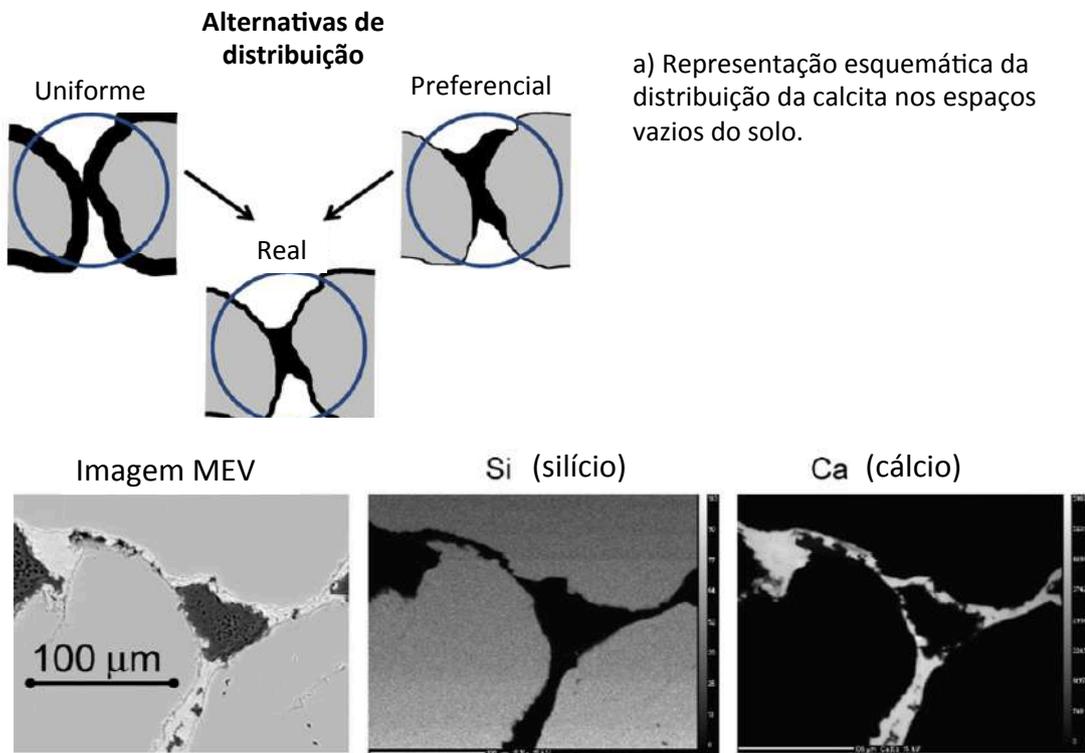


Figura 2-10. Precipitação de CaCO_3 , ligando as partículas do solo na forma da ponte. (Mujah *et al.*, 2017).

Os resultados de Mujah *et al.* (2017), confirmam o encontrado por DeJong *et al.* (2006) e esquematizado por DeJong *et al.* (2010), em relação à distribuição do carbonato de cálcio dentro dos espaços vazios do solo.

A Figura 2-11 (a) fornece esquemas das duas possibilidades extremas da distribuição do CaCO_3 em torno das partículas do solo. Uma distribuição “uniforme” indica que o carbonato precipitou em uma espessura igual, ao redor das partículas do solo. Uma distribuição “preferencial” indica que o carbonato é precipitado apenas nos contatos

partícula-partícula. Por análise das imagens no MEV e de tomografia computadorizada de raios X, encontraram que a distribuição "real" do carbonato precipitado (Figura 2-11 b) é um equilíbrio dessas duas condições extremas, distribuído na vizinhança dos contatos partícula-partícula.



b) Mapa de elementos das partículas de areia de sílice, calcita precipitada e o espaço vazio.

Figura 2-11. Distribuição do carbonato de cálcio precipitado dentro dos espaços vazios do solo (Modificado -DeJong *et al.*, 2010). a) Esquema das alternativas de distribuição uniforme e preferencial e da distribuição real. b) Mapa de elementos mostrando os grãos da areia compostos de silício, o cálcio ao redor das partículas de solo e no contato entre elas. (Na zona do cálcio também há evidência do carbono associado à resina epóxi).

Uma vez precipitado, o carbonato de cálcio (CaCO_3) é estável, ocorrendo apenas uma dissolução lenta, caso houver um fluxo contínuo de água subterrânea ácida ou como resultado da acidificação nos poros (degradação de biomassa). Com uma quantidade suficiente de carbonato de cálcio precipitado, pode se conseguir uma estabilização durável (Van Paassen, 2009).

2.4.1 Solos e microrganismos utilizados na MICCP para biocimentação

O principal desenvolvimento da MICCP como método de biocimentação do solo, tem-se concentrado em solos de grão grosso, areias com tamanhos de grãos entre 0,10 e 0,4

mm (100 e 400 μm), que segundo a classificação dos solos da ASTM- (*American Society for Testing and Materials*, ASTM D 2487-17), pelo tamanho da partícula, correspondem a areias finas e areias meias. Poucos estudos têm estudado a MICCP em solos de grão fino como silte e argilas (Rebata-Landa, 2007; Mavroulidou *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013; Sharma e Ramkrishnan, 2016), possivelmente devido ao espaço poroso limitado dos solos de grão fino, o que poderia dificultar o transporte e a sobrevivência dos microrganismos, pela interação célula-sedimento, o que poderia causar falha de punção ou tração da membrana celular (Rebata-Landa e Santamarina, 2006).

Rebata-Landa (2007) estudou a precipitação de carbonato de cálcio em solos de grão fino como a caulinita ($d_{10} = 0,36 \mu\text{m}$) e silte ($d_{10} = 10 \mu\text{m}$) e Mavroulidou *et al.* (2011) estudaram a MICPP no caulim e silte ($d_{50} = 20 \mu\text{m}$). Sharma e Ramkrishnan (2016) avaliaram a MICCP em solos de grão fino, duas argilas coletadas de Chennai (Tamil Nadu, Índia), biotratadas com *B. Pasteurii*. No limite superior do tamanho de grão, Chu *et al.* (2012), estudaram areias de 0,6 mm a 1,2 mm e Rebata-Landa (2007), estudou a MICCP em areia grossa ($d_{10} = 4 \text{ mm}$) e cascalho fino ($d_{10} = 9 \text{ mm}$).

Mineralogicamente, os solos estudados correspondem a areias de sílica, com quartzo como mineral predominante. Algumas pesquisas estudaram areias com diferente composição mineralógicas. Van Paassen (2009) estudo a MICCP em areias calcárias e areias de sílica, e Mortensen *et al.* (2011), em areias contendo óxido de ferro, areia rica em calcita e uma areia rica em feldspatos.

Os microrganismos utilizados nas pesquisas, correspondem principalmente a bactérias do gênero *Bacillus*, que utilizam a hidrólise de ureia como metabolismo para a precipitação de carbonato de cálcio. A *Sporosarcina pasteurii* (anteriormente *Bacillus pasteurii*) é o microrganismo mais utilizado; outras cepas utilizadas tem sido *Proteus vulgaris*, *Sporosarcina ureae*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus sphaericus*. A Tabela 2-2 apresenta um resumo dos tipos de solos e microrganismos utilizados nas pesquisas da MICCP em geotecnia.

Tabela 2-2. Tipos de solos e microrganismos utilizados nas pesquisas sobre aplicações da MICCP em geotecnia.

REFERÊNCIA	MATERIAL	MICROORGANISMO
Stocks-Fischer <i>et al.</i> (1999)	Areia	<i>B. pasteurii</i> ATCC ¹ 6453

REFERÊNCIA	MATERIAL	MICROORGANISMO
Whiffin (2004)	Areia de quartzo de 300 µm (0,3 mm)	<i>S. pasteurii</i> ATCC 11859
DeJong <i>et al.</i> (2006)	Areia de Ottawa d50= 120 µm (0,12 mm)	<i>B. pasteurii</i> ATCC 6453
Whiffin <i>et al.</i> (2007)	Areia d10= 111 µm; d50= 160 µm (0,16 mm)	<i>S. pasteurii</i> DSMZ ² 33
Rebata-Landa (2007)	Caulinita (d10 = 0,36 µm), silte (d10 = 10 µm), Areia fina de Ottawa (d10 = 90 µm e d50 = 120 µm), Areia grossa (d10 = 4000 µm, d50 = 5300 µm), cascalho fino (d10 = 9000 µm, d50 = 11500 µm)	<i>S. pasteurii</i> ATCC 11859
Van Paassen (2009)	Areia de quartzo branca (Sílica), areia calcária cinza (Calcareous), areia de quartzo amarela	<i>S. pasteurii</i> DSMZ 33
Harkes <i>et al.</i> (2010)	Areia de Itterbeck d10= 111 µm; d50= 160 µm (0,16 mm)	<i>S. pasteurii</i> DSMZ33
Ozdogan (2010)	Areia de Otawa d50= 400 µm (0,4 mm)	<i>S. pasteurii</i> DSMZ 33
Gurbuz <i>et al.</i> (2011)	Areia natural de rio d50= 400 µm (0,4 mm)	<i>S. pasteurii</i> DSMZ 33
Mortensen <i>et al.</i> (2011)	Areia de diversas mineralogias: areia de Otawa-quartzo (d50=0,22 mm), calcita (d50=1 mm), oxido de ferro (d50=0,12 mm), feldspato (d50=0,27 mm), areia Nevada-quartzo (d50= 0,12 mm)	<i>S. pasteurii</i> ATCC 11859
Shirakawa <i>et al.</i> (2011)	Areia de quartzo e feldspato: 150 -300 µm	<i>B. sphaericus</i> (LMG ³ 22257) e <i>Bacillus sp</i> isolado de um solo brasileiro.
Chu <i>et al.</i> (2012)	Areia com tamanhos 600 -1200 µm (0,6 - 1,2 mm)	<i>Bacillus sp</i> isolados de areia de praia tropical (alcalófilo e uréase positivo)
Al Qabany <i>et al.</i> (2012)	Areia sílica: d50 =140 e 165 µm, d90 = 150 e 250 µm	<i>S. pasteurii</i> (ATCC 11859)
Lee <i>et al.</i> (2013)	Solo residual de Kuala Lumpur (Malasia) com tamanhos a partir da fração argila (2 µm) até 2 mm (2000 µm)	<i>B. megaterium</i> ATCC 14581
Cheng <i>et al.</i> (2013)	Areia de quartzo pura, peneirada em grão fino (d10=180 µm) e grão grosso (d10=600 µm)	<i>B. sphaericus</i> DSMZ 23526
Gat <i>et al.</i> (2014)	Areia de Zikkin (Israel)	Co-cultura com <i>S. pasteurii</i> DSMZ 33 e <i>B. subtilis</i> DSMZ 6397
Sarmast <i>et al.</i> (2014)	Areia de Jupar (Kerman Province)	<i>S. pasteurii</i> e <i>S. ureae</i>
Rowshanbakht <i>et al.</i> (2016)	Areia sílica (d50=0,2 mm)	<i>S. pasteurii</i> PTCC ⁴ 1645
Sharma and Ramkrishnan (2016)	Argilas CL e CH coletadas de Chennai (Tamil Nadu, Índia).	<i>S. pasteurii</i>
Carmona <i>et al.</i> (2016)	Areia mal graduada (78,7%)+ pedregulho (15,5%)+silte (3,5%) + argila (2,3%)	Enzima Uréase (Sigma-Aldrich Company Ltda) de <i>Canavalia ensiformis</i> (jack bean)
Terzis <i>et al.</i> (2016)	Areia sílica (>98%), d50= 190 µm (0,19 mm)	<i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 11859
Wang <i>et al.</i> (2018)	Areia sílica d50= 100 µm (0,10 mm)	<i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 11859

Nota: ¹ATCC: American Type Culture Collection

²DSMZ: German Collection of Microorganisms and Cell Culture

³LMG: Belgian Co-ordinated Collection of Micro-organism (BCCM)

⁴PTCC: Persian Type Culture Collection

2.4.2 Métodos de aplicação da MICCP para a biocimentação do solo

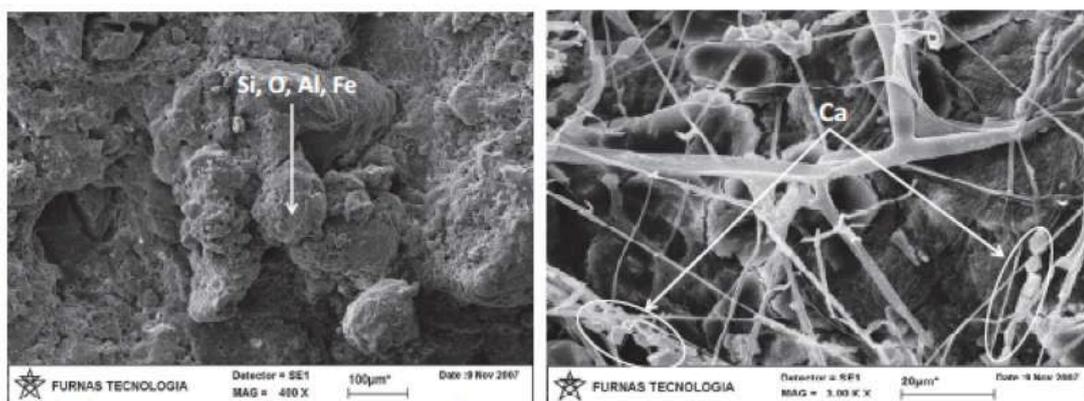
O material utilizado para produzir o efeito de biocimentação e o efeito de *bioclogging* é chamado de “biocimento” (Chu *et al.* 2015). Tem sido desenvolvidos e pesquisados, muitos processos para levar o biocimento à matriz de solo.

2.4.2.1 Bio-estimulação e Bio-aumento

Duas estratégias tem sido estudadas em relação ao uso de bactérias endógenas ou exógenas. A primeira estratégia, a bio-estimulação, e consiste na aplicação de um meio de cultura estéril capaz de ativar às bactérias endógenas, indutoras da formação de carbonato de cálcio. A estratégia alternativa, é o bio-aumento, e consiste na inoculação de bactérias (microrganismos exógenos) com capacidade de precipitação comprovada. A última, tem sido a estratégia mais utilizadas nas pesquisas para a bioestabilização de solos, no entanto, para alguns autores o bio-aumento não é favorável, devido à introdução de microrganismos não nativos no solo, aumento de custos e dificuldade de aplicação uniforme no subsolo (DeJong *et al.*, 2014).

Na Universidade de Brasília, tem sido desenvolvidas pesquisas, utilizando a estratégia de bio-estimulação, para aplicação em controle da erosão. Valencia *et al.* (2014), isolaram bactérias de um perfil de solo tropical do Distrito Federal–Brasil, e determinaram o melhor nutriente para potencializar sua aplicação em bioestabilização de solos, por o processo de precipitação de carbonato de cálcio. Posteriormente, no 2015 (Valencia *et al.*, 2015), utilizaram estes resultados e aplicaram o nutriente em amostras de solos, da mesma zona onde foram isolados os microrganismos. A Figura 2-12, mostra imagens no MEV, do solo antes e depois da aplicação do nutriente para induzir a precipitação do carbonato de cálcio. O carbonato de cálcio gerado no biotratamento, causou a redução do índice de vazios, da permeabilidade, do índice de colapso e erodibilidade, além do aumento da sucção e resistência ao cisalhamento.

Outra aplicação da estratégia de bio-estimulação, consiste na melhoria das propriedades físicas e mecânicas dos solos para sua utilização em pavimentação rodoviária. Segundo Gómez (2013), existem companhias que oferecem produtos enzimáticos naturais para gerar melhorias nas características mecânicas e físicas dos solos, que refletem no aumento do CBR (*California Bearing Ratio*), parâmetro usado para caracterizar a resistência dos solos de subleito.



a) Imagem no MEV, modo SE, 400X. Amostra de solo de 4 m de profundidade sem aplicar o nutriente para MICCP.

b) Imagem no MEV, modo SE, 3000X. Amostra de solo de 4 m de profundidade com o nutriente.

Figura 2-12. Imagens no MEV de um solo tropical sem e com a aplicação de um nutriente para induzir a precipitação de carbonato de cálcio. a) presença de elementos Si, O, Al, Fe, comuns nos solos tropicais. b) presença de precipitados fibrosos com conteúdo de Ca. (Valencia *et al.*, 2014)

Nos estudos de Gómez (2013), se procura a melhoria do solo para se utilizar como material de subleito e o método de aplicação da MICCP, consiste em misturar o meio nutritivo com a água da compactação do solo, o seja, que o tratamento é aplicado *ex situ*. Para a MICCP, Gómez (2013) utiliza a adição do meio nutritivo B4 (Lee, 2003) e também a adição direta ao solo da enzima uréase, oriunda do extrato de feijão de porco (*Canavalia ensiformes*).

No entanto, muitos desafios ainda existem para a aplicação de esta estratégia, como a dificuldade para obter um tratamento uniforme no perfil de solo (DeJong *et al.*, 2014) e segundo Gómez (2013) a grande dificuldade desta metodologia é o fato da microbiota ser muito complexa, dinâmica e heterogênea.

2.4.2.2 Biocimentação *in situ*: Biogrouting

O processo para fornecer o biocimento *in situ* e conseguir a biocimentação, tem sido chamado o *biogrouting*.

Van Paassen (2009) lista as etapas do *Biogrouting* da seguinte maneira:

- i) Cultura do microrganismo adequado no laboratório (ou na sub-superfície).
- ii) Injeção do microrganismos (e nutrientes) no solo e transportá-los para o localização desejada.

- iii) Fornecer a os microrganismos os substratos adequados para induzir a conversão bioquímica que resulta na precipitação de carbonato de cálcio (ureia e fonte de cálcio).
- iv) Remoção dos produtos restantes do processo (o amônio).

Vários autores (Ivanov e Chu, 2008; Chu *et al*, 2015; Achal e Kawasaki, 2016), comparam a biocimentação do solos utilizando o *biogrouting* com o *grouting* químicos e todos concordam na primeira vantagem do *biogrouting*: a utilização de reagentes e produtos não tóxicos, por exemplo, as bactérias que são usadas para o biocimento são geralmente não-patogênicas e ambientalmente amigável, enquanto que muitos *grouting* químicos, especialmente aqueles baseados em acrilamidas e poliuretano, são tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente.

Além disso, a reação microbiana no *biogrout* é mais lenta o que a reação química em argamassas químicas, isso reduz a velocidade de solidificação, e permite que a biomassa se espalhe através de um maior volume de solo. A biomassa tem viscosidade muito mais baixa e pode fluir como a água (Chu *et al*, 2015).

Outra vantagem é o menor custo dos reagentes. O biocimento é produzido a temperatura ambiente e requer menos energia para sua produção. Os custos avaliados por Ivanov e Chu (2008), das matérias-primas para o *grouting* químico do solo, estão na faixa de US\$ 2 a US\$ 72 por m³ de solo, e os custos das matérias-primas para o *biogrouting* podem estar na faixa de US\$ 4 a US\$ 9 por m³ de solo, no caso em que materiais de desperdício são usados como fonte de carbono para o crescimento microbiano. Estes custos, foram custos de matérias-primas, a preços de mercado, sem incluir o custo de colocação, que é uma parte importante do custo total. No entanto, as tecnologias para o *biogrouting* podem ser similares àquelas usadas no *grouting* químico, e assumindo que os custos de colocação são comparáveis, então as comparações de custo mostradas são relevantes.

No entanto, uma desvantagem do *biogrout* é a produção excessiva de amônia, o que na realidade é uma desvantagem da MICCP (via do ciclo do nitrogênio). De acordo com as Normas Australianas (2015), se mais de 0,5 mg/l do amônio, for consumido de uma só vez, como fonte de água direta, levaria a doenças fatais em bebês (Mujah *et al.*, 2017). Segundo a OMS, 1986 (Organização Mundial de Saúde), os níveis naturais do amônio

nas águas subterrâneas, são geralmente inferiores a 0,2 mg/l e as águas superficiais podem conter até 12 mg/l.

De modo a resolver este problema, tem várias propostas. Uma delas, no sentido de diminuir a geração de amônia no processo de precipitação de carbonatos, produzindo o *biogrout* por um processo de MICCP baseado na enzima asparaginase, em que a MICCP seguiu a amonificação (Galloway em 2005, citado por Achal e Kawasaki, 2016), e duas propostas, no sentido de evitar a lixiviação de amônia para o nível do lençol freático: i) tratar o efluente rico em amônia pela biocimentação, antes de descarregar; e ii) retroalimentar (*feedback*) o amônio como fertilizante para as plantas vizinhas (Mujah *et al.*, 2017).

2.4.2.3 Introdução e fixação das bactérias (biocimentação *in situ*)

A fim de garantir uma melhoria bem-sucedida do solo pela MICCP, é muito importante a introdução e retenção de bactérias ureolíticas ou enzimas uréase dentro da matriz do solo. A retenção indevida das bactérias, poderia levar a ser removida ou retirada por uma injeção subsequente da solução de cimentação, levando a uma distribuição desigual de bactérias e resultando na precipitação não uniforme do CaCO_3 e da resistência dentro do solo.

De acordo com Mujah *et al.* (2017), a introdução de bactérias no solo, pode ser alcançada através de dois métodos principais: por injeção ou pre-misturado. O método de injeção garante o fluxo da solução bacteriana de cima para baixo, mais, a solução deve ter um período de retenção, de modo que as bactérias sejam fixadas aos grãos de areia antes da injeção da solução de cimentação. No método de pre-mistura, as bactérias são misturadas mecanicamente com o solo antes da introdução da solução de cimentação.

✓ **Método por injeção:** Mujah *et al.* (2017) afirmam que o método de injeção é o método mais comumente preferido para a MICCP, uma vez que as condições de injeção (fluxo, pressão e gradiente hidráulico) podem ser controlados facilmente durante o teste e inclusive podem ser ajustadas. A injeção pode ser vertical (Whiffin *et al.* 2007) ou horizontal (Van Paassen *et al.*, 2010). Além disso, este método permite simular condições do solo com diferentes graus de saturação.

Whiffin *et al.* (2007), avaliaram a viabilidade da MICCP como técnica de melhoramento do solo em uma coluna de areia de 5 m de comprimento, por aplicação de uma solução bacteriana com *Sporosarcina pasteurii* e uma solução de ureia/cloreto de cálcio como a solução de cimentação. Para imobilizar as bactérias na coluna, propuseram um sistema de injeção de dois estágios. No primeiro estágio, as bactérias foram injetadas para preencher o volume da coluna e foi seguida pela injeção de uma solução de cloreto de cálcio 50 mM para imobilizar as bactérias. No segundo estágio, imediatamente após o passo da colocação bacteriana, foi injetada a solução de ureia/cloreto de cálcio para iniciar a biocimentação. Em ambos estágios a taxa de injeção da solução bacteriana e da solução de cimentação foi de 350 ml/h. A Figura 2-13 mostra o esquema da preparação da coluna de areia e os resultados obtidos do carbonato de cálcio precipitado e a resistência.

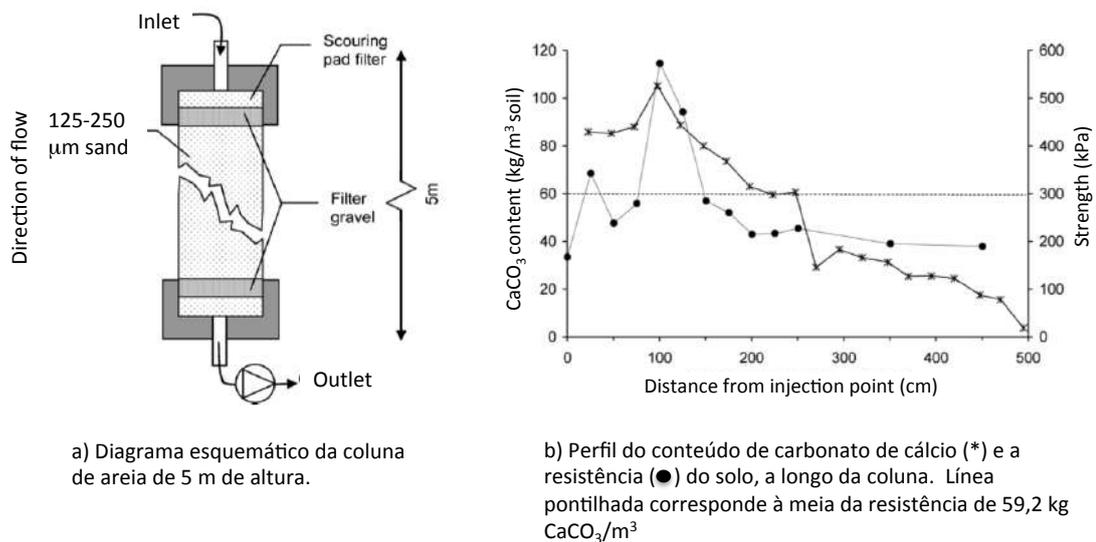


Figura 2-13. MICCP em coluna de areia de 5 m de comprimento (Modificado -Whiffin *et al.*, 2007).

O tratamento bio-mediado conseguiu precipitar carbonato de cálcio nos 5 metros de comprimento da coluna, embora o perfil de concentração do carbonato não foi homogêneo, apresentando quantidades elevadas de CaCO₃ no topo da coluna (perto do local da injeção) e uma diminuição em direção à base. Na areia biocimentada foram feitos ensaios de compressão triaxial, onde foi encontrado um aumento significativo na resistência e rigidez ao longo de todo o comprimento da coluna de areia.

Por outra parte, algumas desvantagens do método de injeção são a distribuição não homogênea das bactérias e da cimentação (Whiffin *et al.*, 2007), a rápida cimentação localizada na área ao redor do ponto de injeção e subsequente obstrução o entupimento desta região. Para melhorar essa desvantagem, Harkes *et al.* (2010) sugeriram uma taxa de injeção mais lenta para a suspensão bacteriana (220 ml/h); Al Qabany *et al.* (2012) propuseram um período de espera entre a injeção da suspensão bacteriana e a solução de cimentação para permitir que as bactérias sejam transportadas ao longo da coluna de areia e bem fixadas antes da aplicação da solução de cimentação.

O método de injeção também pode utilizar se por percolação de superfície, simplesmente por *spraying* ou gotejamento de suspensão bacteriana e solução de cimentação, alternadamente na superfície do solo, que penetram no solo pela gravidade (Cheng e Cord-Ruwisch, 2012). A Figura 2-14 mostra uma comparação dos tratamentos por injeção de fluxo submerso (regime saturado) e por percolação de superfície (regime não saturado).

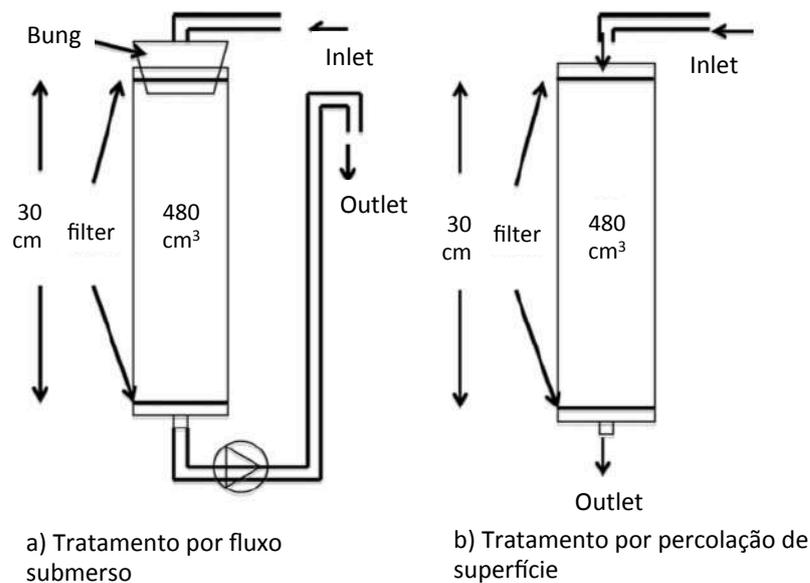


Figura 2-14. Comparação esquemática dos métodos de injeção da MICCP (a) tratamento por fluxo submerso- condição saturada (Whiffin *et al.*, 2007) e (b) tratamento por percolação de superfície (condição não saturada). (Cheng and Cord-Ruwisch, 2012).

Os resultados mostraram que a retenção da bactéria na coluna de areia aumentou com o número das camadas utilizadas.

A Figura 2-15, mostra em (a) um esquema do tratamento por camadas alternadas, desde duas camadas até doze camadas e em (b) os resultados da retenção bacteriana e a conversão da ureia dependendo no numero de camadas.

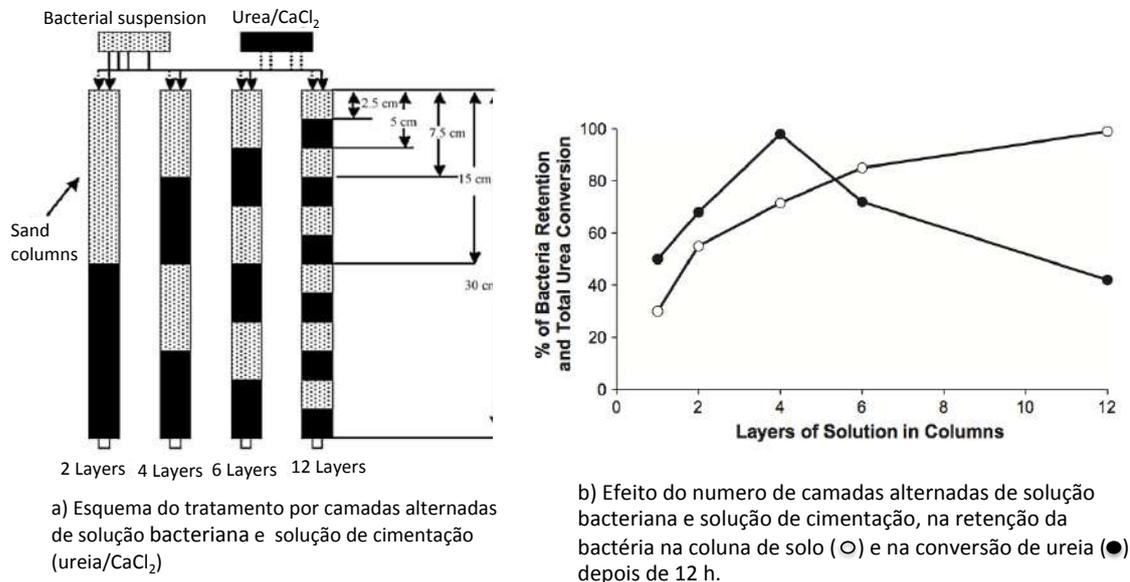


Figura 2-15. Tratamento de percolação, utilizando camadas alternadas da solução bacteriana e da solução de cimentação (ureia/cloreto de cálcio) e efeito das camadas na fixação da bactéria na coluna de areia biocimentada (Modificado - Cheng e Cord-Ruwisch, 2012).

A principal vantagem deste método é que a injeção de solução não requer maquinaria pesada devido à livre drenagem do movimento da água. No entanto, este método pode levar à limitação do tratamento de solos de grão fino devido à baixa taxa de infiltração e permeabilidade do solo, porém, pode ter uma possível aplicação na construção do aterros com solos de grão grosso (Mujah *et al.*, 2017).

✓ **Método por pre-mistura:** no método do pre-mistura, as bactérias são pre-misturadas mecanicamente com o solo até que uma homogeneidade desejada seja alcançada. Apesar do fato de que o método de pre-mistura resolveu o problema da homogeneidade, ele continua sendo o método MICCP menos favorável porque causa perturbação no solo. Isto é crítico porque a perturbação do solo pode levar a um desenvolvimento de pseudo-tensão nas amostra de solo, como resultado da mistura vigorosa entre o solo e o agente de cimentação (Mujah *et al.* 2017).

2.4.3 Efeito da MICCP nas propriedades do solo

Vários experimentos revelaram que o MICCP pode melhorar a resistência ao cisalhamento, a compressibilidade e reduzir a condutividade hidráulica, a absorção de água.

2.4.3.1 Resistência ao cisalhamento

No geral, o carbonato de cálcio precipitado nos espaços vazios das partículas do solo, aumentam a ligação e, assim, a melhoria na resistência ao cisalhamento do solo. Alguns resultados das pesquisas mostram que o aumento na resistência do solos arenosos tratados com MICCP, é devida principalmente pelo aumento da coesão do solo, que resulta do aumento do teor de cimento (CaCO_3), enquanto o ângulo de atrito, o impacto na melhoria foi menor, para amostras em graus de saturação altos, $S_r = 65\%$ e 100% (Cheng *et al.*, 2013).

Terzis *et al.* (2016), encontraram um aumento significativo na coesão das amostras biocimentadas com MICCP, com coesão efetiva de 253 kPa, em comparação com a coesão nula das amostras não tratadas. Em quanto que, o angulo de atrito efetivo teve uma ligeira melhoria devida à MICCP, de $\phi' = 38^\circ$ nos solos sem tratamento e $\phi' = 44^\circ$ nos solos biocimentados.

Os resultados de DeJong *et al.* (2006) demonstraram um aumento da capacidade axial sob condições de cisalhamento monotônico - não drenado, das amostras biocimentadas, com valores da resistência maiores, quando foram comparadas com amostras não cimentadas, e com amostras cimentados com gesso (representativo do comportamento típico de areia quimicamente cimentada). A resposta q/p' dos espécimes indicou um comportamento de não colapso. As amostras exibiram maior rigidez ao cisalhamento inicial e maior capacidade elástica, em comparação com amostras não tratadas, e comportamento similar com os espécimes de controle cimentados com gesso. A Figura 2-16 mostra o comportamento tensão – deformação das amostras de solo controle, biocimentadas e cimentadas com gesso.

Whiffin *et al.* (2007) relataram que o aumento na resistência do solo é diretamente proporcional ao aumento do conteúdo de carbonato de cálcio produzido. Porém, foi necessário um teor mínimo de carbonato de cálcio de 60 kg/m^3 para uma melhoria mensurável da resistência no material. Baixas concentrações de carbonato de cálcio não

melhoraram significativamente a resistência das amostras. Cheng e Cord-Ruwisch (2012) também encontraram uma relação direta entre a resistência e o conteúdo de CaCO_3 , mas, esta relação só foi encontrada para o regime de fluxo saturado. Nas amostras preparadas pelo método de percolação de superfície, não foi encontrada uma relação entre estas variáveis.

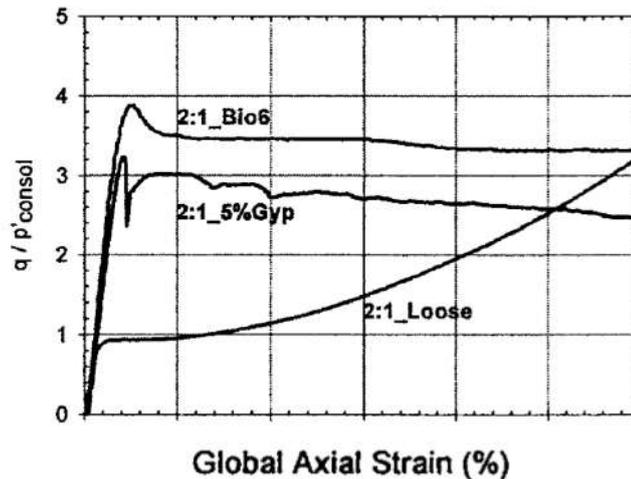


Figura 2-16. Comportamento q/p' de amostras biocimentadas comparadas com amostras não tratadas e tratadas como gesso. (DeJong *et al.*, 2006).

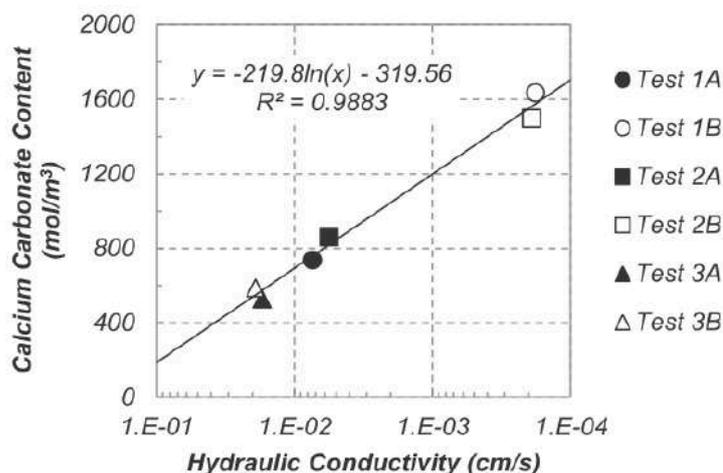
2.4.3.2 Permeabilidade

A formação de carbonato perto do contato partícula-partícula diminui a garganta dos poros e restringe o fluxo da água. Experimentalmente, Whiffin *et al.* (2007) observaram uma ligeira redução na permeabilidade, de 2×10^{-5} m/s até uma permeabilidade média sobre a coluna, de 9×10^{-6} m/s, mas o efeito não pareceu estar relacionado com o teor de carbonato de cálcio.

Martínez *et al.* (2013) implementaram a MICCP em colunas de areia 50 cm de comprimento (Figura 2-17), e encontraram que a redução na condutividade hidráulica dependeu do tipo de fluxo utilizado (fluxo contínuo ou fluxo interrompido), e a permeabilidade foi significativamente reduzida (10^{-1} para 10^{-4}) com a técnica de fluxo contínuo. Este comportamento foi atribuído à maior suscetibilidade para as colunas tratadas com fluxo contínuo, para entupir a região perto do ponto de injeção. Martínez *et al.* (2013) encontraram uma relação inversa entre a condutividade hidráulica e o conteúdo de carbonato de cálcio precipitado (Figura 2-17).



a) Colunas cilíndricas de 50 cm de altura.



b) Relação entre a condutividade hidráulica e o conteúdo de carbonato de cálcio precipitado

Figura 2-17. MICCP coluna de areia de 50 cm de comprimento. (Modificado - Martinez *et al.*, 2013).

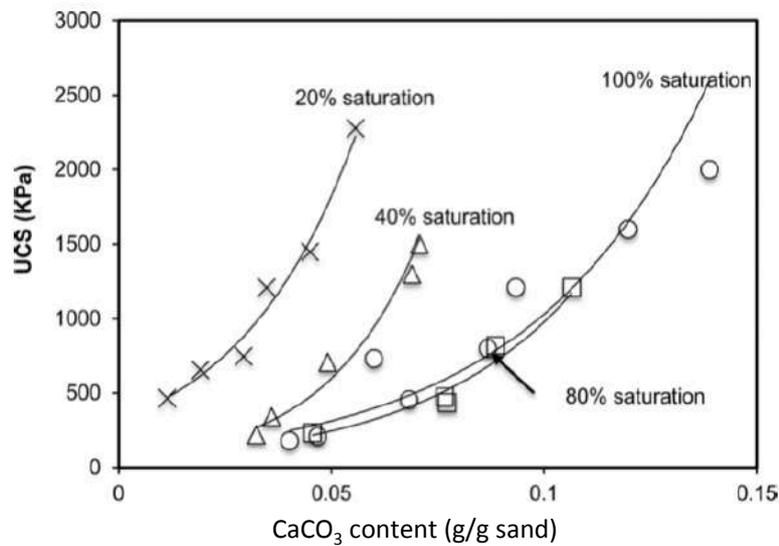
Soon *et al.* (2013), avaliaram a eficiência da MICCP em um solo residual tropical e uma areia, com variação nas densidades do solo (85%, 90% e 95% de suas respectivas densidades máximas) e biotratadas como *B. megaterium*. Os resultados mostraram maiores reduções da condutividade hidráulica nas amostras de areia do que nas amostras de solo residual. A maior redução na condutividade hidráulica ocorreu sempre, nos espécimes mais densos. Nas amostras de areia, a condutividade hidráulica diminuiu em aproximadamente uma ordem de magnitude de $3,5 \times 10^{-3}$ m/s para $3,2 \times 10^{-4}$ m/s.

2.4.3.3 Resistência à compressão simples, σ_{usc}

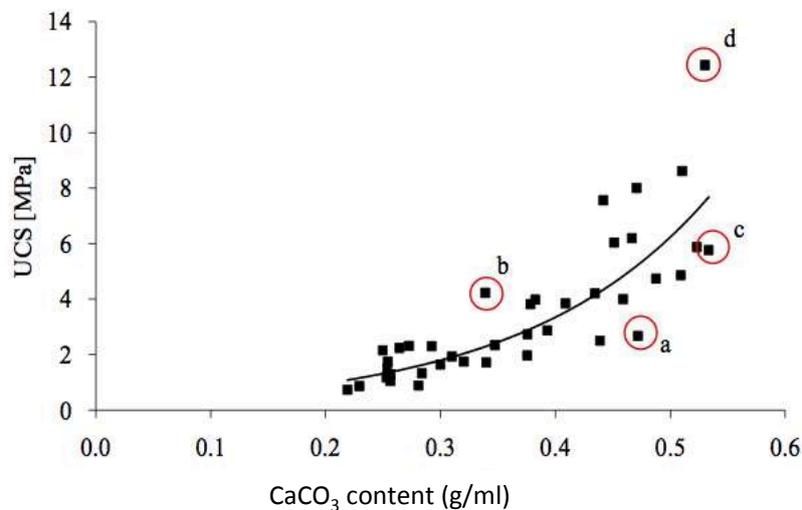
A σ_{usc} - *Unconfined compressive strength*, é o teste muito usado para descrever a resistência de solos biocimentados, e relatado por muitos pesquisadores. Os resultados disponíveis na literatura relatam que o valor mais baixo do σ_{usc} registrado em areias, foi em torno de 100 kPa (Cheng *et al.*, 2013) enquanto o maior valor foi 12,4 MPa (Van Paassen, 2009). Em solos de grão fino, foram registrados valores de σ_{usc} entre 56 e 360 kPa.

Van Paassen (2009), revelou uma relação exponencial entre o teor de CaCO_3 e os valores de σ_{usc} de solos biocimentados (Figura 2-18). Mujah *et al.* (2017), afirmam que apesar de ter a mesma quantidade de cristais precipitados com CaCO_3 , a resposta

mecânica do solo tratado com MICCP pode variar significativamente dependendo do mecanismo eficaz de precipitação com CaCO_3 .



a) Relação entre a resistência à compressão não confinada e o conteúdo de carbonato de cálcio. (Tomado de Cheng *et al.*, 2013)



b) Relação entre a resistência à compressão não confinada e o conteúdo de carbonato de cálcio. (Tomado de Van Paassen, 2009)

Figura 2-18. Variação da σ_{usc} com o teor de carbonato de cálcio. (Cheng *et al.* 2013 e Van Paassen, 2009).

Cheng *et al.* (2013) investigaram as propriedades geotécnicas da areia biocimentada sob diferentes graus de saturação, utilizando *B. sphaericus*. Foram realizados ensaios de σ_{usc} em amostras cimentadas e antes de realizar os testes, as amostras de areia foram tratadas com diferentes quantidades de MICCP, com 20%, 40%, 80% e 100% de saturação. Os resultados mostraram um incremento da UCS com o aumento do teor de CaCO_3 para

todas as amostras tratadas, seguindo uma relação exponencial como nos resultados de Van Paasen (2009), (Figura 2-18). Obtiveram valores de σ_{usc} entre 100 kPa e 2000 kPa.

Wang *et al.* (2018) aplicaram a MICCP em uma areia de sílica (seringas diâmetro interno de 30 mm e comprimento de 110 mm), aplicando o tratamento e com 28 dias de curado. Encontraram que a σ_{usc} aumenta com o número de tratamentos e com o conteúdo de CaCO_3 no espécimen. O máximo valor alcançado foi de 4 MPa na amostra com 4 tratamentos de MICCP. A falha ocorreu repentinamente nas amostras de areia. Encontraram pequenas variações na σ_{usc} devida ao método de colocação *in situ*, das soluções bacteriana e de cimentação, com 340 kPa no fluxo submerso (regime saturado) e 390 kPa no método de percolação de superfície (regime não saturado).

Sharma e Ramkrishnan (2016) avaliaram a MICCP em solos de grão fino, duas argilas coletadas de Chennai (Tamil Nadu, Índia), biotratadas com *B. Pasteurii*. O método de aplicação do tratamento foi a adição direta das bactérias no solo e seguidamente os reagentes (ureia, cloreto de cálcio e nutriente *Broth*). Todos os componentes foram misturados e compactados ao 95% da densidade máxima. As variáveis foram a concentrações celular, a concentrações dos reagentes e o tempo de curado e o parâmetro medido foi a σ_{usc} . Observou-se a partir dos resultados do teste que, aumentando a duração do tratamento (7 dias o máximo tempo) os valores do σ_{usc} aumentaram ainda mais. Os valores da σ_{usc} obtidos variaram entre 125 kPa e 360 kPa (os valores da σ_{usc} dos solo sem tratamento foram de 100 e 125 kPa).

Por outra parte, Lee *et al.* (2013) obtiveram melhoras na σ_{usc} de siltes de Kuala Lumpur, devida ao tratamento com MICCP, com valores entre 56 e 76 kPa. Os resultados mostraram aumentos na resistência à compressão não confinada, proporcional com a quantidade de calcita precipitada e com o aumento na duração do tratamento (no máximo 48 h). Tratamentos acima de 48 h, a quantidade de calcita foi depreciável. A concentração dos reagentes (0,25 e 0,5 M) não tiveram influência nos resultados da σ_{usc} .

2.4.4 Pesquisas focadas à estudo da influência da mineralogia e o tamanho de partícula na MICCP

A primeira tentativa de avaliar a influência da mineralogia do solo na MICCP, foi conduzida por Rebata-Landa (2007), com um estudo simples para identificar padrões na

evolução da biomineralização, em algumas superfícies minerais. Usou três superfícies minerais: mica, calcita e quartzo, as quais foram impregnadas com células de *Sporosarcina pasteurii*, re-suspensas numa solução de ureia-cloreto de cálcio, e incubadas a 30°C, durante 1, 2 e 4 semanas.

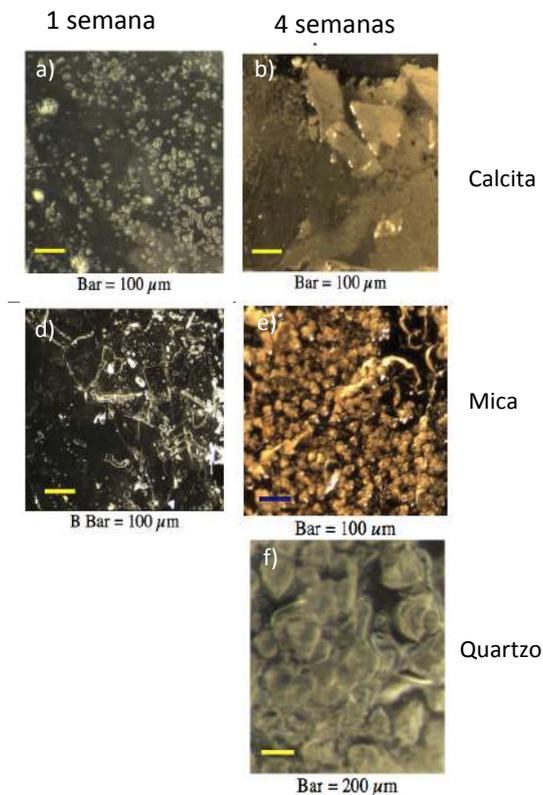


Figura 2-19. Nucleação dos cristais de carbonato nas superfícies minerais depois de 1 e 4 semanas. (a) e (b) superfície de calcita. (c) e (d) superfície de mica. (f) superfície de quartzo. (Modificada – Rebata-Landa, 2007).

Os resultados (Figura 2-19) demonstraram, a preferência da precipitação sobre a superfície de calcita, coberta 100% por cristais depois das quatro semanas, enquanto que a superfície da mica foi coberta 90% de cristais e a superfície de quartzo 70%.

Rebata-Landa (2007), concluiu que a forma dos cristais precipitados e o tempo da nucleação são influenciados pela natureza do substrato e, por conseguinte, a biocimentação será diferente em solos de diferente mineralogia, mesmo que tenham tamanhos de poros e de partículas semelhantes.

O mesmo autor desenvolveu testes para analisar o efeito do tamanho de partícula na precipitação de carbonato de cálcio, utilizando solos de diferentes tamanhos: caulinita, silte, areia fina (areia de Ottawa), areia grossa e cascalho fino, que foram imersos numa

solução com células de *Sporosarcina pasteurii* e solução de ureia/cloreto de cálcio, durante 32 dias, substituindo os nutrientes a cada 4 dias.

Os resultados são mostrados na Figura 2-20, e foi observada a influência do tamanho de partícula na precipitação de CaCO_3 , com maior precipitação para partículas com tamanho aproximado de 100 μm , sem cimentação na caulinita (grão fino) e uma perda da cimentação, provavelmente por manipulação das amostras, da areia grossa e do cascalho fino, onde uma fina camada de mineral precipitado foi insuficiente para consolidar as partículas, concluindo que nestes solos, pode ser obtida a biocimentação se forem fornecidos os nutrientes necessários e o tempo suficiente para desenvolver uma camada mais espessa de carbonatos. Além disso, Rebata-Landa (2007) apresentou um modelo do conteúdo de carbonato de cálcio em relação ao tamanho da partícula.

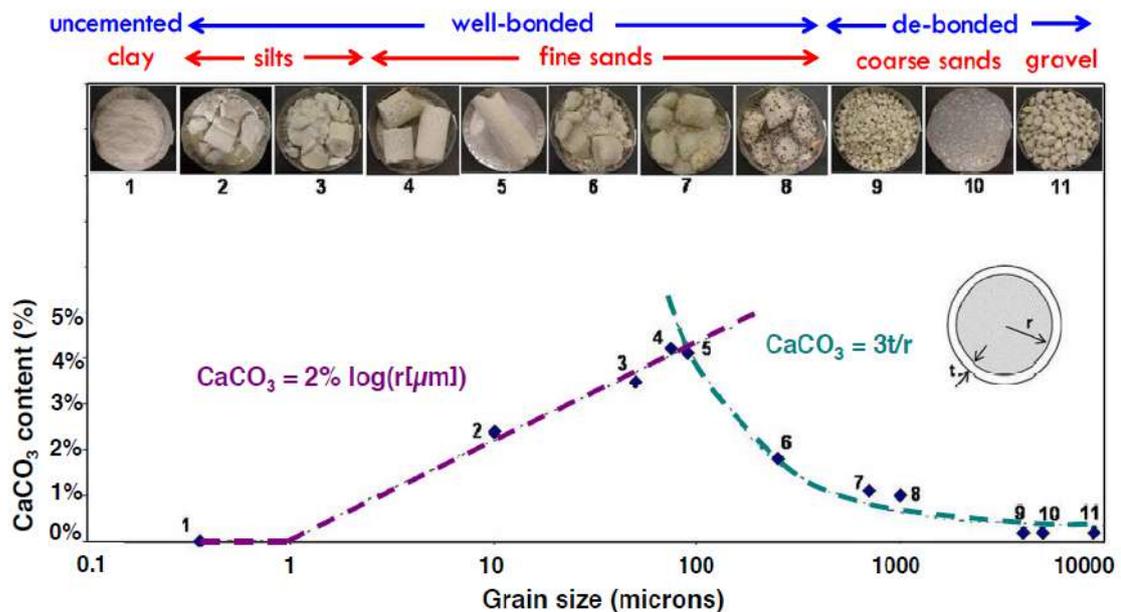


Figura 2-20. Relação entre o conteúdo de carbonato de cálcio precipitado (%) e o tamanho da partícula. (Rebata-Landa, 2007).

Van Paassen (2009), estudou a influência do tipo de areia, no polimorfo de carbonato precipitado, usando areia de quartzo branca e amarela e areia calcária cinza, tratadas com uma solução com *Sporosarcina pasteurii*, fluido de fixação (0,5M de CaCl_2) e reagente de cimentação (0,5M de ureia/ CaCl_2). Depois do tratamento bacteriano, o carbonato precipitado foi analisado utilizando Microscopia eletrônica de varredura-MEV e Difração de raios X- DRX.

A Figura 2-21, amostra imagens no MEV da areia de sílica. Nas areias de quartzo foram encontrados cristais esféricos (imagem A), semelhantes à vaterita, de até 50 μm de diâmetro, enchendo os espaços entre os grãos de areia e formando pontes entre eles (imagem B). Algumas esferas de carbonato, foram trincadas e suas dissecções mostraram, que elas consistiam de: um núcleo de textura menos cristalina, de 5 -10 μm de diâmetro, envolto por uma camada de material mais cristalino, lembrando opticamente a vaterita, com espessura variável 2-20 μm (imagens C, D, E).

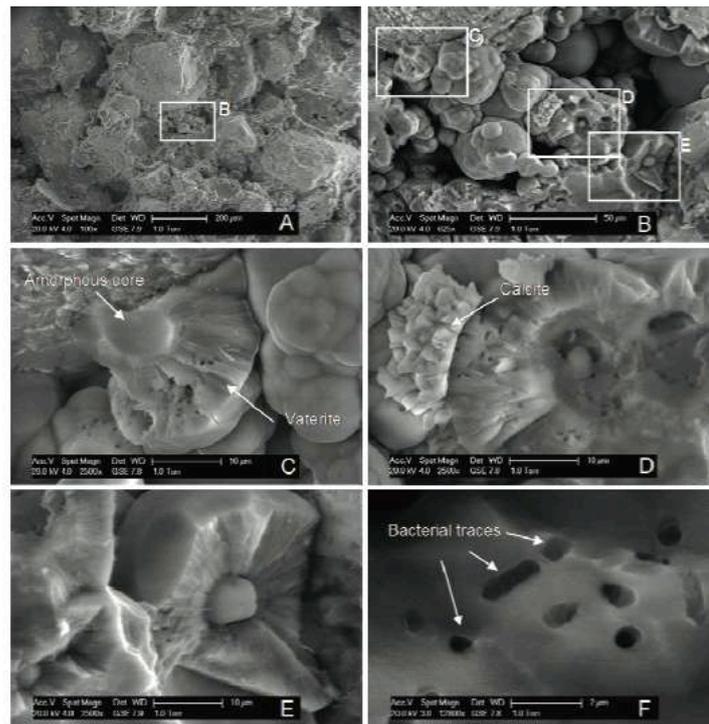


Figura 2-21. Imagens no MEV da areia de sílica.(Van Paassen, 2009).

Dentro da camada que rodeia a núcleo, foram observados buracos. Van Paassen (2009) explica que os buracos, são provavelmente locais onde as bactérias estavam presas dentro do cristal. Na imagem F, foram observadas impressões de cor preto, associadas à presença de material orgânico, queimado pelos elétrons irradiados durante a análise no MEV no modo SE. Em algumas esferas, a segunda camada estava coberta por precipitados romboédrico aglomerados (imagem D) associados possivelmente a calcita.

De outro lado, as imagens no MEV (Figura 2-22) da areia calcária, amostras os grãos de areia totalmente cobertos por uma camada fina, de cristais de calcita romboédrica (imagens A, B) com tamanhos entre 2 e 5 μm . Nos contatos entre os grãos, foram observadas aglomerações de cristais de calcita (imagens C, D).

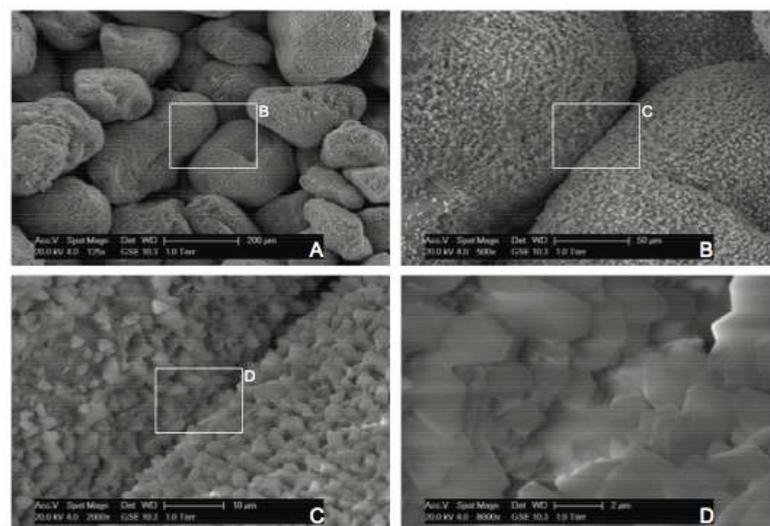


Figura 2-22. Imagens no MEV da areia calcária (Tomado de Van Paassen, 2009).

Na pesquisa de Mortensen *et al.* (2011), foram executados experimentos de colunas de solo, com diversas areias, cada uma, com abundância de um determinado mineral, assim: areia sílica, areia de calcita, areia de feldspato e areia de óxido de ferro, para investigar o efeito da mineralogia no processo da MICCP, utilizando *Sporosarcina pasteurii*. Adicionalmente, foram usados dois tipos de areia sílica, areia sílica grossa e areia sílica fina.

A precipitação de carbonato de cálcio foi verificada, a partir das medições de velocidade de onda de cisalhamento durante o processo. Os solos de todas as mineralogias, experimentaram um acréscimo na velocidade da onda de cisalhamento devida à precipitação de carbonato de cálcio, mostrando que a taxa de precipitação de carbonato de cálcio, não foi inibida em nenhum deles e que a MICCP pode ocorrer dentro de uma variedade de minerais do solo.

2.4.5 Aplicações da MICCP em amostras de grande tamanho e aplicações no campo

Em 2009, a técnica de *biogrouting* foi avaliada no laboratório para grandes volumes do solo, em colaboração entre o Departamento de Biotecnologia da *Delft University of Technology* e Deltares (Departamento de Geo-engenharia), na Holanda. O tamanho da amostra de areia aumentou inicialmente a um volume de 1m³ (microescala) e posteriormente até um volume de 100 m³ (macroescala).

No volume de 1 m³, foi precipitado, de maneira heterogênea, cerca de 100 kg/m³ de CaCO₃ (Figura 2-23), com uma resistência à compressão não confinada variável entre zero (areia fofa) até 9 MPa, razoavelmente correlacionados com o conteúdo de CaCO₃, para uma eficiência de 50% do processo.



a) Corpo de areia biocimentado, volume de 1 m³.



b) Superfície do corpo de areia biocimentado. Cume com alto conteúdo de carbonato visível na esquerda.

Figura 2-23. Avaliação da MICCP em volumes de 1 m³ (Van Paassen *et al.*, 2009).

Para o dimensionamento da amostra de 100 m³, uma caixa de concreto de 8 x 5,6 x 2,5 m, foi preenchida com areia (Figura 2-24a), e o tratamento com *biogrout*, consistiu na injeção da solução bacteriana e reagentes de cimentação sequencialmente, através de três poços de injeção, viajando uma distância horizontal de 5 m dentro do corpo de areia, até três poços de extração. Depois de 12 dias do tratamento, 40 m³ do corpo de areia foram visivelmente cimentados com uma concentração de carbonatos, relativamente homogênea ao longo das linhas de fluxo (Figura 2-24b), mas, com variações significativas na direção perpendicular ao fluxo. Amostras cimentadas tiveram resistência à compressão não confinada variando de zero (areia fofa) até 12 MPa.



Figura 2-24. *Biogrout* a corpo de areia de 100 m³. (a) Caixa de concreto com areia, 3 poços de injeção à esquerda e 3 poços de extração à direita. (b) corpo de areia biocimentado, com padrões de cimentação seguindo as linhas de fluxo. (Van Paassen, 2009).

Van Paassen *et al.* (2009), concluíram que a heterogeneidade na precipitação de carbonato de cálcio e as propriedades mecânicas do solo após o tratamento, podem ser atribuídas à dificuldade em obter uma distribuição homogênea das bactérias e de sua atividade no tempo e no espaço, o que depende de muitos fatores: distribuição do tamanho de partícula, a mineralogia do solo, as propriedades do fluido, as propriedades da bactéria e a quantidade de reagentes de cimentação e a forma de aplicação.

No verão de 2010, as companhias Volker Wessels e Deltares, em colaboração com *Delft University of Technology*, planejaram cuidadosamente dois ensaios de campo, no sul da Holanda, para a aplicação da MICCP por a técnica de *biogrouting*, como parte de um projeto de instalação do gasoduto, para o cliente Gasunie. Para a aplicação do *biogrouting*, poços de injeção, extração e monitoramento foram instalados nas proximidades da trajetória proposta do oleoduto (Figura 2-25).

Durante cada teste de campo, foram biotratados volumes de solo, de 1.000 m³ usando o procedimento de *biogrouting* a profundidades variáveis entre 3 - 20 m. O procedimento envolveu três etapas:

1) injeção de cerca de 200 m³ de suspensão bacteriana (diluída). A suspensão bacteriana foi cultivada por Fermensys S.A. France, de acordo com um procedimento similar a Whiffin *et al.* (2007).



Figura 2-25. Primeira aplicação do *biogROUT*. cimentação de cascalho para estabilidade de perfurações horizontais. No primeiro plano, 6 poços de injeção, cercados por 14 poços de extração, foram instalados em uma área de 24 por 4 m. (Van Paassen, 2011).

- 2) injeção de 300 a 600 m³ de solução de cimentação contendo ureia e cloreto de cálcio.
- 3) extração de água subterrânea (contendo resíduos do processo), que foi oferecida a uma estação de tratamento de águas residuais.

Após o biotratamento, os HDDs (*Horizontal Directional Drilling*), foram executados e os gasodutos foram instalados com sucesso.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para atender os objetivos da pesquisa, foi desenvolvida a seguinte metodologia:

- i) Caracterização dos materiais utilizados na pesquisa
- ii) Bioensaios preliminares de triagem
- iii) Bioensaios de solos – ao nível de Erlenmeyer
- iv) Biocimentação de solos: colunas cilíndricas de solo

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

3.1.1 Microrganismos

Para atender um dos objetivos desta pesquisa, foram selecionados microrganismos com capacidade de calcificação comprovada e reportada na literatura. Estes microrganismos foram adquiridos na Coleção Alemã de Microrganismos e Cultura de Células (DSMZ) e são pertencentes à coleção do Laboratório de Biomineralogia e Biohidrometalurgia da Universidade Nacional da Colômbia. No total, foram treze (13) microrganismos, utilizados na fase inicial de triagem da pesquisa, os quais, são apresentados na Tabela 3-1, com seu gênero, espécie, nomenclatura DSMZ e informação sobre a enzima uréase.

Tabela 3-1. Bactérias com capacidade de calcificação utilizadas na pesquisa.

No	Gênero	Espécie	Nomenclatura DSMZ	Uréase (+/-)	Morfologia
1	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	DSM-32	+	bacilo
2	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus halodurans</i>	DSM-497	-	bacilo
3	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus pseudofirmus</i>	DSM-8715	-	bacilo
4	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cohnii</i>	DSM-6307	+	bacilo
5	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus lentus</i>	DSM-9	+	bacilo
6	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	DSM-6397	-	bacilo
7	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	DSM-766	-	bacilo
8	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	DSM-20306	+	bacilo
9	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	DSM-28	+	bacilo
10	<i>Sporosarcina</i>	<i>Sporosarcina ureae</i>	DSM-320	+	coco
11		<i>Sporosarcina pasteurii</i>	DSM-276	+	bacilo
12	<i>Sporosarcina</i>	<i>Sporosarcina pasteurii</i>	DSM-323	+	bacilo
13		<i>Sporosarcina pasteurii</i>	DSM-33	+	bacilo

Nota: + bactérias uréase positiva, - bactérias uréase negativa

As bactérias utilizadas dos gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lysinibacillus* e *Sporosarcina*, são formadoras de esporos, aeróbias (anaeróbias facultativas) e com risco de patogenicidade baixo (1), segundo a TRBA 466-Classificação dos procariontes em grupos de risco (*Technical Rules for Biological Agents*).

3.1.2 Minerais e solos utilizados

Para o desenvolvimento da pesquisa, foram selecionados três minerais considerados comuns nos perfis de intemperismo dos solos tropicais: quartzo, como mineral primário, e caulinita e montmorilonita, como minerais secundários.

A fim de assegurar o uso de materiais (solos) compostos com uma elevada proporção destes minerais, foram utilizados uma areia de sílica, um caulim e uma bentonita (Figura 3-1).

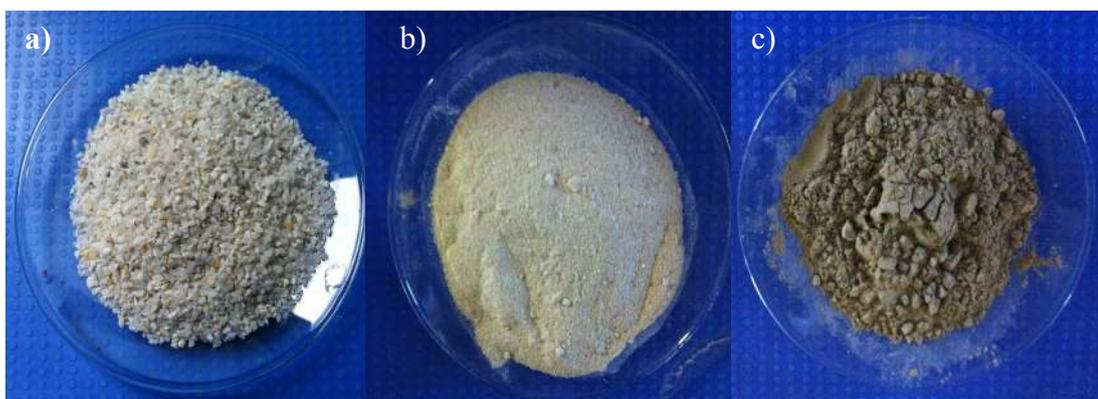


Figura 3-1. Solos utilizados na pesquisa: (a) areia, (b) caulim, (c) bentonita.

A areia de sílica utilizada nesta pesquisa foi adquirida através da companhia Antioqueña de Arenas SAS da Colômbia, e foi referenciada como areia de Yarumal.

O caulim utilizado é um caulim residual, fornecido pela mineradora colombiana SUMICOL SAS, e proveniente das minas de extração de caulim localizadas na municipalidade de La Unión, na sub-região leste do departamento de Antioquia (Colômbia).

A bentonita utilizada nesta pesquisa é uma bentonita comercial, fornecida pela companhia Protokimica S.A.S, da cidade de Medellín (Colômbia).

3.1.3 Caracterização dos solos

A caracterização inicial dos solos (areia, caulim e bentonita) foi feita, pela determinação de algumas propriedades físicas, químicas e mineralógicas dos solos. Todos os ensaios executados neste estágio da pesquisa foram realizados na Universidade Nacional da Colômbia (UNAL), nos laboratórios de Biomineralogia e Biohidrometalurgia (LBB) e no Laboratório de solos.

3.1.3.1 Caracterização física

A caracterização física inicial dos três solos (areia, caulim e bentonita) consistiu na determinação do teor de umidade -w- (NBR 6457/2016), densidade relativa dos sólidos - D_R - (ASTM D854-14), a distribuição de tamanho de partículas e limites de consistência, w_L e w_P (limites de Atterberg). A partir destes resultados, o solos podem ser classificados de acordo com o S.U.C.S- Sistema Unificado de Classificação de Solos (ASTM D2487-17).

Todos os ensaios foram realizados para amostras de solo secas ao ar. A análise granulométrica foi realizada mediante granulometria por peneirado e para as amostras de caulim e bentonita foi complementada com uma análise por sedimentação. O ensaio por sedimentação se baseia na norma NBR 7181/2016, cujo princípio é a dispersão das partículas com uso de defloculante (hexametáfosfato de sódio), agindo durante 24 horas. Os limites de consistência determinados foram o limite de liquidez – w_L - (NBR 6459/2016) e o limite de plasticidade – w_P - (NBR 7180/2016).

3.1.3.2 Caracterização química

Para definir as características químicas dos solos consideradas mais relevantes para o estudo, foram realizadas análises de potencial de hidrogênio - pH e determinação dos cátions cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), sódio (Na^+) e potássio (K^+), e a partir deles foi calculado o teor dos cátions trocáveis.

As medições do pH do solo, foram efetuadas em amostras de solo seco ao ar, e foram feitas medições de pH na água e em solução de cloreto de potássio (KCl 1M). O pH dos solos é medido em KCl, para evitar variações nas medidas por efeito da diluição e efeito da concentração de sais. O efeito da diluição na relação solo:solução é o de aumento do pH (maior diluição, maior o pH), e a presença de sais neutros diminui o pH da

suspensão. (*U.S. Department of Agriculture*, 2004). Ambas medições de pH foram feitas numa relação 1:5 m/v (massa de solo:volume da água ou solução, conforme o caso).

Com os valores medidos do pH em água (pH_{H_2O}) e pH em KCl (pH_{KCl}), se calcula o delta pH (ΔpH), ou seja, a diferença entre o pH_{KCl} e o pH_{H_2O} . Em solos não salinos o delta pH é indicativo de:

- i) predomínio de cargas positivas ($\Delta pH > 0$)
- ii) carga neutra ($\Delta pH = 0$)
- iii) predomínio de cargas negativas ($\Delta pH < 0$)

Em solos salinos e/ou com $pH > 7$, se o pH_{KCl} é semelhante no pH_{H_2O} isso é indicativo de que o solo está saturado por bases (*U.S. Department of Agriculture*, 2004).

Também foi calculada uma estimativa do ponto de carga zero (PCZ), utilizando-se a Equação 3-1 (Keng e Uehara, 1974, citados por Camapum de Carvalho *et al.*, 2015):

$$PCZ = 2 pH_{KCl} - pH_{H_2O} \quad (\text{Equação 3-1})$$

Para realizar as medidas de pH foi empregado um medidor multi-parâmetro marca HACH (HQ30d) acoplado a um eletrodo de pH de Ag/AgCl (PHC101) sendo adotadas as Normas Técnicas Colombiana (NTC) 5264 e ASTM D-4972-01.

Os cátions trocáveis Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ e K^+ , foram determinados mediante a extração dos cátions pelo método de saturação com acetato de amônio 1N a pH 7 e sua quantificação foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica (NTC 5369). O equipamento utilizado foi um Perkin Elmer modelo AAnalyst 400 AA.

3.1.3.3 Caracterização mineralógica

A fim de definir os minerais presentes nos solos utilizados, areia, caulim e bentonita, estes foram caracterizados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), no LBB da UNAL. Para as análises, foram tomadas amostras representativas de cada solo, secadas ao ar, moídas manualmente em morteiro de ágata e passadas através da peneira N° 200 (0,074 mm).

As análises de FTIR foram feitas num equipamento marca Shimadzu 8400S, usando o método de transmissão, para o qual foram preparadas pastilhas de KBr, utilizando 1 mg de amostra e 100 mg de KBr, prensadas a 10 t. Nas análises foram utilizados um intervalo de número de onda entre 400 e 4000 cm^{-1} e 48 varreduras. Os espectros foram interpretados com o software Shimadzu IRsolution 1,3.

3.2 BIOENSAIOS PRELIMINARES DE TRIAGEM

Nos bioensaios preliminares de triagem, as treze cepas comerciais selecionadas a partir da revisão da literatura, foram avaliadas na sua capacidade de precipitar carbonatos de cálcio e foram escolhidas as de melhor desempenho para se utilizar nos estágios seguintes da pesquisa.

Neste estágio, foram usadas treze (13) cepas comerciais, nove (9) uréase positiva e quatro (4) uréase negativa. Os bioensaios de triagem foram feitos em meio líquido, sem e com substrato mineral, utilizando unicamente a areia de quartzo como substrato mineral.

3.2.1 Cultura dos microrganismos

O meio de cultura utilizado foi o meio LB (Luria Bertani), composto de: 5 g/l de cloreto de sódio (NaCl), 5 g/l de extrato de levedura e 10 g/l de peptona de caseína, adicionado com ureia, numa concentração de 20g/l. O meio LB foi esterilizado em autoclave (temperatura de 125°C e pressão entre 17 e 19 psi) e a ureia foi filtrada num filtro com membrana de celulose com tamanho de poro de 0,2 μm , e depois ambos (LB e ureia) foram misturados. Os microrganismos foram incubados no meio de cultura a uma temperatura de 30°C, sob agitação em agitador orbital a 140 \pm 5 rpm, durante 24 h, até atingir uma concentração celular de 10⁸ cel/ml. A contagem de células (cel/ml) foi feita com câmara de Neubauer (Celoromics), usando um microscópio em fase de contraste marca Olympus modelo CX31RTSF.

3.2.2 Bioensaio para triagem de cepas em meio líquido (sem e com substrato mineral)

Foram feitos bioensaios preliminares no intuito de fazer uma triagem, afim de escolher as cepas que apresentem o melhor comportamento quanto a precipitação de carbonato

de cálcio. Neste sentido, foram usados Erlenmeyer de 500 ml, com um inóculo de 20 ml (10% v/v) do microrganismo, com uma concentração celular de 10^8 cel/ml, num volume de 180 ml de um meio capaz de induzir a bioprecipitação de carbonatos de cálcio, para um volume de trabalho de 200 ml (Modificado de Van Paassen, 2009). Nos bioensaios com substrato mineral foi adicionado 10% em massa do mineral, neste caso 20 g de areia de quartzo.

O meio escolhido para facilitar a bioprecipitação do carbonato de cálcio, foi definido dependendo de se as bactérias eram uréase positiva ou uréase negativa. Para as bactérias uréase positiva, foi utilizado o meio proposto por Van Paassen (2009), meio VP:

- 20 g/l de extrato de levedura.
- 10 g/l de cloreto de amônio (NH_4Cl)
- 10 μM de cloreto de níquel (NiCl_2).

O meio VP foi adicionado à solução de cimentação de ureia/cálcio numa proporção 1:1 (v/v), especificamente uma solução 0,25M de ureia e cloreto de cálcio (CaCl_2), como fonte de cálcio.

Os componentes do meio VP foram misturados, seu pH foi elevado acima de 8 por adição de hidróxido de sódio (NaOH 4 M) e depois foram esterilizados em autoclave. Para a solução de cimentação, o cloreto de cálcio foi autoclavado, mas a ureia foi filtrada num filtro de membrana de celulose com 0,2 μm de tamanho de poro, já que esta não pode ser esterilizada por aquecimento devido a que começa a desdobrar-se com o calor (Whiffin, 2004). Depois da esterilização, o meio VP e a solução de cimentação foram misturados.

A Tabela 3-2 mostra um resumo dos meios utilizados para as cepas uréase positiva nesta fase da pesquisa.

Tabela 3-2. Composição química dos meios usados para as cepas uréase positiva nos bioensaios de triagem (Modificado de Van Paassen, 2009).

Meio	Composto	Concentração
Cultura a 140 rpm:		
LB + ureia	Cloreto de sódio	5 g/l
	Extrato de levedura	5 g/l
	Peptona de caseína	10 g/l
	Ureia	20 g/l

Meio	Composto	Concentração
Bioensaio a 100 rpm:	Extrato de levedura	20 g/l
Meio base: VP	Cloreto de amônio	10 g/l
	Cloreto de níquel	10 µM
Fonte de energia	Ureia	0,25 M
Fonte de cálcio	Cloreto de cálcio	0,25 M

Para as bactérias uréase negativa, foi usado o meio LB adicionado com 2,5 g/l de acetato de cálcio como fonte de cálcio. Os componentes do meio LB e o acetato de cálcio foram misturados, elevando o pH acima de 8 por adição de NaOH 4M e depois foram esterilizados em autoclave (Modificado de García *et al.*, 2016).

Na Tabela 3-3 observa-se um resumo dos meios utilizados para as cepas uréase negativa nesta fase da pesquisa.

Tabela 3-3. Composição química dos meios usados para as cepas uréase negativa nos bioensaios de triagem (Modificado de García *et al.*, 2016).

Meio	Composto	Concentração
Cultura a 140 rpm:		
LB + ureia	Cloreto de sódio	5 g/l
	Extrato de levedura	5 g/l
	Peptona de caseína	10 g/l
	Ureia	20 g/l
Bioensaio a 100 rpm:		
Meio base: LB	Cloreto de sódio	5 g/l
	Extrato de levedura	5 g/l
	Peptona de caseína	10 g/l
Fonte de cálcio	Acetato de cálcio	2,5 g/l

A duração dos bioensaios foi de 15 dias, de forma aeróbica, a uma temperatura de 30°C, sob agitação em agitador orbital a 100 rpm. Esta menor velocidade de agitação, foi escolhida a fim de evitar ou reduzir o atrito entre o mineral e as bactérias. As condições gerais dos bioensaios preliminares são apresentadas na Tabela 3-4.

Tabela 3-4. Condições gerais dos bioensaios de triagem em meio líquido com e sem mineral.

Variáveis do bioensaio	Valor
Volume de trabalho	200 ml
Volume do inóculo	10% (v/v) do meio líquido: 20 ml
Concentração do inóculo	10 ⁸ cel/ml
Volume do substrato mineral	10% (massa/volume): 20 g

Variáveis do bioensaio	Valor
Substrato mineral	Quartzo (areia de Yarumal)
Velocidade de agitação	100 rpm
Temperatura	30 ° C
Duração do experimento	15 dias
Parâmetros medidos a cada 3 dias	pH e biomassa

Adicionalmente foram feitos quatro controles negativos (abióticos), com o meio de cultura em condições de esterilidade: dois controles para o meio dos microrganismos uréase positiva (com e sem substrato mineral) e dois controles para o meio dos microrganismos uréase negativa (com e sem substrato mineral).

Para uma melhor compreensão, a Figura 3-2 mostra um esquema dos bioensaios preliminares de triagem.

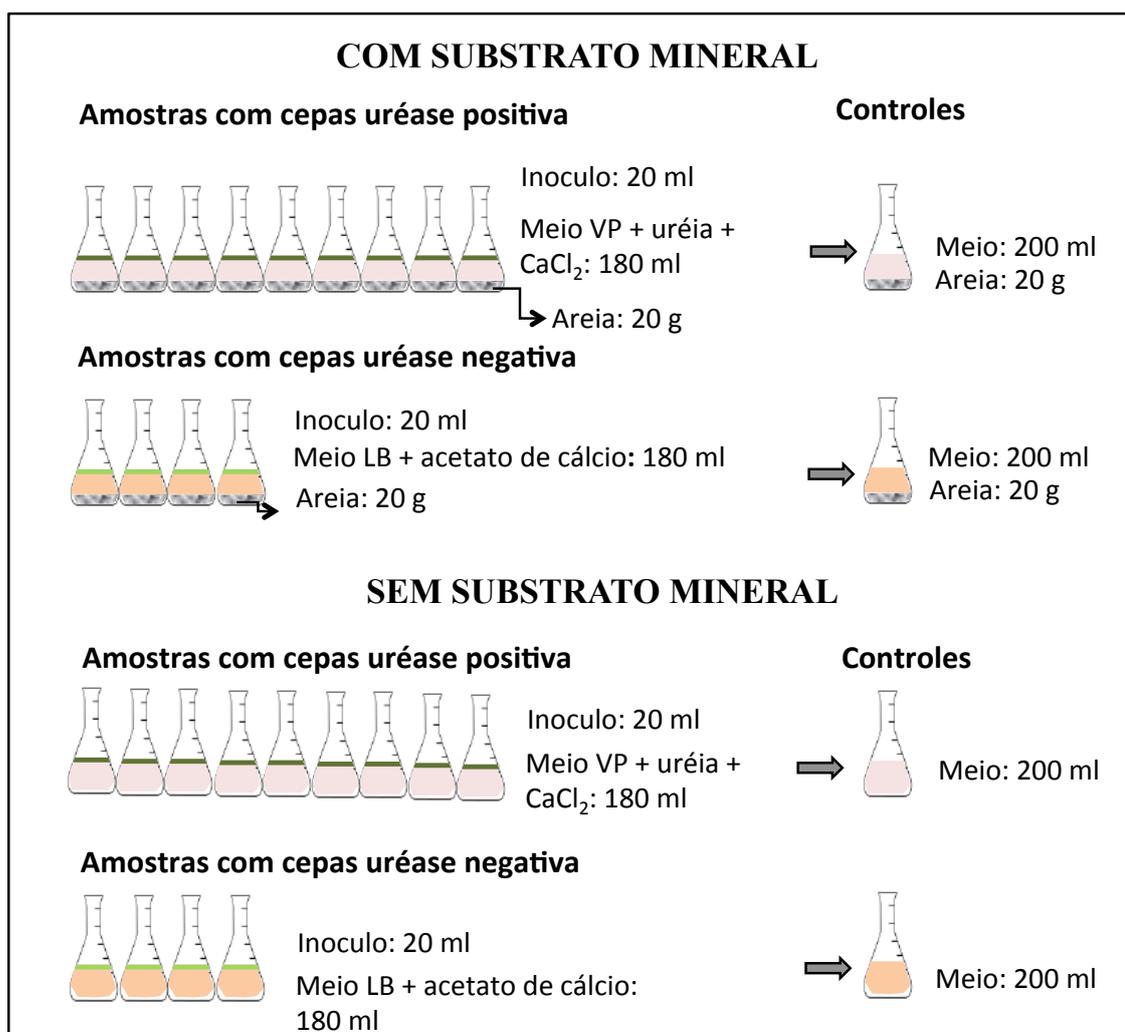


Figura 3-2. Esquema dos bioensaios preliminares de triagem.

Durante os 15 dias de execução dos bioensaios, foram retiradas do meio líquido, alíquotas de cinco (5) ml a cada três (3) dias, para fazer medições de pH e biomassa.

3.2.3 Verificação da bioprecipitação de carbonatos de cálcio

Foi feita a verificação da precipitação de carbonatos nos bioensaios sem e com mineral.

3.2.3.1 Bioensaios sem substrato mineral

Ao finalizar o bioensaio, foram separados o sólido precipitado (carbonatos), utilizando centrifugação a 3000 rpm, durante 10 min. Os carbonatos separados do sobrenadante foram lavados em água destilada e novamente centrifugados e posteriormente secados ao ar durante cinco (5) dias (Modificado de García *et al.*, 2016). Finalmente, os sólidos precipitados foram pesados para quantificar a produção para cada cepa bacteriana. A fim de identificar o polimorfo específico de carbonato de cálcio precipitado, estes foram analisados por FTIR, nas condições descritas anteriormente.

3.2.3.2 Bioensaio com areia de quartzo como substrato mineral

Depois dos 15 dias do bioensaio, a areia utilizada como substrato mineral para as treze cepas e controles, foi lavada com água destilada e secada ao ar durante cinco (5) dias. Após, foi selecionada, pelo método do quarteamento, uma amostra representativa, a qual foi moída em almofariz de ágata e peneirada considerando o passante na peneira de malha #200, para fazer a análise por FTIR de modo a verificar a precipitação de CaCO_3 .

3.2.4 Seleção dos microrganismos para os estágios de Bioensaios de solos ao nível de Erlenmeyer e Biocimentação de solos

Finalmente, a partir das análises do comportamento do pH, da quantificação do carbonato precipitado e da obtenção dos resultados das análises mineralógicas por FTIR, foram escolhidas as três (3) melhores cepas bacterianas, de acordo com a sua capacidade de bioprecipitação de carbonatos, para sua utilização na fase experimental de bioensaios de solos e biocimentação de solos.

3.3 BIOENSAIOS DE SOLOS - nível de Erlenmeyer (solos em suspensão)

A fim de avaliar a produção de carbonato de cálcio das melhores cepas bacterianas, em substratos minerais diferentes, e determinar a influência da mineralogia do substrato na

MICCP, foram realizados bioensaios de solos, usando Erlenmeyer de 500 ml. Nestes bioensaios os solos estiveram em suspensão e num sistema de agitação, no intuito de eliminar a influência de variáveis físicas como a porosidade e a densidade, e privilegiar a informação de caráter químico da interação bactéria-mineral. Neste sentido, os solos foram submetidos ao tratamento microbiológico, numa suspensão 10% solo - 90% meio líquido (massa/volume), durante 15 dias.

Para este estágio foram utilizados os três solos: areia de quartzo, caulim e bentonita, como substratos minerais representativos do quartzo, da caulinita e da montmorilonita, respectivamente, e o inóculo utilizado, corresponde às cepas bacterianas escolhidas dos bioensaios preliminares de triagem.

3.3.1 Reativação e cultura dos microrganismos

Os três microrganismos escolhidos foram removidos do congelador a -20°C e reativados. A reativação foi feita em tubos de ensaio com meio LB complementado com ureia (20 g/l), a uma temperatura de 30°C , sob agitação em agitador orbital a 140 rpm, durante 24 h. Depois da reativação, um inóculo do microrganismo foi semeado em meio sólido LB ágar, complementado com ureia, incubado a 30°C de temperatura durante 48 h, até observar as colônias bem definidas. Finalmente, uma unidade de formação de colônia (UFC) de cada microrganismo foi cultivada no meio VP a uma temperatura de 30°C , sob agitação em agitador orbital a 140 rpm, aproximadamente durante 24 h, até atingir uma concentração bacteriana de 10^8 cel/ml.

3.3.2 Bioensaios de solos

Depois da reativação e cultura dos microrganismos até atingir a concentração desejada, foram feitos bioensaios de solos para a MICCP. O método empregado na experimentação foi:

- i) A colocação de uma amostra de 20 g representativa de cada mineral num Erlenmeyer de 500 ml. O mineral foi previamente esterilizado em autoclave.
- ii) A adição de 180 ml de um meio capaz de induzir a bioprecipitação de carbonatos de cálcio. O meio para induzir a bioprecipitação do carbonato de cálcio, foi definido em função de serem as bactérias foram uréase positiva ou uréase negativa, usando a metodologia descrita em 3.2.2, com a única diferença

que o pH do meio foi controlado para iniciar acima de 8, depois de adicionar o meio ao substrato mineral (Modificado de Van Paassen, 2009).

- iii) A adição de um inóculo de 20 ml do microrganismo, para um volume líquido total de 200 ml, para uma proporção final do mineral de 10% (massa/volume) do meio líquido.

A experimentação foi desenvolvida a uma temperatura de 30°C, sob agitação em agitador orbital a 100 rpm, durante 15 dias.

Os bioensaios de solos foram realizados em duplicado (replicas-R-) a fim de avaliar a representatividade estatística dos resultados. Além disto, foram feitos controles negativos (abióticos), usando 20 g do substrato mineral e 200 ml do meio capaz de induzir a bioprecipitação de carbonatos de cálcio, sem microrganismos, e controles positivos, com 20 ml do inóculo e 180 ml do meio de bioprecipitação, sem substrato mineral.

Em resumo, os bioensaios de solos realizados foram: três solos por três microrganismos, totalizando nove (9) amostras e nove (9) replicas (R), três (3) controles negativos (areia, caulim e bentonita sem microrganismos) e três (3) controles positivos (as três cepas sem mineral), como mostra a Figura 3-3.

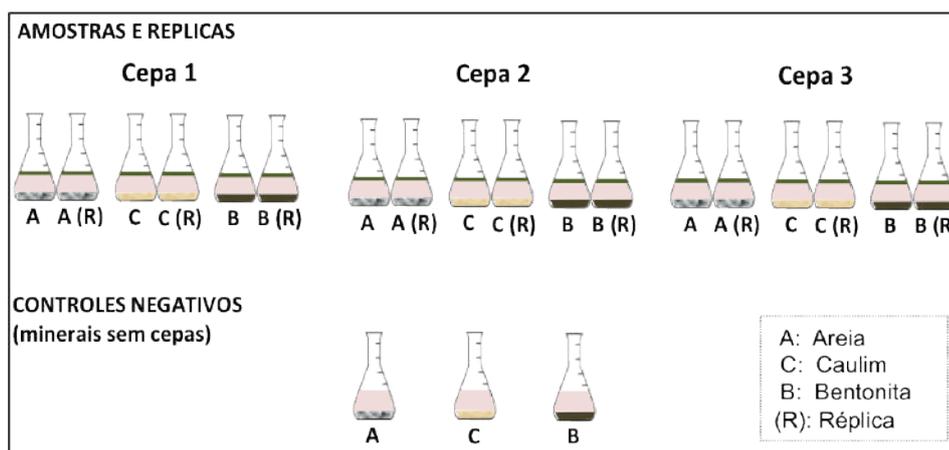


Figura 3-3. Esquema dos bioensaios de solos.

3.3.3 Acompanhamento da atividade bacteriana durante a MICCP em solos

Durante os 15 dias de execução da experimentação, periodicamente foram extraídas alíquotas de dez (10) ml do meio líquido em tubos Falcon de 45 ml de capacidade, para

fazer o acompanhamento da atividade bacteriana: as amostragens foram tomadas à duas horas do início da experimentação (2h), no dia 1, no dia 3 e depois a cada três (3) dias até completar quinze (15) dias.

O monitoramento consistiu em medições de pH, oxigênio dissolvido e cálcio disponível no meio líquido. O pH e oxigênio dissolvido foram medidos em todas as amostras (incluindo as réplicas) e controles positivos e negativos; o cálcio disponível foi medido nas amostras (incluindo as réplicas) e controles negativos.

As medições de pH e oxigênio dissolvido foram feitas num equipamento multiparâmetro HACH HQ30d, acoplado com eletrodos de pH (PHC101) e oxigênio dissolvido luminescente (HACH-LDO10101).

O monitoramento da concentração do cálcio disponível no meio líquido foi feito no intuito de definir: (i) a quantidade de cálcio que foi utilizada pelos microrganismos para a bioprecipitação, que é uma medida indireta da quantidade de CaCO_3 precipitado no substrato mineral, (ii) o tempo no qual o cálcio é consumido pelos microrganismos, que é indicativo do momento onde termina o processo de bioprecipitação.

As medições de cálcio foram feitas por Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP - MS). Os ensaios foram feitos no Laboratório de solos da Faculdade de Agronomia da UNAL, num espectrômetro de massas marca Agilent 4100, com fonte de excitação por plasma de micro-ondas e comprimento de onda de 750 nm. A partir do cálcio disponível na solução é calculado o carbonato de cálcio precipitado utilizando cálculos estequiométricos.

3.3.4 Caracterização mineralógica do precipitado nos controles positivos

Nos controles positivos, que correspondem às experimentações com microrganismos, sem substrato mineral, o precipitado obtido foi separado do meio líquido, utilizando centrifugação a 3000 rpm, durante 10 min, e posteriormente foi lavado em água destilada e seco ao ar durante cinco (5) dias. Finalmente, a caracterização mineralógica do precipitado foi feita utilizando Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), a fim de confirmar a presença de CaCO_3 e definir o polimorfo específico. A caracterização mineralógica foi complementada mediante análises no Microscópio Eletrônico de Varredura com analisador de energia dispersiva de raios-X

(MEV/EDX), a fim de conhecer a morfologia do precipitado e a química mineral mediante as análises químicas quantitativas e mapas composicionais por EDX.

O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi o EVO MA 10 de Carl Zeiss do Laboratório de Biomateriais da Universidade Nacional da Colômbia (Figura 3-4), equipado com detector de deriva de silício de 10 mm da *Oxford instruments*, modelo *X-act*, e o software *INCA suite v.5.05* para o EDX.

As análises foram feitas utilizando voltagem entre 10 e 15 Kv, e o modo de observação de elétron secundário (SE) para fazer análises da morfologia das amostras e o modo de elétron retroespalhados (BSE) para análises químicas qualitativas. As amostras observadas no microscópio, foram preparadas em seções polidas do material biocimentado, que foram colados a um porta -amostra e posteriormente foi realizado o processo de metalização com ouro para permitir a condutividade elétrica.



Figura 3-4. Microscópio Eletrônico de Varredura do Laboratório de Biomateriais, da UNAL.

3.3.5 Caracterização mineralógica dos solos após tratamento

Os diferentes solos tratados (areia, caulim e bentonita), incluindo os solos dos controles negativos, foram lavados com água destilada e secados ao ar durante 10 dias.

Para o monitoramento da formação de novos minerais (carbonatos) nos solos biocimentados, foram selecionados pelo método do quarteamento, amostras representativas, a fim de fazer a caracterização mineralógica, de modo a definir: (i) variações da mineralogia dos solos devido a MICCP, (ii) precipitação de CaCO_3 , (iii) o polimorfo específico de CaCO_3 gerado. Neste sentido foi utilizado FTIR e de modo a complementar, em algumas amostras, foram feitas análises no MEV/EDX, a fim de

conhecer a relação espacial dos carbonatos na matriz do solo e sua química mineral. As análises por FTIR e MEV/EDX foram feitas nos equipamento já descritos.

3.3.6 Quantificação dos carbonatos bioprecipitados

Das amostras dos solos submetidas ao tratamento microbiológico, que inicialmente foram lavadas e secas ao ar, foram selecionadas pelo método do quarteamento, amostras representativas para fazer a quantificação dos carbonatos de cálcio bioprecipitados, utilizando o método da perda da massa do solo por dissolução dos carbonatos com ácido clorídrico (HCl).

O Carbonato de cálcio é um mineral que reage com os ácidos e na reação com o HCl, libera cloreto de cálcio (CaCl₂), gás carbônico (CO₂) e água (H₂O) como descrito na Equação 3.2 (Gómez, 2013). O carbonato na amostra de solo é dissolvido.



O ensaio consistiu na secagem em forno da amostra de solo representativa, até atingir uma massa constante, depois 1 g da amostra foi lixiviado com ácido clorídrico (HCl) numa concentração 1M (agindo durante 24 h e a 25°C de temperatura) e finalmente, o solo foi lavado, secado e pesado novamente. A quantidade de CaCO₃ foi registrada como a diferença de massa da amostra de solo, antes e depois de lavado com HCl. Para cada amostra de solo biotratado (areia, caulim e bentonita), o ensaio com HCl foi feito por triplicado (Modificado de Lee *et al.*, 2013).

3.4 BIOCIMENTAÇÃO DE SOLOS- nível de colunas cilíndricas de solos

A fim de verificar a cimentação de solos utilizando a MICCP em amostras de solos de maior tamanho, diferentes misturas de solos foram biotratadas, formando corpos de prova dentro de moldes cilíndricos em acrílico.

3.4.1 Solos e microrganismos utilizados

Num primeiro estágio, foram utilizadas três amostras:

- Amostra 1: 90% de solo de grão grosso (areia de quartzo) e 10% de solo de grão fino (caulim) (Q-C10%).

- Amostra 2: 90% de solo de grão grosso (areia de quartzo) e 10% de solo de grão fino (bentonita)(Q-B10%).
- Amostra 3: 100% areia de quartzo (Q), de grão médio a grosso, sem finos (% passante na peneira 200 = 0,1%), com d_{10} de 0,9 mm.

As misturas de solos foram feitas em massa. Os microrganismos utilizados, foram as três cepas bacterianas de melhor desempenho para a bioprecipitação de carbonato de cálcio, escolhidas dos bioensaios preliminares de triagem: *S. pasteurii*, *B. cohnii* e *C. ammoniagenes*.

Num segundo estágio da biocimentação de solos, foram construídos corpos de prova com as misturas areia de quartzo-caulim e areia de quartzo-bentonita, mas, diminuído o conteúdo de finos como segue:

- Amostra 1: 98% de solo de grão grosso (areia de quartzo) e 2% de solo de grão fino (caulim) (Q-C2%).
- Amostra 2: 98% de solo de grão grosso (areia de quartzo) e 2% de solo de grão fino (bentonita) (Q-B2%).
- Amostra 3: 100% areia de quartzo de grão fino (Q_{fino}), correspondente à areia de Yarumal moída mecanicamente para obter partículas de tamanhos menores que 0,425 mm (peneira #40).

O propósito da mudança nas misturas do estágio 2, era avaliar a sensibilidade dos resultados devido à diminuição dos finos nas amostras 1 e 2 do estágio 1; e vislumbrar a influência do tamanho de partícula e do tamanho dos poros na amostra 3, quartzo de grão fino.

Neste segundo estágio, foi utilizada só uma cepa bacteriana, selecionada como a de melhor desempenho no estágio 1: *S. pasteurii*. O microrganismo utilizado para a biocimentação de solos neste nível, foi reativado da maneira descrita para os bioensaios de solos ao nível de Erlenmeyer.

Na Tabela 3-5, se apresentam os solos e dosagem utilizados no primeiro e segundo estágio dos ensaios de biocimentação de solos em moldes cilíndricos.

Tabela 3-5. Solos utilizados no primeiro e segundo estágio dos ensaios de biocimentação de colunas de solos.

Nomenclatura	Solos
Estágio 1:	
Q	100% areia de quartzo (% passa peneira 200 de 0,1%), d_{10} de 0,9 mm.
Q-C 10%	Mistura 90% areia de quartzo - 10% caulim
Q-B 10%	Mistura 90% areia de quartzo - 10% bentonita
Estágio 2:	
Q-C 2%	Mistura 98% areia de quartzo - 2% caulim
Q-B 2%	Mistura 98% areia de quartzo - 2% bentonita
Q _{fino}	100% areia de quartzo moída com tamanhos de partículas menores que 0,425 mm (peneira # 40)

3.4.2 Montagem nos moldes cilíndricos de acrílico

Para a elaboração de corpos de prova, foram fabricados moldes cilíndricos em acrílico, de 50 mm de diâmetro e 200 mm de comprimento. Estes moldes em acrílico foram feitos divididos ao meio para, ao final do tratamento, poder retirar apropriadamente a amostra minimizando o efeito de remoldagem (Modificado de Rowshanbakht *et al.*, 2016).

A coluna em acrílico foi posicionada verticalmente e o solo foi colocado dentro, por gravidade, a um peso específico seco de aproximadamente 12 kN/m^3 . A massa do solo, foi calculada para obter corpos de prova cilíndricos de 50 mm de diâmetro e 120 mm de comprimento.

A colocação dos solos foi feita diretamente no meio líquido dentro do molde, para evitar a formação de bolhas de ar. Nos dois extremos do volume de solo, foi colocado um filtro em areia grossa, de 1 cm de espessura (Modificado de Harkes *et al.*, 2010).

O biotratamento, ou seja, o inóculo e o meio para induzir a precipitação de carbonato de cálcio, foram subministrados por uma bomba peristáltica, com fluxo em sentido descendente (Modificado de Harkes *et al.*, 2010). A Figura 3-5 mostra a montagem projetado para a biocimentação de solos.

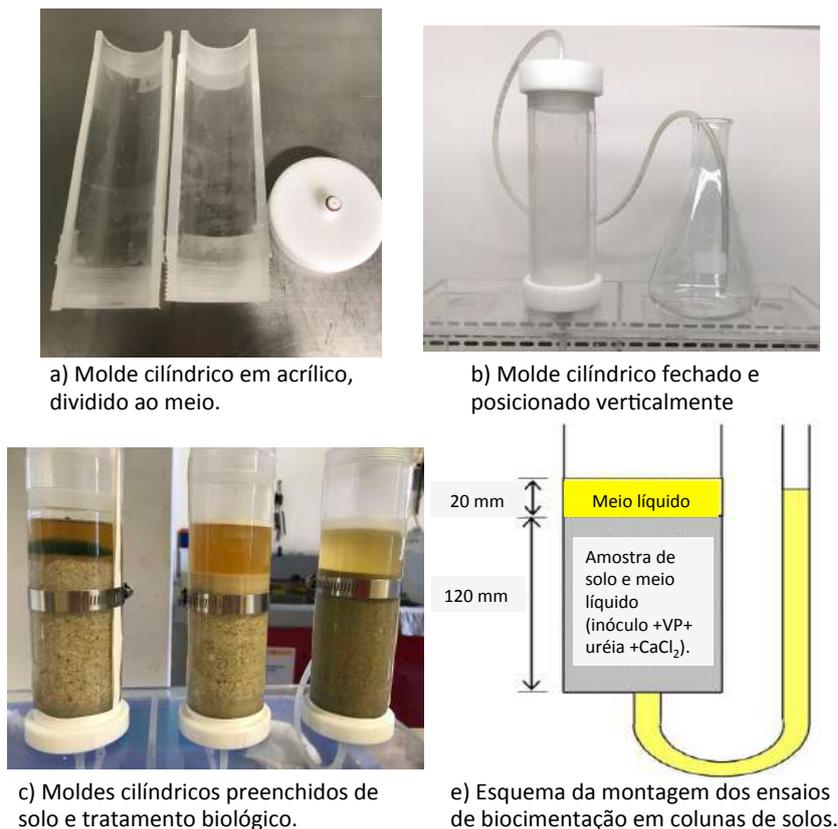


Figura 3-5. Montagem ensaios de biocimentação de solos. a) molde de acrílico dividido ao meio. b) molde fechado e colocado em posição vertical. c) Montagem dos solos nas colunas em acrílico. d) Esquema da montagem.

3.4.3 Biotratamento para a MICCP em colunas de solo

O tratamento microbiológico subministrado para cada amostra de solo, consistiu em 1,3 PV (1,3 do volume dos poros) de um meio líquido composto por:

- 10% de inóculo bacteriano (v/v): o inóculo bacteriano foi mantido em cultura durante 24 h, a 30°C e 140 rpm, até uma concentração de 10^8 cel/ml.

- 90% do meio para induzir a MICCP (v/v): composto pelo meio de cultura (VP) e a solução de cimentação numa relação 1:1 (v/v), com pH elevado até 8,5 por adição de hidróxido de sódio (NaOH 4 M). O meio de cultura VP esta composto por 20 g/l de extrato de levedura, 10 g/l de cloreto de amônio (NH_4Cl) e 10 μM de cloreto de níquel (NiCl_2) e a solução de cimentação está composta por uma solução 0,5 M de ureia/cloreto de cálcio (CaCl_2), numa proporção 1:1 (v/v) (Modificado de Van Paassen, 2009).

Todos os reagentes utilizados foram esterilizados no autoclave, a exceção da ureia que foi filtrada num filtro de membrana de celulose com 0,2 μm de tamanho de poro (Whiffin, 2004).

Usando 1,3 PV de meio líquido, a amostra de solo dentro do molde cilíndrico, fica submersa entorno de 2 cm abaixo do nível da solução.

No total, a cada amostra foram aplicados 4 tratamentos bacterianos, e cada um deles, foi permitido atuar sobre a amostra de solo durante 48 h. Ao finalizar as 48 h, o meio líquido foi drenado pela base do cilindro e substituído por um novo meio líquido.

Adicionalmente, foram feitas amostras de controle (abióticas), onde os solos previamente esterilizados foram submetidos ao tratamento com o meio de cultura VP e a solução de cimentação, sem inóculo bacteriano. A Tabela 3-6 mostra um resumo das condições dos ensaios de biocimentação de solos.

Tabela 3-6. Condições gerais ensaios de biocimentação de solos em colunas cilíndricas.

Variáveis	Valor
Volume do meio líquido	170 ml
Volume do inóculo	10% (v/v) do meio líquido: 17 ml
Concentração do inóculo	10^8 cel/ml
Volume do meio de cultura (VP)	76,5 ml
Volume da solução de cimentação (ureia/cloreto de cálcio 0,5 M)	76,5 ml
Massa do substrato mineral	Aproximadamente 280 g
Peso específico seco do substrato mineral (γ_d)	Aproximadamente 12 kN/m ³
Duração do tratamento	48 h
No de tratamentos	4

3.4.4 Caracterização do meio líquido drenado ao final de cada tratamento

Ao finalizar cada um dos tratamentos, o meio líquido drenado pela base das amostras foi coletado e foram feitas medidas de diversas variáveis: pH, oxigênio dissolvido, concentração celular, concentração de cálcio e concentração de amônio.

As medições de pH e oxigênio dissolvido foram feitas utilizando elétrodos de pH e oxigênio dissolvido luminescente.

A concentração celular (cel/ml) no meio líquido foi medida a fim de determinar indiretamente a biomassa aderida à matriz de solo depois de cada tratamento, toda vez que é conhecida a concentração celular inicial. Estas medições foram feitas em câmara de Neubauer e usando um microscópio em fase de contraste, com as características descritas anteriormente.

✓ *Medição de cálcio em solução:* a concentração de cálcio em solução (mg/l) foi medida a fim de determinar o cálcio que foi precipitado na matriz de solo.

O cálcio foi medido pelo método de titulação com EDTA, segundo o método descrito nos *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (3500-Ca B). Neste método, quando o EDTA é adicionado num meio líquido contendo cálcio e magnésio, o EDTA é aderido ao cálcio primeiro e quando o pH é muito alto, o magnésio é precipitado e o cálcio pode ser determinado diretamente, utilizando um indicador que faz com que a solução mude de cor quando todo o cálcio é complexado com o EDTA. A partir do cálcio disponível na solução é calculado o carbonato de cálcio precipitado.

Nestas medições foi utilizado como indicador o *Eriochrome Blue Black R*, que muda de cor do roxo ao azul. Toda vez que é medida a concentração de cálcio disponível no meio líquido drenado ao final do tratamento, e conhecido o cálcio fornecido ao início do tratamento (0,5 M), pode ser determinada a quantidade de cálcio precipitado na forma de carbonato de cálcio na matriz de solo.

✓ *Medição de amônio:* durante o processo da MICCP, o amônio (NH_4^+) é gerado devido a hidrólise da ureia. A concentração de amônio foi determinada a partir da medição do nitrogênio na forma de amônia (NH_3), medido utilizando o método do fenato descrito nos *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (4500-NH₃ F). Neste método, a amônia presente nas amostras, reage com o hipoclorito e o fenol, formando um composto de cor azul (indofenol), reação que é catalisada pelo nitroprussiato de sódio. 25 ml da amostra líquida é misturada com os reagentes, atuando durante 1 h para desenvolver a cor azul, e depois é lida num espectrofotômetro de luz ultravioleta (UV) a 640 nm.

A concentração de nitrogênio amoniacal (mg/l de $\text{NH}_3\text{-N}$) na amostra é determinada comparando a absorbância da amostra com a curva padrão. A curva padrão foi feita com leituras de absorbância de amostras com concentração de 0, 0,2, 0,4 e 0,6 mg/l de $\text{NH}_3\text{-N}$.

N. Para estas medições as amostras foram preservadas em congelador a -20°C e foram diluídas com água destilada, a fim de obter uma concentração inferior a $0,6 \text{ mg/l NH}_3\text{-N/}$. O espectrofotômetro utilizado foi um equipamento da *Thermo Electron Corporation*, modelo *GenesysTM 10* e o *software Visionlite v.2.1*, do LBB.

3.4.5 Caracterização dos solos depois do tratamento microbiológico

Depois do quarto tratamento microbiológico, as amostras de solos foram lavadas com água destilada e secas ao ar durante 7 dias. Toda vez que as amostras de solos estiveram secas, foram abertas as metades dos moldes em acrílico e foram tiradas as colunas de solos cimentadas e moldadas pela MICCP.

Os corpos de prova que foram corretamente biocimentados, mantendo a forma de colunas de solos e ficaram em estado indeformado, foram utilizados para ensaios de resistência e de susceptibilidade à erosão interna. Depois de finalizar estes ensaios, com as amostras já deformadas, foram feitos ensaios para determinar alguns parâmetros físicos como as análises granulométricas, parâmetros químicos como o pH e o teor de cátions trocáveis, caracterização mineralógica por análises de FTIR e MEV/EDX.

As amostras de solos que não ficaram suficientemente biocimentadas para formar corpos de prova cilíndricos e que ao serem removidas do molde ficaram deformadas, foram submetidas aos mesmos testes descritos, exceto aos ensaios de resistência e susceptibilidade à erosão interna.

3.4.5.1 Resistência à compressão simples

Nos corpos de prova indeformados que estiveram suficientemente biocimentados, cada um deles com diâmetro de 50 mm e altura mínima de 100 mm, foram executados ensaios de resistência à compressão simples, Os ensaios foram feitos segundo o procedimento descrito pela norma ASTM D 2166-06. A velocidade de aplicação da carga foi de 2,5 mm/min.

3.4.5.2 Susceptibilidade à erosão

Existem diversos ensaios para determinar a susceptibilidade à erosão de solos argilosos, entre eles, o ensaio de furo de agulha (*pinhole test*), o ensaio de torrão (*Crumb test*), e o

ensaio de desagregação (*slaking test*) descrito por Lima (2003) que avalia a estabilidade dos solos, independente da dispersão do material.

Segundo as normas padrão dos ensaios, estes métodos não são aplicáveis a solos com 12% ou menos de partículas menores que 0,005 mm, e índice plástico igual ou menor que 4 (ensaio de furo de agulha) ou 8 (ensaio do torrão). Porém, a fim de ter um indicativo da susceptibilidade a erosão dos solos biocimentados, foi executado o ensaio do torrão, em corpos de prova indeformados dos solos, segundo a norma ASTM D6572.

O ensaio do torrão foi realizado em corpos de prova cúbicos, de 15 mm – 20 mm de comprimento e consistiu em submergir o corpo de prova, durante 6 horas, em 200 ml de água destilada com pH de 6,6 e observar o comportamento ou reação do solo na água. Neste ensaio, o comportamento dispersivo dos solos, pode ser qualificado em quatro graus, desde não dispersivo (grau 1) até altamente dispersivo (grau 4), como apresenta a Figura 3-6.

Além disso, ao finalizar as 6 h do teste, o ensaio foi repetido, com uma variação no pH da água, adicionando ácido clorídrico até um pH de 4,5 (água ligeiramente ácida) e adotando-se tempo de observação de 48 h.

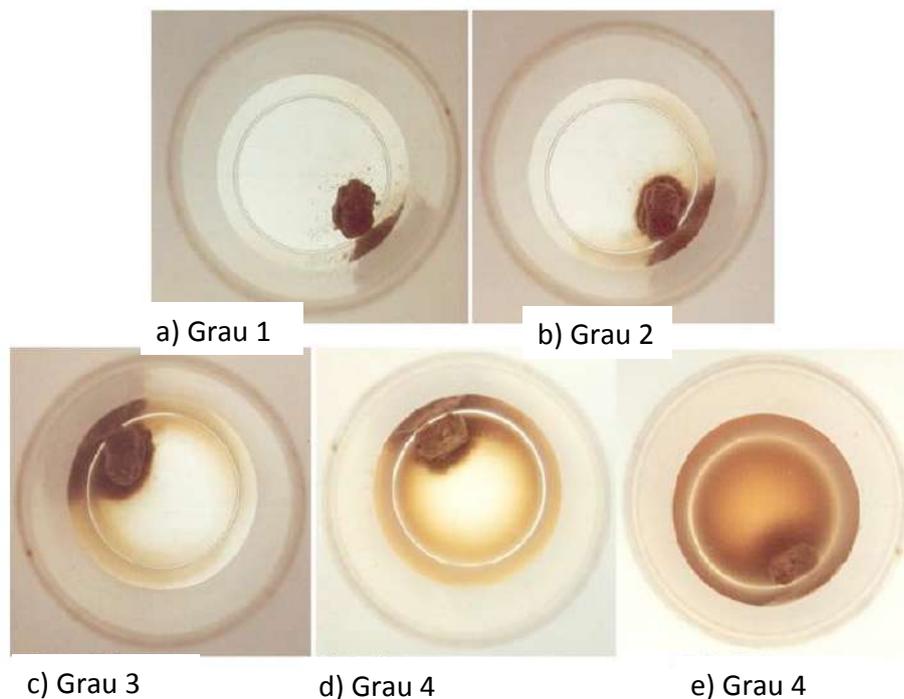


Figura 3-6. Graus de dispersão do solo no teste do torrão (ASTM D6572).

3.4.6 Ensaio de resistência à compressão triaxial

Finalmente, a fim de avaliar a resistência dos solos biocimentados nos moldes de acrílico, foram preparados quatro (4) corpos de prova nas mesmas condições, aplicando o tratamento microbiológico a um único solo (foi selecionada a areia de quartzo) e com um único microrganismo. Os corpos de prova foram utilizados para a execução do ensaio triaxial com adensamento isotrópico e cisalhamento sob condição não drenada.

O ensaio triaxial foi realizado em um equipamento semiautomático com sistema de controle das pressões projetado pelo *Controls Group* do Laboratório de solos, do Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid (PCJIC) (Figura 3-7).

O equipamento possui três sistemas de aplicações das pressões: por gravidade, com um cilindro ar/água e com um cilindro de óleo/água. As pressões são controladas manualmente e verificadas num manômetro digital marca *Controls*, de 1 kPa de precisão. O teste triaxial isotropicamente adensado – não drenado, foi realizado de acordo com as orientações fornecidas na norma ASTM D 4767 e teve três estágios principais: saturação por contrapressão, adensamento e cisalhamento.



Figura 3-7. Equipamento triaxial do Laboratório de solos, PCJIC.

✓ **Saturação da amostra utilizando contrapressão:** os corpos de prova foram saturados utilizando contrapressões controladas, em dois estágios, no primeiro estágio foi aplicada contrapressão por gravidade, durante 1 hora e posteriormente, no segundo estágio foi aplicada contrapressão com um cilindro de pressão ar/água (tipo Bladder), fabricado pela *Controls*. A Figura 3-8 mostra a montagem da amostra na câmara triaxial e os equipamentos para o estágio de saturação das amostras.

Durante o processo de saturação, a tensão de confinamento efetiva (pressão de câmara menos a contrapressão), foi mantida constante em 5 kPa. Periodicamente, para avaliar o progresso da saturação da amostra, foi utilizado o processo "*B-check*", ou verificação do valor do parâmetro B de Skempton, utilizando um transdutor de poro-pressão marca *Controls* (0-1000 kPa). Este processo foi executado repetidamente até que um valor B de 0,95 ou superior fosse alcançado. Durante este processo, a pressão da câmara e a contrapressão foram aumentadas conjuntamente, em pequenos incrementos, geralmente em torno de 10 kPa. O tempo aproximado da saturação das amostras foi em torno de 6 h.

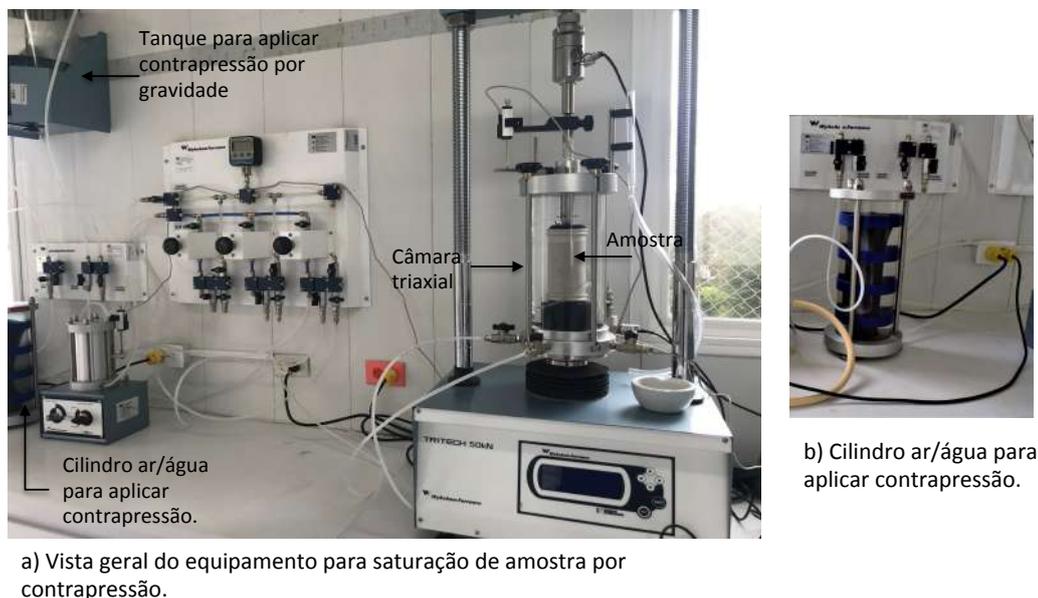


Figura 3-8. Montagem do equipamento triaxial no estágio da saturação das amostras por contrapressão.

✓ **Adensamento:** após finalizar a saturação das amostras por contrapressão, cada corpo de prova foi adensado isotropicamente e as pressões de confinamento efetivas utilizadas foram: 50, 100 e 200 kPa. Durante o adensamento, a pressão da câmara foi aumentada lentamente, usando pequenos incrementos de pressão (10 kPa/20 kPa)

aplicados gradualmente ao longo de 90 min, para minimizar a quebra das ligações que possam ter sido formadas na amostra durante o biotratamento. O processo de adensamento de cada amostra foi concluído em aproximadamente 3 h. A pressão de câmara foi aplicada manualmente utilizando o cilindro óleo/água e na condição de drenagem, foram medidas as mudanças de volume utilizando um medidor automático marca *Controls*, com capacidade de 100 cm³.

✓ **Cisalhamento:** após a conclusão do adensamento, cada corpo de prova foi submetido a compressão axial, no quadro de carregamento de 50 kN (TRITECH 50) marca *Controls*, utilizando deslocamentos controlados, aplicando uma velocidade de 0,3 mm/min (taxa de deformação de 2% por hora). O cisalhamento foi conduzido sob condições não drenadas (válvulas de drenagem fechadas), com medidas de poro-pressões tomadas ao longo do processo de cisalhamento.

O carregamento axial foi medido utilizando uma célula de carregamento (marca *Controls*, de 10 kN de capacidade) e o deslocamento axial foi medido utilizando um transdutor de deslocamento LVDT (*linear variable differential transformer*) de 25 mm de curso e foi utilizada uma unidade automática de aquisição de dados *Geodatalog* marca *Control* e o software *Datacom*. A Figura 3-9 mostra alguns dos equipamentos utilizados na etapa de cisalhamento por carregamento axial.



Figura 3-9. Equipamentos utilizado no ensaio triaxial, estágio de cisalhamento.

4. APRESENTAÇÃO E ANÁLISES DOS RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SOLOS

4.1.1 Caracterização física

As propriedades físicas determinadas para os solos selecionados para a pesquisa (areia, caulim e bentonita), foram o teor de umidade ($w\%$), densidade relativa dos sólidos (D_R), granulometria e limites de consistência. Os resultados da caracterização física são apresentados na Tabela 4-1.

Tabela 4-1. Propriedades físicas dos solos selecionados para a pesquisa.

Propriedade índice	Solo		
	Areia	Caulim	Bentonita
Teor de umidade, w (%)	0,0	1,0	10
Densidade relativa dos sólidos D_R	2,68	2,58	2,88
Limite de liquidez, w_L (%)	--	--	427
Limite de plasticidade, w_P (%)	NP	NP	52
Índice de plasticidade, I_P (%)	--	--	375
d_{10} (mm)	0,9	NA	NA
d_{30} (mm)	1,05	NA	NA
d_{60} (mm)	1,4	NA	NA
% de areia (USC: 4,75 - 0,075mm)	99,9	27,4	1,6
% finos, passa 0,075mm (peneira N° 200, ASTM)	0,1	72,6	98,4
Classificação SUSC	SP	ML	CH

Nota: $d_{10, 30, 60}$: diâmetro das partículas do 10%, 30%, 60% da amostra
SUSC: Sistema Unificado de Classificação de solos, ASTM D2487-17
ASTM: *American Society Test Material*

A caracterização física dos solos mostra que a areia de quartzo e o caulim não têm plasticidade, no entanto, a bentonita tem alta plasticidade, com IP de 375%, como era de se esperar.

As curvas granulométricas são apresentadas na Figura 4-1. Destas análises se estabelece que a percentagem de finos da areia é nulo (0,1%). Os valores de d_{60} 1,4 mm, d_{30} 1,05 mm e d_{10} 0,9 mm, valores que permitem determinar o coeficiente de não uniformidade, C_U de 1,6 e o coeficiente de curvatura, C_C de 0,87. A partir destes resultados, a areia de quartzo, é classificada pelos métodos convencionais como “areia mal graduada” (SP) segundo o SUSC.

De acordo com a norma ASTM D2487-17, uma areia pode ser classificada em: areia grossa com partículas entre 2 – 4,75 mm, areia média com partículas entre 0,42 – 2 mm e areia fina com partículas entre 0,075 – 0,42 mm. A areia de quartzo selecionada, tem 0,4% de partículas com tamanhos compreendidos entre 4,75 mm (peneira # 4) e 2 mm (peneira #10), 99,2% de partículas com tamanhos compreendidos entre 2 mm (peneira # 10) e 0,42 mm (peneira # 40) e 0,4% de partículas com tamanhos inferiores a 0,42 mm (peneira # 40) e superiores a 0,075 mm (peneira #200). Portanto, a areia de quartzo é classificada como areia de grão médio.

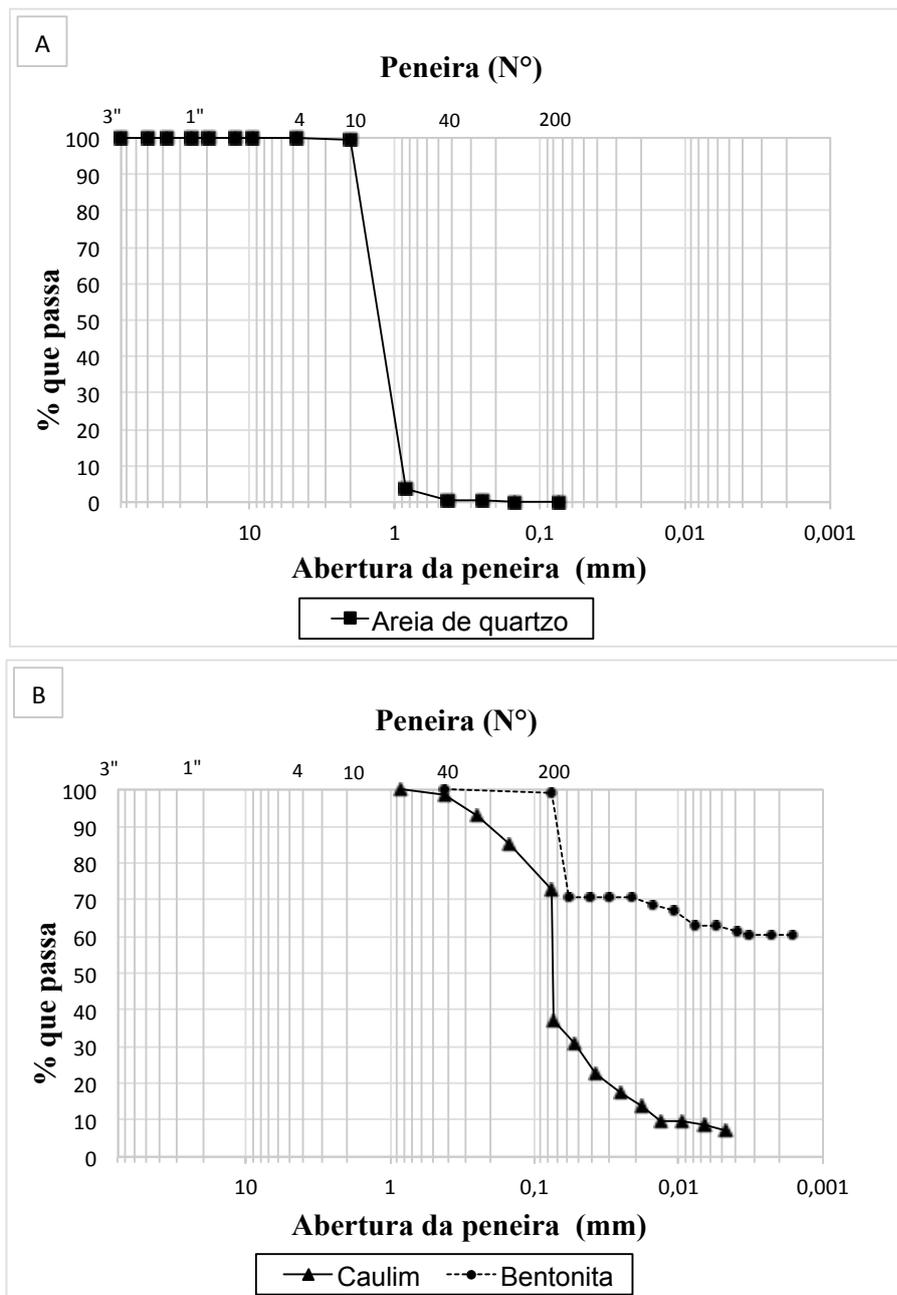


Figura 4-1. Curvas granulométricas dos solos: A) areia de quartzo. B) caulim e bentonita.

O caulim tem 27,4% de areias e 72,6% de finos (siltes e argilas) e por não ter plasticidade é classificado como “silte” (ML) de acordo com o SUSC. Segundo a análise por sedimentação, os finos no caulim correspondem principalmente a siltes (66%) e só 7% de argilas. A presença de argilominerais como a caulinita, faz com que os solos mostrem plasticidade, IP entre 25% a 40% (Mitchell, 1993), mas, na amostra de caulim utilizada na pesquisa, é possível que a característica de não-plasticidade seja devida à presença de outros minerais que não exprimem plasticidade com o quartzo.

A bentonita tem 1,6% de areias e 98,4% de finos, classificando como “argila de alta plasticidade” (CH) segundo o SUSC. Segundo a análise por sedimentação, os finos na bentonita correspondem principalmente a argilas (63%).

4.1.2 Caracterização química

O pH da areia, caulim e bentonita, foi medido em água e em KCl 1N, e a acidez dos solos (pH em KCl) foi classificada segundo as denominações do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, USDA (2017), como é mostrado na Tabela 4-2.

Tabela 4-2. Valores dos pH obtidos na areia, caulim e bentonita; classificação do pH em KCl segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (2017).

Solo	pH		Δ pH	PCZ	Denominação (do pH em KCl)
	pH (KCl)	pH (H ₂ O)			
Areia	8,2	8,5	-0,3	8,0	Moderadamente alcalino
Caulim	4,1	5,5	-1,4	2,7	Extremadamente ácido
Bentonita	8,4	10,5	-2,1	6,3	Moderadamente alcalino

De acordo com os valores do pH em KCl, o valor de pH mais alto é da bentonita, com um pH de 8,4, seguida pela areia de quartzo com um valor de pH de 8,2, ambos classificando como solos “moderadamente alcalinos”, e contrariamente o caulim tem pH “extremadamente ácido”, com valor de pH de 4,1.

Os valores de pH em água são maiores que os pH medidos em KCl, em 1,4 unidades no caulim e 2,1 unidades na bentonita, indicando variação de pH negativa (Δ pH < 0) e portanto, estes solos, caulim e bentonita, tem predomínio de carga negativa (USDA, 2017). Já, na areia de quartzo a variação de pH, embora negativa, foi só de 0,3 unidades (Δ pH aproximado a 0), indicando carga negativa a neutra na areia de quartzo.

O ponto de carga zero (PCZ) estimado na areia é de 8,0, valor muito alto em comparação com os valores reportados para o quartzo, PCZ entre 2 e 3 (Feldman *et al.*, 2008 citado por Camapum de Carvalho *et al.*, 2015). Da mesma forma, o PCZ estimado na bentonita foi de 6,3, maior ao reportado para a montmorillonita, PCZ de 2,5 (Camapum de Carvalho *et al.*, 2015). No caulim, o PCZ estimado é de 2,7.

“O PCZ representa o valor do pH, em que a carga elétrica líquida do conjunto das partículas é nula, ou seja, a carga total positiva é igual à carga total negativa” (Camapum de Carvalho *et al.*, 2015).

Os resultados da determinação das bases trocáveis: cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), sódio (Na^+) e potássio (K^+) são apresentados na Tabela 4-3. A soma dos cátions (CTC) corresponde à quantidade de cátions removíveis da amostra ou a quantidade de carga negativa por massa do material analisado (USDA, 2004).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4-3, observa-se que a areia tem pouca quantidade de cargas negativas ou cátions trocáveis (0,24 meq/100g), o que concorda com o resultado do ΔpH de -0,3, indicando uma carga negativa a neutra na amostra de areia.

Tabela 4-3. Teor dos cátions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ e K^+ ; e teor dos cátions trocáveis (removíveis) dos solos, em meq/100g de solo.

Solo	Ca^{2+} (meq/100g)	Mg^{2+} (meq/100g)	Na^+ (meq/100g)	K^+ (meq/100g)	Cátions trocáveis (meq/100g)
Areia	0,16	0,03	0,03	0,01	0,24
Caulim	0,34	0,11	0,05	0,05	0,50
Bentonita	19,0	18,25	15,30	0,41	37,7

Nota: 1 meq/100g (miliequivalente/100g da amostra = 1 cmol (+) /kg (centimol de cátion/kg da amostra)

O caulim, também apresentou pouca quantidade de cátions trocáveis (0,50 meq/100g) em relação à bentonita que apresentou 37,7 meq/100g. Segundo o *United States Department Of Agriculture* (2004), a capacidade de troca catiônica pode variar na caulinita de 2-16 meq/100g e na montmorilonita de 60-100 meq/100g. Outros autores relatam valores de 3-15 meq/100g na caulinita e na montmorilonita de 80-150 meq/100g (Mitchell, 1993). Estes valores estão bem acima daqueles apresentados nas

amostras de caulim e bentonita utilizadas na pesquisa, possivelmente pela mistura de minerais nos solos utilizados.

Levando em conta que a parede celular tem carga negativa (DeJong *et al.*, 2010), espera-se que as bactérias sejam aderidas com maior facilidade nos solos com carga positiva, neste caso e sob este ponto de vista, espera-se melhor aderência na areia de quartzo (carga neutra) em comparação com a caulinita e a bentonita que tem carga negativa. Por outro lado, o íon cálcio fornecido durante o tratamento, pode ser atraído à superfície da bactéria e agir como sítio de nucleação (Stocks-Fisher, *et al.*, 1999), porém, o Ca^{2+} também pode ser atraído às partículas de solo com carga negativa, neste caso na bentonita. Estes dois aspectos são importantes no processo de MICCP, durante a introdução das bactéria e na retenção das bactérias dentro da matriz do solo.

4.1.3 Caracterização mineralógica

Os espectros das análises por FTIR para a caracterização mineralógica dos solos, são apresentados nas Figura 4-2 e Figura 4-3.

A Figura 4-2, mostra os espectros de FTIR da areia (a) e do mineral de cor preta, presente na amostra da areia de quartzo que foi analisado individualmente (b).

As bandas de absorção revelam na areia a predominância de quartzo (Q), com suas bandas características em 460 cm^{-1} , 511 cm^{-1} , 693 cm^{-1} , 1082 cm^{-1} e 1167 cm^{-1} , e a banda dupla em 779 e 797 cm^{-1} , que faz a diferença com outros polimorfos de sílica (Dixon e Weed, 1989).

Adicionalmente, na areia observou-se um mineral de cor preta em pequenas quantidades, que foi separado usando pinças na lupa binocular e analisado por FTIR, revelando a presença de mica (m) (possivelmente biotita), com caulinita (K), quartzo (779 cm^{-1} e 795 cm^{-1}) e feldspatos (fd) (possivelmente albita) sobrepostos (Van der Marel e Beutelespacher, 1976).

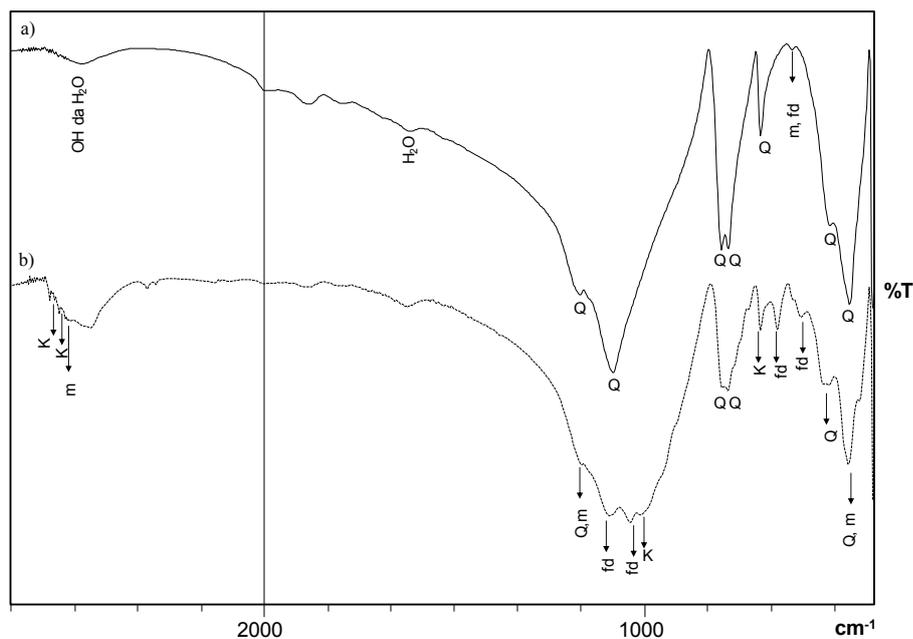


Figura 4-2. Espectros FTIR (a) areia de quartzo, (b) mineral de cor preta presente na amostra da areia de quartzo (analisado individualmente). Nota: Q: quartzo, K: caulinita, mica: m, fd: feldspatos.

No espectro do caulim (Figura 4-3-a) o FTIR indica a predominância de caulinita (K) (426 cm^{-1} , 469 cm^{-1} , 536 cm^{-1} , 694 cm^{-1} , 910 cm^{-1} , o double-te em 1005 cm^{-1} e 1032 cm^{-1} , 1113 cm^{-1} , 3620 cm^{-1} e 3696 cm^{-1}). Além disso o caulim possui quartzo (795 cm^{-1}) e possivelmente hidrargilita (gibbsita) pela banda em 3458 cm^{-1} (Van der Marel e Beutelespacher, 1976).

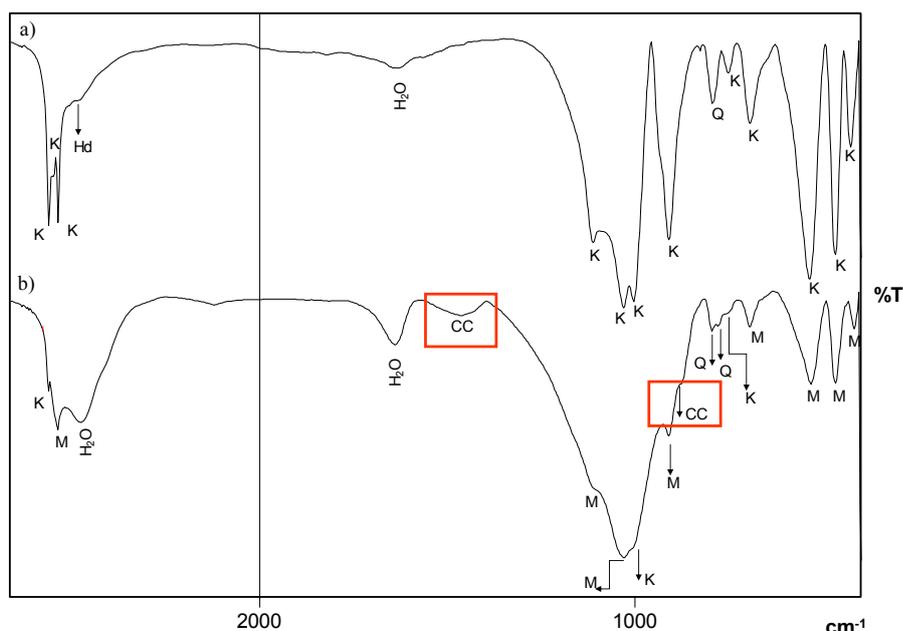


Figura 4-3. Espectros FTIR (a) caulim, (b) bentonita. Nota: K: caulinita, M: montmorilonita, Q: quartzo, Hd: hidrargilita, CC: carbonato de cálcio.

Na amostra de bentonita comercial (Figura 4-3-b) é predominante a presença de montmorilonita (M), misturada com caulinita (3698 cm^{-1} , 1007 cm^{-1} , 752 cm^{-1}). É importante destacar a presença de carbonato de cálcio (CC) na bentonita, com uma banda larga em 1460 cm^{-1} e outra banda fraca, em 876 cm^{-1} (Van der Marel e Beutelespacher, 1976).

Possivelmente, devido à mistura de minerais nas amostra de caulim e bentonita utilizadas, estas apresentaram baixos valores de capacidade de troca catiônica (CTC), em comparação com os valores relatados na literatura.

4.2 BIOENSAIOS PRELIMINARES DE TRIAGEM

4.2.1 Bioensaios em meio líquido sem substrato mineral

Neste item serão descritos os resultados dos bioensaios de triagem em meio líquido sem substrato mineral: o comportamento do pH, o teor de carbonato de cálcio precipitado e as análises mineralógicas do carbonato precipitado.

4.2.1.1 Comportamento do pH

O comportamento do pH nos bioensaios preliminares em meio líquido (sem mineral) das cepas uréase positiva e uréase negativa apresenta-se nas Figura 4-4 e Figura 4-5.

Para os ensaios com microrganismos uréase positiva (Figura 4-4) pode se observar que, de maneira geral, em todos os ensaios, o pH diminui depois de adicionar a ureia e o cloreto de cálcio no meio e depois aumenta a partir de diferentes tempos (2h, 3, 6 ou 9 dias, dependendo do microrganismo), chegando depois a um patamar onde o pH se mantém quase constante até o final do experimento. Nos controles, o pH diminui nos primeiros dias e depois é mantido quase constante até o dia 15.

Nos ensaios com *S. pasteurii* DSM 276 e DSM 323, a reação foi a mais rápida, sendo que o pH diminui nas primeiras 2 horas e depois aumenta até o terceiro dia, mantendo-se praticamente constante até o final do experimento. O pH inicial destas culturas foi o maior, com pH de 8,8 e em duas horas diminuiu até 8 (0,8 unidades de pH).

Stocks-Fischer *et al.* (2009), em estudos cinéticos na *S. pasteurii*, encontraram que a atividade da uréase e sua afinidade com a ureia são significativamente altas no pH em

torno de 8, onde a precipitação de calcita é favorável e depois, a atividade uréase diminui lentamente a pHs maiores. Esse comportamento da enzima uréase descrito por Stocks-Fischer *et al.* (2009), parece ser confirmado nestes bioensaios.

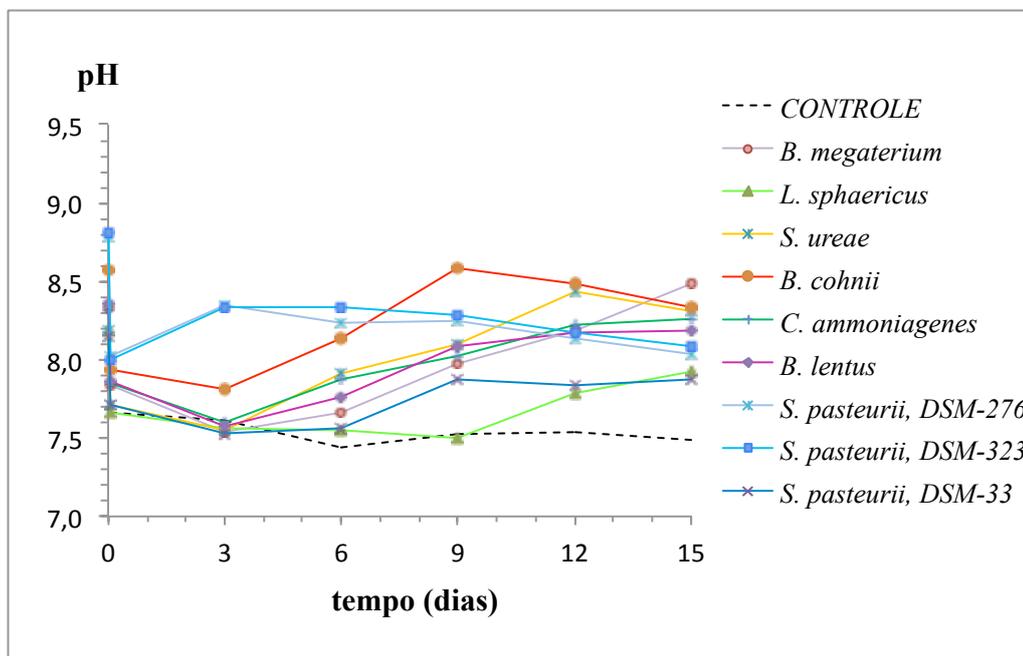


Figura 4-4. Comportamento do pH no tempo, ensaio meio líquido (sem mineral), cepas uréase positiva.

Nos ensaios com *B. cohnii*, *S. ureae*, *B. megaterium*, *B. lentus* e *C. ammoniagenes*, o pH diminui até o dia 3, depois do qual aumenta até o dia 9 (para os ensaios com *B. cohnii*), até o dia 12 (para os ensaios com *S. ureae*, *B. lentus* e *C. ammoniagenes*), ou continua aumentando sem estabilizar como no caso dos ensaios com *B. megaterium*. Nos ensaios como a *S. pasteurii* DSM 33 e *L. sphaericus*, a reação é mais lenta, e o pH diminui até os dias 6 e 9 respectivamente, e depois aumenta até 7,9, o menor valor de pH observado.

Durante o processo é observado que o pH, em quase todos os ensaios com as cepas uréase positiva, diminui abaixo de 8 e depois aumenta novamente até acima de 8 (exceto no *S. pasteurii* DSM 33 e *L. sphaericus*), tentando se estabilizar no pH de 8,6. O maior valor de pH atingido ao final do experimento foi de 8,6 no ensaio com *B. cohnii*. Nos ensaios com as cepas DSM 276 e DSM 323 da *S. pasteurii*, o pH atingiu um valor final de 8,3. O menor valor de pH atingido ao final do experimento foi 7,9 no ensaio com *L. sphaericus* e *S. pasteurii* DSM 33.

Por outro lado, nos ensaios com as cepas uréase negativa (Figura 4-5) o pH diminui até o terceiro dia, mas mantendo-se acima de pH = 8, a partir do qual continua aumentando até o final do experimento, atingindo valores de pH de até de 9,2. Neste ensaio, a cepa *B. subtilis* atingiu um valor menor de pH, ao final do experimento (pH de 8,9).

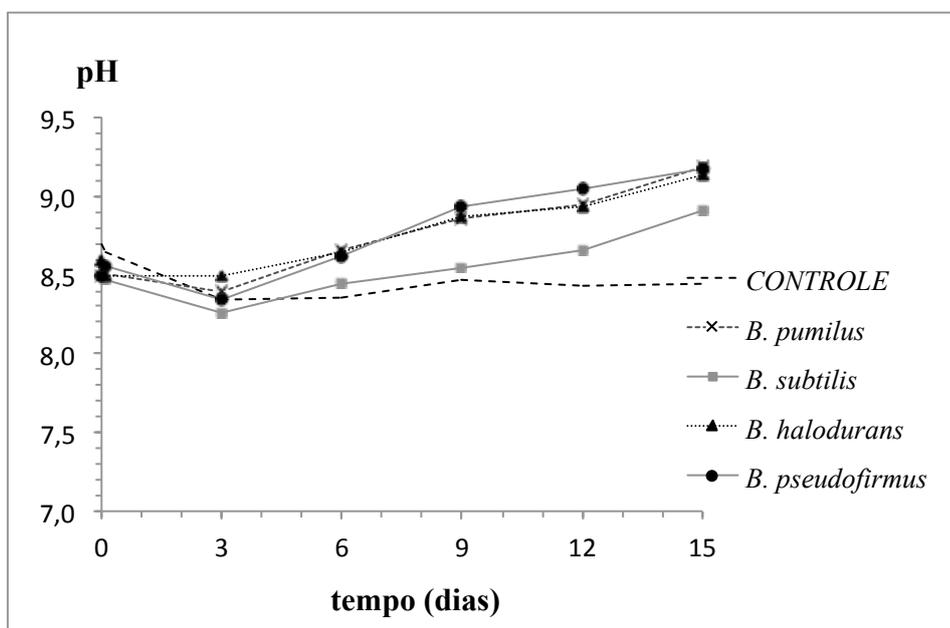


Figura 4-5. Comportamento do pH no tempo, ensaio meio líquido (sem mineral), cepas uréase negativa.

Poucas pesquisas têm reportado este comportamento do pH, com uma diminuição do pH no início e depois um aumento até estabilizar. Em quase todas elas (Achal e Pan, 2014; Stocks-Fischer *et al.*, 1999), o pH aumenta desde o início do experimento. Porém, outros pesquisadores (Van Paassen, 2009; Gat *et al.*, 2014; Seifan *et al.*, 2017) encontraram uma diminuição do pH ao início do processo, nas primeiras 3h - 12 h, e novamente um aumento do pH e esta diminuição do pH foi associada com o início da precipitação de carbonato de cálcio. Este comportamento do pH é analisado ao final do capítulo.

4.2.1.2 Conteúdo de carbonato de cálcio precipitado no meio líquido

Ao finalizar o ensaio em meio líquido, nos Erlenmeyer com microrganismos (uréase positiva ou negativa), no fundo do Erlenmeyer foi encontrado um precipitado sólido que foi separado do meio líquido sobrenadante. Nos Erlenmeyer controles (sem microrganismo), não se verificou a presença de precipitado. A Figura 4-6 mostra o precipitado obtido nos ensaios com as cepas uréase positiva.

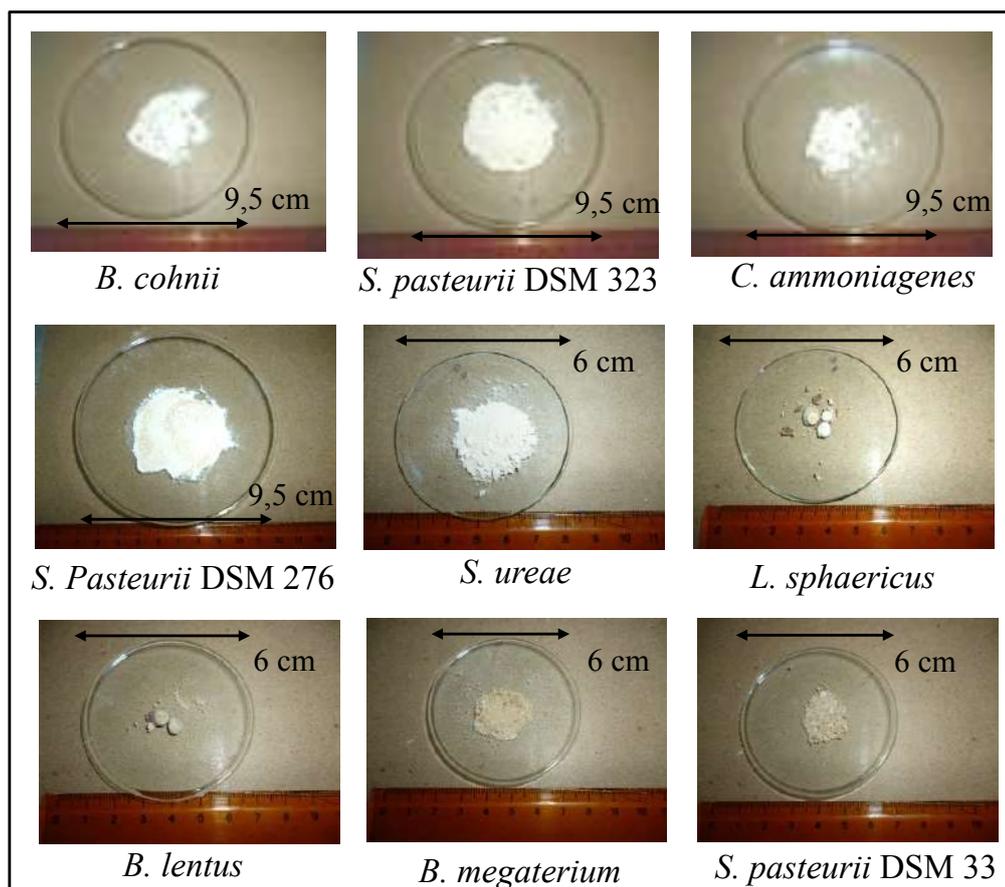


Figura 4-6. Precipitado dos ensaios com cepas uréase positiva (triagem) em meio líquido.

Nas amostras dos ensaios usando *B. cohnii*, *S. pasteurii* DSM 276 e DSM 323, *C. ammoniagenes* e *S. ureae*, foi obtida uma quantidade considerável de um precipitado de cor branca, presumivelmente carbonato de cálcio. Por outro lado, nos ensaios usando as outras cepas uréase positiva (*L. sphaericus*, *B. lentus*, *B. megaterium* e a cepa da *S. pasteurii* DSM 33), este precipitado foi observado incipientemente ou não observado, e ficou misturado com um material obscuro, possivelmente material orgânico.

A Figura 4-7 mostra o precipitado obtido nos ensaios em meio líquido das cepas uréase negativa. Nas amostras dos ensaios usando *B. pumilus* e *B. pseudofirmus* foi observada a precipitação de um mineral branco, presumivelmente carbonato de cálcio. Por outro lado, nos ensaios usando as cepas *B. subtilis* e *B. halodurans*, este precipitado foi observado incipientemente, e também se apresentou misturado com um material obscuro, possivelmente material orgânico. O precipitado de cor branca foi pesado, e nos casos em que esteve misturado com o precipitado obscuro (*L. sphaericus*, *B. lentus*, *B. megaterium*, *S. pasteurii* DSM 33, *B. subtilis* e *B. halodurans*), este último foi separado,

para determinar a quantidade de carbonato de cálcio precipitado (g) em 200 ml de meio líquido. Nas análises mineralógicas apresentadas posteriormente, foi verificado que o precipitado sólido em todas as amostras é carbonato de cálcio.

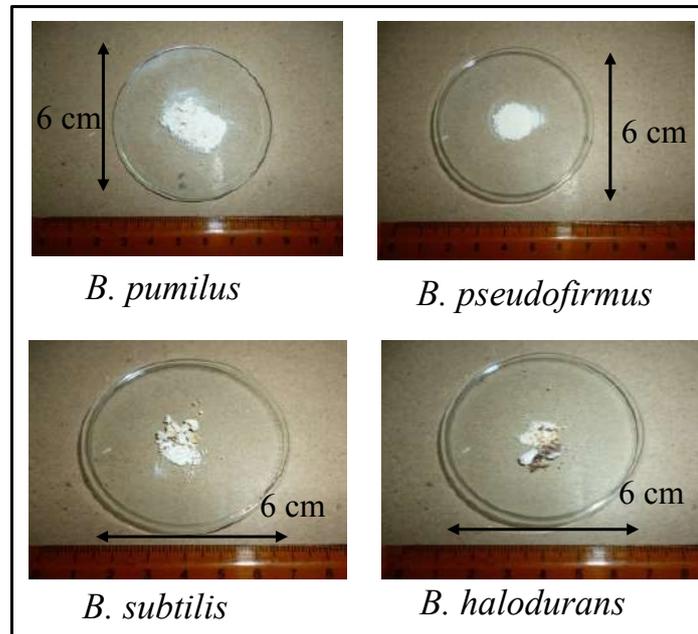


Figura 4-7. Precipitado dos ensaios com cepas uréase negativa (triagem) em meio líquido.

A Figura 4-8, mostra a quantidade de carbonato de cálcio precipitado total, por cada um dos microrganismos (uréase positiva e negativa) utilizados no triagem.

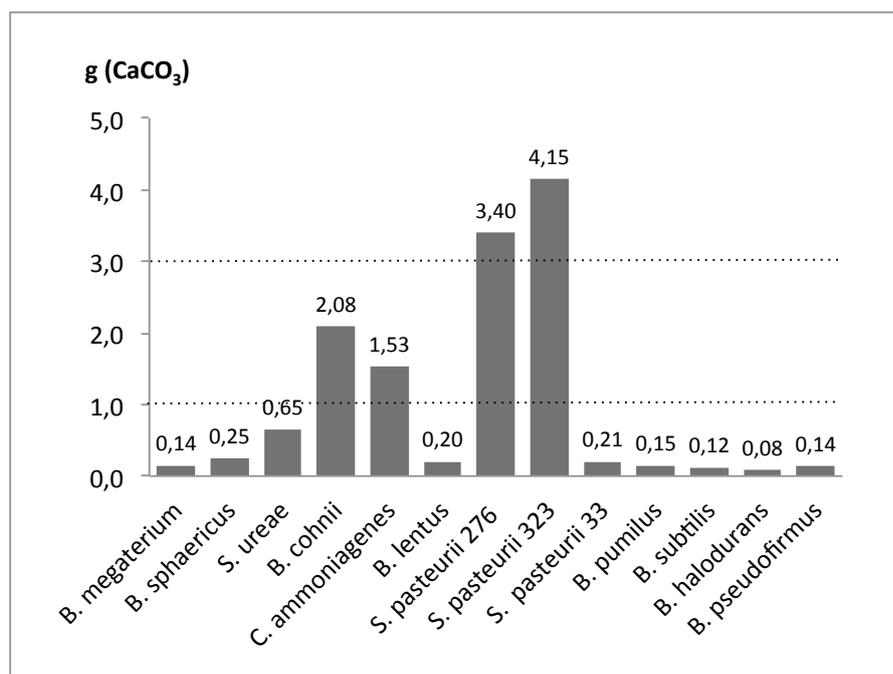


Figura 4-8. Carbonato de cálcio precipitado (g) no meio líquido (sem mineral).

As culturas que precipitaram a maior quantidade de carbonato de cálcio foram em sua ordem: *S. pasteurii* (cepa 323) e *S. pasteurii* (cepa 276), com um conteúdo entre 3 e 5 g de CaCO₃, e *B. cohnii* e *C. ammoniaenes* com um conteúdo entre 1 e 3 g de carbonato de cálcio. As outras cepas precipitaram conteúdos menores que 1 g de carbonato de cálcio.

4.2.1.3 Mineralogia do precipitado - análises por FTIR

O precipitado obtido das experimentações em meio líquido foi analisado por FTIR para determinar sua composição mineralógica. A Figura 4-9 apresenta o resultado de FTIR dos ensaios em meio líquido, para o precipitado das cepas uréase positiva, e os espectros estão organizados em ordem decrescente de acordo com a intensidade da banda de absorção em $\sim 876\text{ cm}^{-1}$, que corresponde a carbonato de cálcio cristalino (CC), modo de vibração ν_2 , flexão fora do plano (CC ν_2) (Van der Marel e Beutelespacher, 1976).

Especificamente, observa-se a presença de vaterita (V), o polimorfo do carbonato de cálcio, pela banda de absorção em 745 cm^{-1} , do modo de vibração ν_4 , flexão no plano (V ν_4) (Andersen e Brecevic, 1991) e está presente em todos os espectros do precipitado das cepas uréase positiva. As bandas de absorção do modo ν_1 , estiramento simétrico da vaterita (V $\nu_1 \sim 1086$ e V $\nu_1 \sim 1076\text{ cm}^{-1}$) (Andersen e Brecevic, 1991), só se observam nas amostras dos ensaios com as cepas *B. cohnii*, *S. pasteurii* DSM 323, *S. pasteurii* DSM 276, *S. ureae* e *C. ammoniagenes*.

É importante notar que foi identificado o outro polimorfo do carbonato de cálcio, a calcita (C), mediante a banda em C $\nu_4 \sim 712\text{ cm}^{-1}$ (Van der Marel e Beutelespacher, 1976), unicamente nas amostras dos ensaios usando as cepas *B. cohnii* e *S. pasteurii* DSM 323. Foi possível observar outras bandas interpretadas como devidas a presença de carbonato de cálcio amorfo (ACC), em todos os bioprecipitados, nas regiões 1400 cm^{-1} e 1480 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} a 1080 cm^{-1} (Andersen e Brecevic, 1991).

Também foram identificadas em todos os ensaios com as cepas uréase positiva, bandas de moléculas orgânicas como amidas (A-I) (entre 1650 e 1662 cm^{-1}), e estiramentos simétricos e assimétricos do CH (2961 e 2962 cm^{-1} , 2926 e 2930 cm^{-1} e 2876 a 2878 cm^{-1}) (Rodriguez-Navarro, *et al.*, 2007; Stuart, 1997)

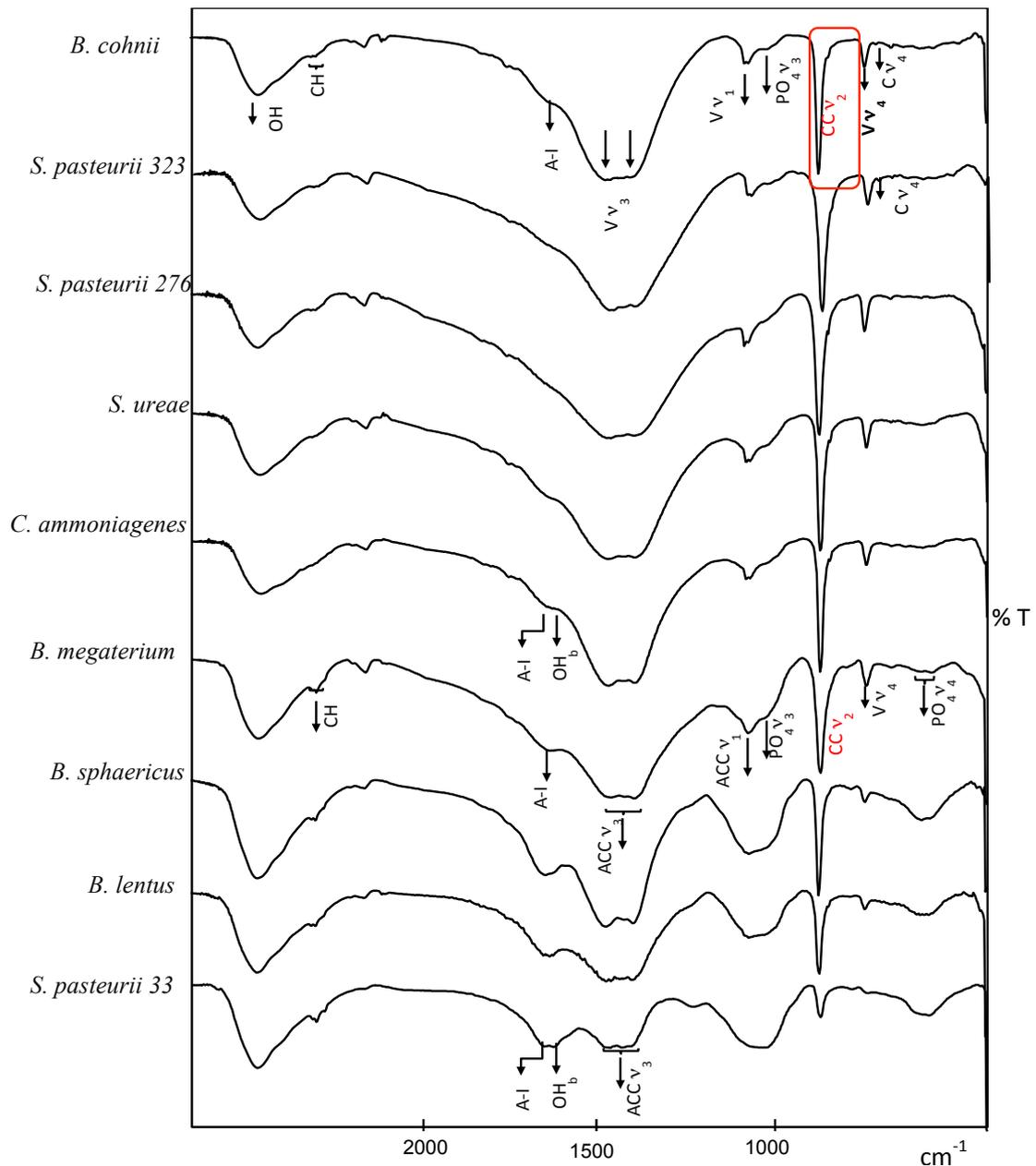


Figura 4-9. FTIR *triagem* - cepas uréase positiva em meio líquido (sem mineral). Nota: presença de carbonato de cálcio cristalino (CCV₂) em ~876 cm⁻¹ (no retângulo vermelho) e possivelmente carbonato de cálcio amorfo (ACC). V: vaterita, C: calcita.

A presença de fosfatos foi identificada em todas as amostras, evidenciada pelas bandas entre 1032 e 1043 cm⁻¹ (PO₄V₃) e os dupletos 589 e 599 cm⁻¹ e 565 e 568 cm⁻¹ (PO₄V₄) (Sarmast *et al.*, 2014), porém estes últimos observam-se só nas amostras dos ensaios usando *S. pasteurii* DSM 33, *B. lentus*, *B. sphaericus* e *B. megaterium*.

Estes resultados confirmam que todos os microrganismos uréase positiva utilizados, foram capazes de precipitar carbonato de cálcio, por um processo de biomineralização

(hidrólise da ureia), em meio líquido, em um tempo de 15 dias. O bioprecipitado corresponde a vaterita, o polimorfo menos estável do carbonato de cálcio, misturado com a fase amorfa e estável do carbonato de cálcio (ACC) e nas cepas *B. cohnii* e *S. pasteurii* DSM 323, além do vaterita e ACC, foi bioprecipitada calcita, a fase mais estável do carbonato de cálcio.

A Figura 4-10 apresenta os resultados de FTIR dos ensaios em meio líquido para o precipitado das cepas uréase negativa.

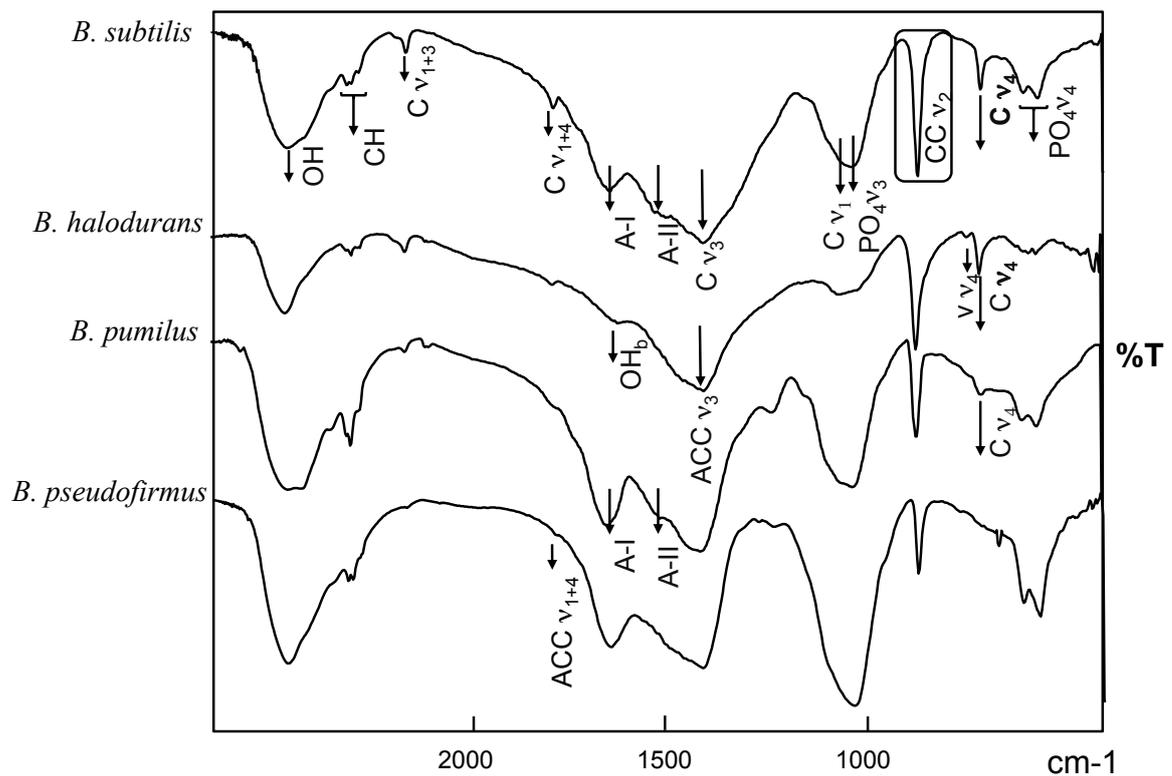


Figura 4-10. FTIR *triagem* - cepas uréase negativa em meio líquido (sem mineral). Nota: presença de carbonato de cálcio cristalino (CC) em $\sim 876\text{ cm}^{-1}$ (no retângulo vermelho) e carbonato de cálcio amorfo (ACC). V: vaterita, C: calcita.

Os espectros das amostras produto dos ensaios com as cepas uréase negativa, foram organizados em ordem decrescente de acordo com a intensidade da banda de absorção em $\sim 876\text{ cm}^{-1}$, que corresponde a carbonato de cálcio cristalino (CC), modo de vibração por flexão fora do plano (CCv_2) (Van der Marel e Beutelespacher, 1976).

Especificamente, a banda de calcita-C ($\text{Cv}_4 \sim 712\text{ cm}^{-1}$) foi observada com boa intensidade nas amostras dos ensaios com as cepas *B. subtilis* e *B. halodurans*, sendo que nas amostras dos ensaios usando a cepa de *B. pumilus*, esta apresentou-se como

uma pequena banda, pouco definida, que desaparece na amostra do ensaio com *B. pseudofirmus*.

Em contraste com as amostras usando as cepas uréase positiva, nas amostras dos ensaios com as cepas uréase negativa, foi identificada unicamente a vaterita ($Vv_4 \sim 745 \text{ cm}^{-1}$) nas amostras do teste usando a cepa *B. halodurans*, apresentando uma banda pouco intensa e pouco definida.

Outras bandas identificadas foram interpretadas como devidas a possível presença de carbonato de cálcio amorfo (ACC), na região entre 1030 cm^{-1} e 1070 cm^{-1} ($ACCv_1$), em todas amostras. O sinal em torno de 1415 cm^{-1} nas amostras usando *B. subtilis* e *B. halodurans* e em torno de 1420 cm^{-1} em *B. pumilus* e *B. pseudofirmus* pode estar associado à calcita- Cv_3 ou a $ACCv_3$.

Também foram identificadas em todas as amostras com cepas uréase negativa, bandas de moléculas orgânicas como amidas (A-I e AII) (entre 1653 e 1657 cm^{-1} e 1520 a 1540 cm^{-1} , respectivamente) e estiramentos simétricos e assimétricos do CH (2960 e 2966 cm^{-1} , 2923 e 2933 cm^{-1} e 2854 a 2876 cm^{-1}) (Rodriguez-Navarro, *et al.*, 2007; Stuart, 1997). A presença de fosfatos foi identificada em todas as amostras, correspondentes as bandas entre 1030 e 1040 cm^{-1} (PO_4v_3) e o duplete em 614 e 586 cm^{-1} e 563 e 569 cm^{-1} (PO_4v_4) (Sarmast *et al.*, 2014). Nas amostras usando *B. pumilus* e *B. pseudofirmus*, identificou-se uma banda associada à presença de lípidos em $\sim 1240 \text{ cm}^{-1}$ (PO^2-).

Os resultados confirmam que todos os microrganismos uréase negativa utilizados foram capazes de precipitar carbonato de cálcio em meio líquido, por um processo de biomineralização, em um tempo de 15 dias, embora em poucas quantidades (abaixo de $0,15 \text{ g}$ em 200 ml de meio líquido), em relação às cepas uréase positiva.

O polimorfo bioprecipitado mais abundante e frequente corresponde à calcita, o polimorfo mais estáveis do carbonato de cálcio, misturado com a fase amorfa e estável do carbonato de cálcio (ACC).

4.2.2 Bioensaios em meio líquido com substrato mineral

Neste item serão descritos os resultados dos bioensaios de triagem em meio líquido com areia de quartzo como substrato mineral. Inicialmente será feita uma descrição das

características macroscópicas observadas durante e depois de finalizar o ensaio, será descrito o comportamento do pH no meio líquido durante o processo e serão apresentadas as análises mineralógicas das areias depois do tratamento.

4.2.2.1 Características macroscópicas do processo

Serão descritas algumas características do processo que foram observadas durante a execução do ensaio, por exemplo, cimentação ou não do mineral no fundo do Erlenmeyer. Também serão descritas as características das amostras ao final do teste, como a cor e presença ou não de cimentação entre os grãos.

Durante o bioensaio utilizando a areia de quartzo como substrato mineral, se observou evidência física da precipitação e cimentação do mineral, pela aderência da areia no fundo do Erlenmeyer. Nos ensaios usando as cepas *S. pasteurii* DSM 276 e DSM 323 e *B. cohnii*, a cimentação da areia ocorreu no primeiro dia (24 h) e a areia foi fortemente aderida ao fundo do Erlenmeyer, sem que se pudesse remover, ainda que sob forte agitação. No sexto dia, apareceu fortemente aderida a areia do ensaio com *C. ammoniagenes* e debilmente aderida a areia dos ensaios usando as cepas *B. lentus*, *S. ureae*, *B. sphaericus*, *B. halodurans* e *B. subtilis*. Finalmente, as amostras tratadas com as cepas *B. megaterium*, *S. pasteurii* DSM 33, *B. pseudofirmus* e *B. pumilus* e os controles negativos, não apresentaram evidencia visual da cimentação da areia durante o tempo do bioensaio.

Na Figura 4-11 observa-se a areia cimentada no ensaio usando *S. pasteurii* DSM 323, sendo que em (a) pode se observar a areia aderida ao fundo do Erlenmeyer, em (b) um aglomerado de areia biocimentada, apresentando em torno de dois (2) cm de diâmetro, e em (c) se mostra a comparação entre o controle (areia com ureia e cálcio) e a areia biotratada com *S. pasteurii* DSM 323 ao final de bioensaio.

Na Figura 4-12 observam-se todas as amostras de areia de quartzo, depois do bioensaio com as nove (9) cepas uréase positiva. As areias biotratadas com *B. cohnii* e *S. pasteurii* DSM 323, apresentam os maiores aglomerados de areia biocimentada (2-3 cm) e uma mudança em sua cor, de branca para creme.

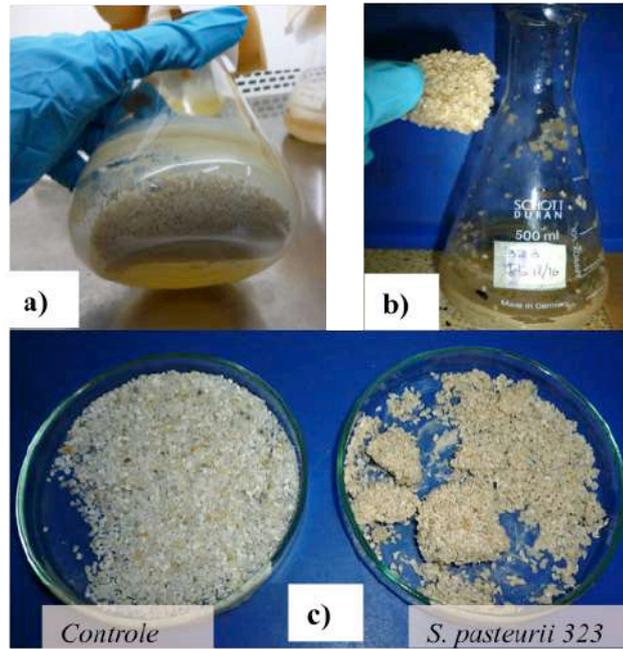


Figura 4-11. Evidência da biocimentação da areia com *S. pasteurii* DSM 323. a) amostra de areia cimentada no fundo do Erlenmeyer. b) aglomerado de areia biocimentada, apresentando em torno de dois (2) cm de lado. c) comparação entre amostra controle da areia e amostra de areia biotratada com *S. pasteurii* 323.

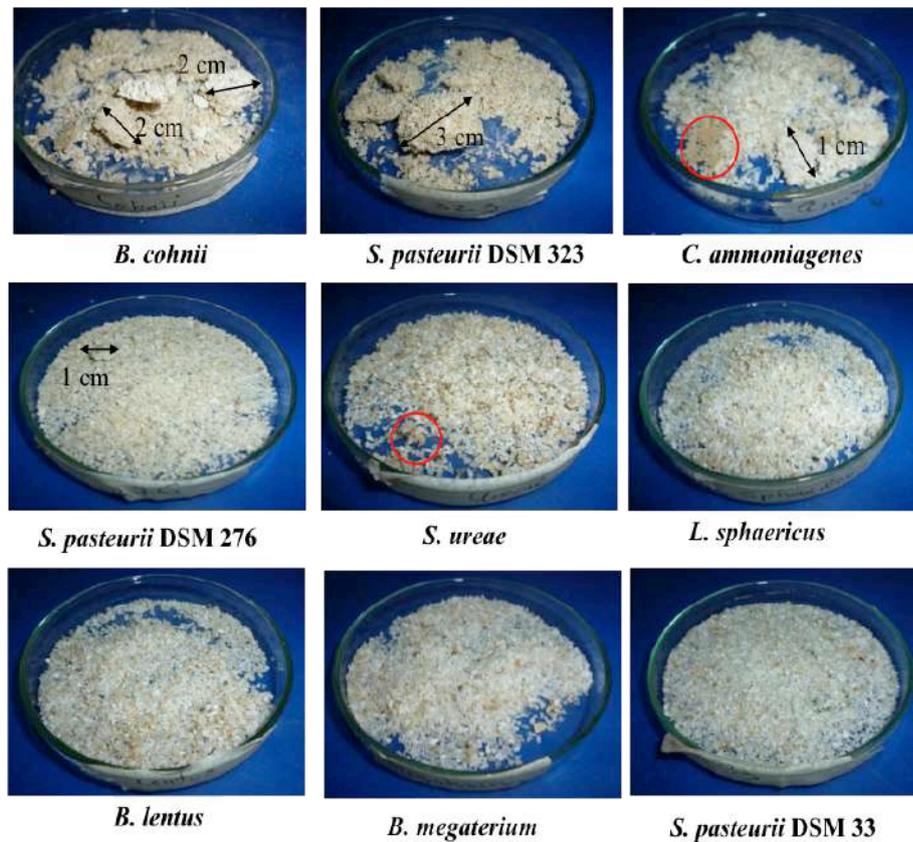


Figura 4-12. Areia biotratada com cepas uréase positiva (*triagem*). Nota: diâmetro caixa de Petri: 9 cm. As setas indicam o diâmetro dos aglomerados de areia biocimentadas. O círculo vermelho mostra o precipitado de cor creme.

As areias biotratadas com *C. ammoniagenes* e *S. pasteurii* DSM 276 apresentam aglomerados de areia cimentada em torno de 1 cm de diâmetro. A amostra biotratada com *S. ureae* mostra um precipitado creme aglomerando só alguns poucos grãos de quartzo. As outras amostras de areia tratadas com cepas uréase positiva (*B. sphaericus*, *B. lentus*, *B. megaterium* e *S. pasteurii* DSM 33) e o controle, não apresentam cimentação dos grãos, nem mudanças físicas apreciáveis.

Na Figura 4-13 observam-se as amostras de areia depois do bioensaio com as 4 cepas uréase negativa, que de modo geral não apresentaram aglomerados de areia cimentadas nem mudança na sua cor, porém, as amostras tratadas com cepas de *B. subtilis* e *B. pseudofirmus* mostram um precipitado creme.

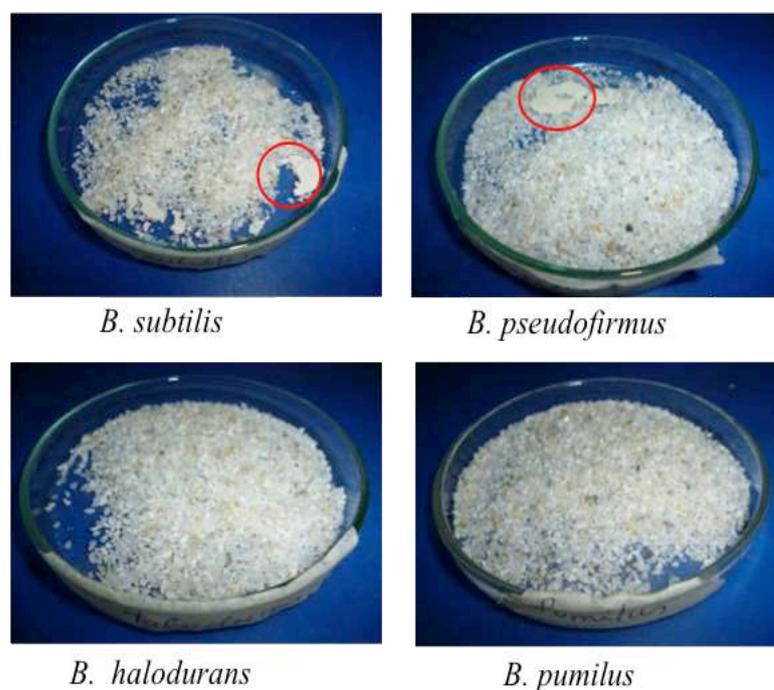


Figura 4-13. Areia biotratada com cepas uréase negativa (triagem). Nota: diâmetro caixa de Petri: 9 cm. O círculo vermelho mostra o precipitado cor creme.

O processo de MICCP com areia de quartzo como substrato, foi semelhante ao processo em meio líquido sem substrato mineral, no sentido, do desempenho dos microrganismos. Em meio líquido, a *S. pasteurii* DSM 323, *S. pasteurii* DSM 276, *B. cohnii* e *C. ammoniagenes*, foram as cepas de maior precipitação de carbonato de cálcio (Figura 4-8), e ao adicionar 10% de substrato, unicamente as areias como estes microrganismos foram cimentadas.

4.2.2.2 Comportamento do pH

O comportamento do pH nos bioensaios com areia de quartzo como substrato mineral, das cepas uréase positiva e uréase negativa são apresentados nas Figura 4-14 e Figura 4-15.

A Figura 4-14 ilustra o comportamento do pH, durante os 15 dias dos bioensaios para as cepas uréase positiva em 10% de mineral (areia de quartzo). O comportamento do pH é semelhante ao comportamento geral nas experimentações sem substrato mineral, mostrando uma diminuição do pH inicial nas primeiras 24 h e subsequente acréscimo, a diferentes tempos, dependendo do microrganismo. Ao final do ensaio, é observado que o pH em algumas cepas tende a diminuir um pouco e/ou estabilizar no dia 12. Nas amostras controles (sem microrganismos), o pH tem uma tendência a diminuir e não se eleva novamente, mostrando uma diferença com os bioensaios e a ação dos microrganismos nos ensaios bióticos.

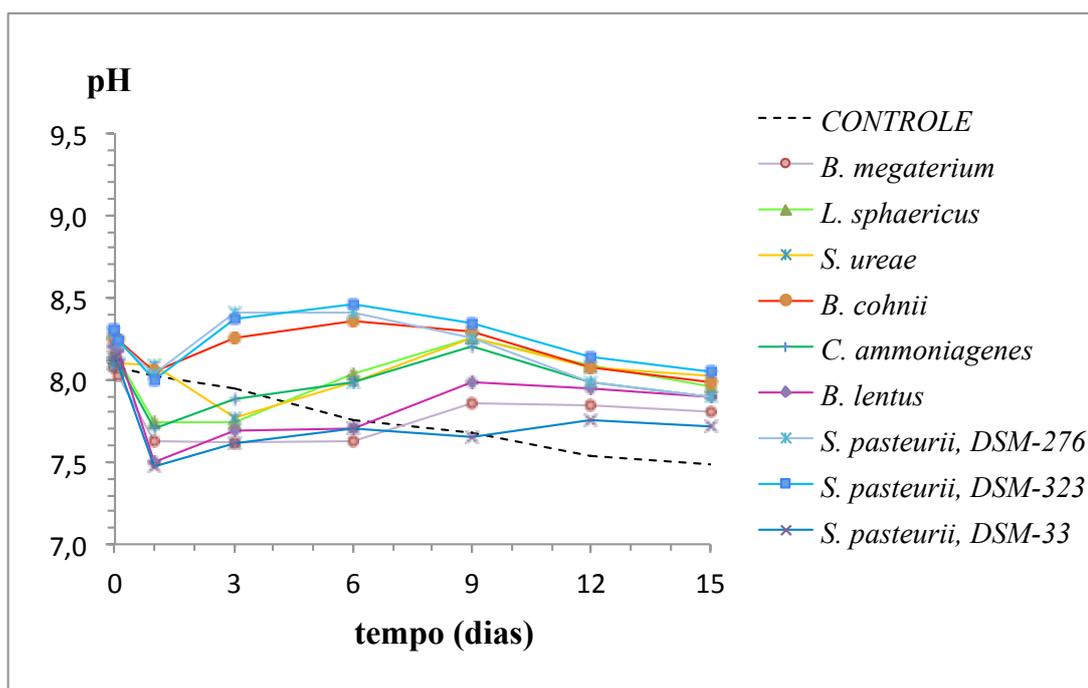


Figura 4-14. Comportamento do pH - tempo, 10% de mineral areia de quartzo no meio líquido, cepas uréase positiva.

Nos ensaios com *S. pasteurii* DSM 276 e 323, *B. cohnii*, o pH diminui nas primeiras 24 h até pH~ 8 (pH ótimo, Stocks-Fischer *et al.*, 2009), depois aumenta rapidamente e

atinge o máximo valor de pH 8,5, no dia 6, depois o diminui até o dia 12, estabilizando em torno de um pH 8.

Nos ensaios com *C. ammoniagenes*, *L. sphaericus* e *S. ureae*, o pH diminui nas primeiras 24 h até pH~ 7,6, posteriormente aumenta novamente e alcança o máximo valor de pH 8,3 no dia 9, diminui novamente até o dia 12 e estabiliza-se num pH em torno de 8. A diferença entre estas três linhagens foi observada no início do aumento do pH, sendo que nos testes usando a *C. ammoniagenes* o pH aumenta a partir das 24 h, enquanto, naqueles com *L. sphaericus* e *S. ureae*, o processo é um pouco mais devagar, e aumenta a partir do dia 3.

Finalmente, a reação mais lenta aconteceu nos ensaios usando *B. megaterium*, *B. lentus* e *S. pasteurii* DSM 33. Nestes o pH diminui nas primeiras 24 h até pH em torno de 7,5, depois aumenta lentamente atingindo o máximo valor de pH~ 8 (*B. lentus*) e pH aproximado de 7,8 (*B. megaterium* e *S. pasteurii* DSM 33), nos dias 6 e 9, respectivamente, e nestes valores permanece quase constante até o final do experimento.

Na Figura 4-15 é mostrado o comportamento do pH, nos ensaios usando cepas uréase negativa e areia de quartzo.

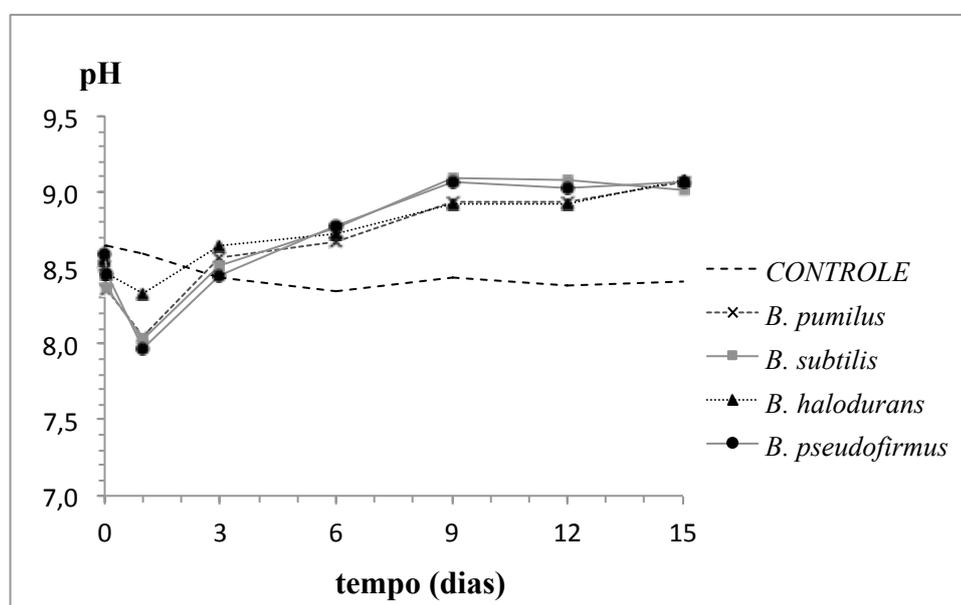


Figura 4-15. Comportamento do pH - tempo, 10% de mineral areia de quartzo no meio líquido, cepas uréase negativa.

Nestes ensaios, o comportamento é menos variável que para aqueles ensaios com microrganismos uréase positiva. Em todos eles, o pH não diminui nas primeiras duas

horas, como foi observado nos experimentos com as cepas uréase positiva, sendo observável uma queda só até o dia 1, atingindo valores de pH em torno de 8. Depois disto todos os ensaios mostraram um comportamento similar, aumentando até o dia 9, chegando em valores de pH um pouco superiores a 9, nos ensaios com *B. subtilis* e *B. pseudofirmus*, e um pouco abaixo deste valor nos ensaios usando *B. halodurans* e *B. pumilus*. Ao final dos ensaios, o pH dos experimentos convergiu em valores em torno de 9.

O controle mostrou um pH quase constante, em torno de 8,5, durante todo o ensaio, totalmente diferente daquele dos bioensaios, evidenciando a ação dos microrganismos.

4.2.2.3 Mineralogia da areia biotratada - análises por FTIR

Os resultados das análises FTIR da areia de quartzo biotratada com microrganismos uréase positiva e da areia sem tratamento (linha pontilhada), são apresentados na Figura 4-16.

Os espectros das areias biotratadas foram organizados em ordem decrescente de acordo com a intensidade da banda de absorção em $\sim 876\text{ cm}^{-1}$, que corresponde a carbonato de cálcio cristalino (CC), modo de vibração ν_2 , flexão fora do plano ($\text{CC}\nu_2$) (Van der Marel e Beutelespacher, 1976). Esta banda ($\text{CC}\nu_2$), foi observada em quase todas as areias biotratadas, a exceção das areias biotratadas com *B. megaterium* e *S. pasteurii* DSM 33.

A banda entre 1420 cm^{-1} e 1490 cm^{-1} , nas areias tratadas como as linhagens de *B. cohnii*, *S. pasteurii* DSM 323 e DSM 276, são interpretadas como devidas a possível presença de carbonato de cálcio amorfo ($\text{ACC}\nu_3$) (Andersen e Brecevic, 1991) e nos ensaios com *C. ammoniagenes*, *S. ureae*, *B. sphaericus* e *B. lentus*, foi observada só a banda $\sim 1420\text{ cm}^{-1}$, que poderia ser associada com $\text{ACC}\nu_3$ ou com calcita- $\text{C}\nu_3$. Provavelmente devido à pronunciada banda em 780 cm^{-1} , atribuída à presença de quartzo, não é possível observar nos espectros o sinal do modo $\text{CC}\nu_2$ em 745 cm^{-1} ou 713 cm^{-1} , correspondente à vaterita e à calcita respectivamente.

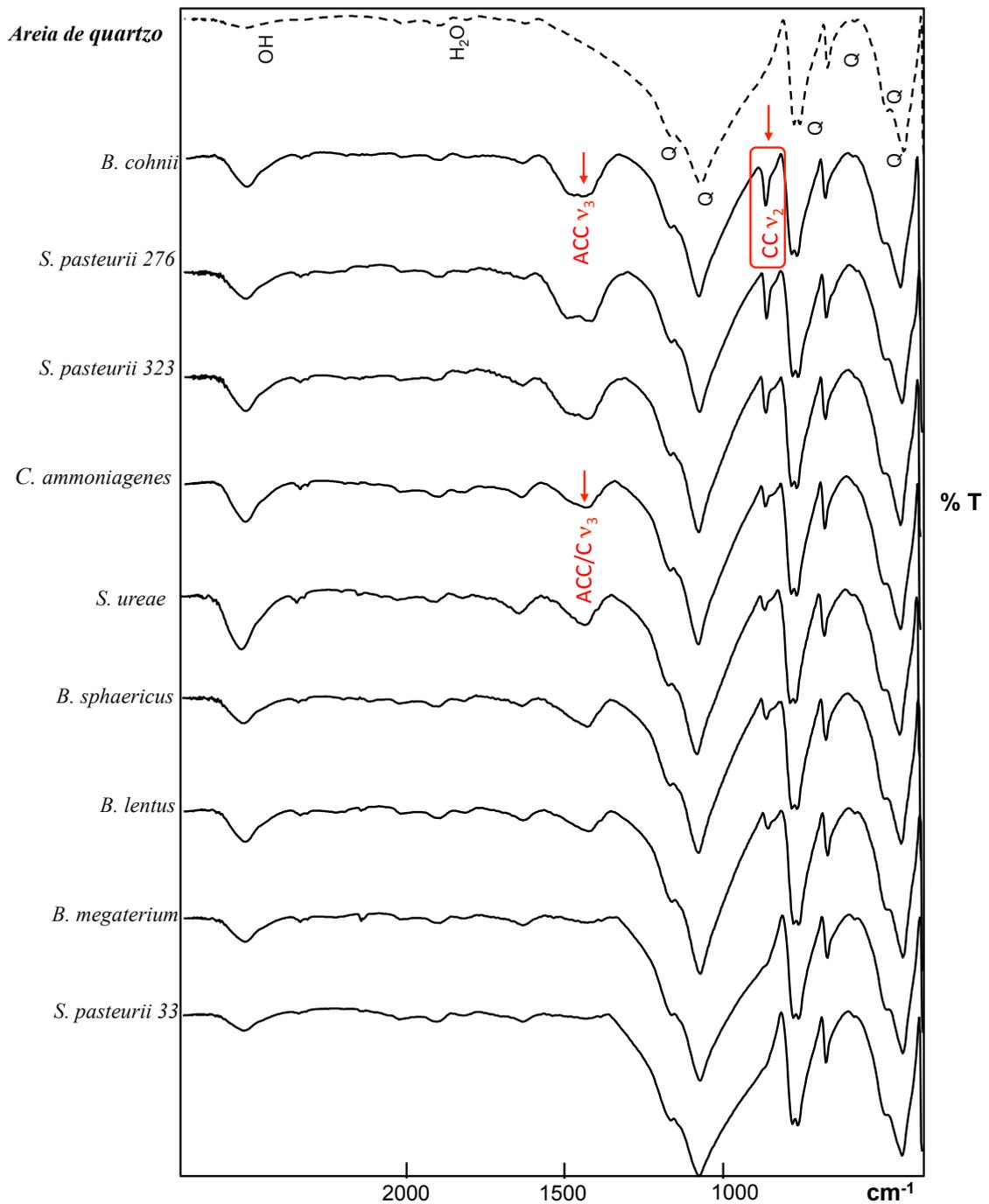


Figura 4-16. FTIR areia de quartzo biotratada com cepas uréase positiva. Nota: ACC: carbonato de cálcio amorfo, CC: carbonato de cálcio cristalino, Q: quartzo, C: calcita.

Nos espectros das amostras da areia de quartzo biotratada com microrganismos uréase negativa (Figura 4-17), não foi possível observar a presença de bandas típicas de carbonato de cálcio, indicando que se houve precipitação de um novo mineral, não foi possível determinar.

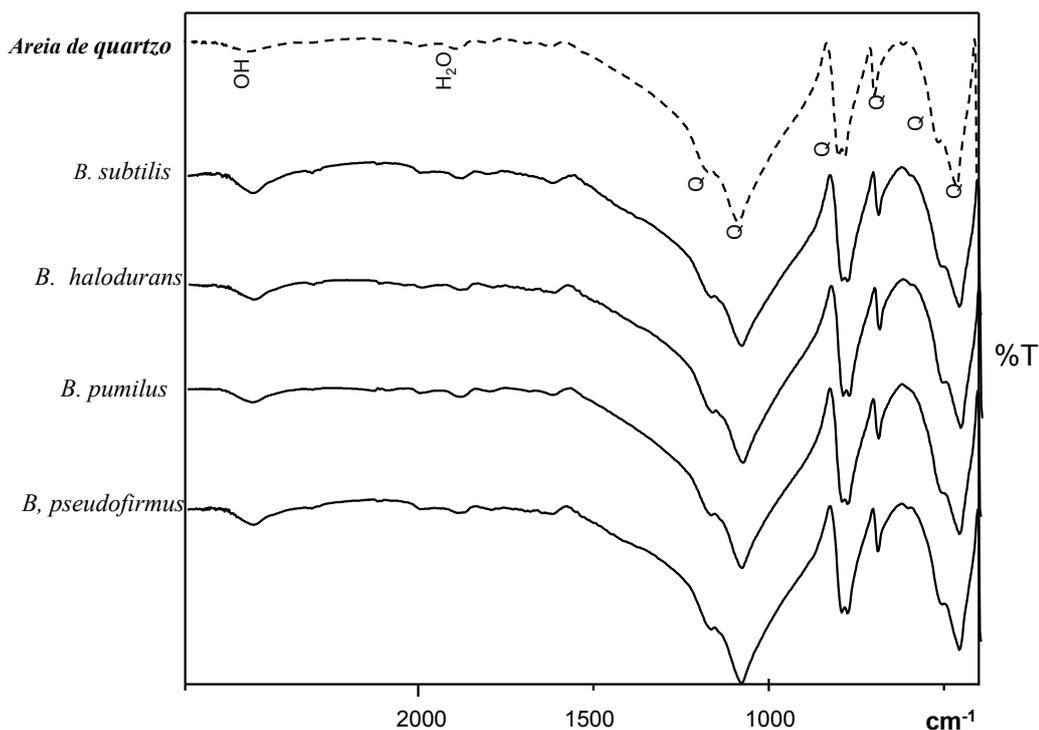


Figura 4-17. FTIR areia de quartzo biotratada com cepas uréase negativa. Nota: Q: quartzo.

Finalmente, levando em conta que a intensidade dos picos nos espectros dos FTIR é indicativa da quantidade relativa dos minerais presentes na amostra, é possível indicar que os ensaios onde houve a maior precipitação de CC foram aqueles onde foram usadas as cepas de *B. cohnii*, *S. pasteurii* (DSM 276 e DSM 323), *C. ammoniagenes* e *S. ureae*.

4.2.3 Análises dos resultados dos ensaios preliminares de triagem

4.2.3.1 Bioensaios em meio líquido sem substrato mineral

✓ FTIR e quantidade de carbonato de cálcio precipitado

Nos bioensaios em meio líquido, sem substrato mineral, houve um precipitado sólido em todas as amostras, exceto no controle. As análises de FTIR revelaram que o precipitado corresponde a carbonato de cálcio. O exposto confirma que todos os microrganismos uréase positiva e uréase negativa provados, foram capazes de precipitar carbonato de cálcio, por um processo de biomineralização, em um tempo de 15 dias, em meio líquido, embora, as quantidades bioprecipitadas e os polimorfos do carbonato de cálcio, foram diferentes dependendo se o microrganismo fosse uréase positiva ou negativa.

As cepas que precipitaram a maior quantidade de carbonato de cálcio foram as cepas uréase positiva, e em sua ordem a *S. pasteurii* (cepa 323) e *S. pasteurii* (cepa 276), com um conteúdo entre 3 e 5 g, o que corresponde a 70% à 80% do total a precipitar, e *B. cohnii* e *C. ammoniagenes* com um conteúdo entre 1 e 3 g, correspondente a uma eficiência entre 30% e 40%. O bioprecipitado corresponde a vaterita, o polimorfo menos estável do carbonato de cálcio, misturado com a fase amorfa do carbonato de cálcio (ACC), sendo que nos experimentos usando as cepas *B. cohnii* e *S. pasteurii* DSM 323, além da vaterita e ACC, foi bioprecipitada calcita, a fase mais estável do carbonato de cálcio.

Segundo Rodriguez-Navarro *et al.* (2012), pouco se sabe sobre o controle cinético ou termodinâmico que determina qual polimorfo é desenvolvido na carbonatogênese bacteriana. Diversas pesquisas têm demonstrado a influência da bactéria ou cepa, o meio de cultura, a temperatura, a supersaturação do meio, a concentração celular, entre muitos outros fatores (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2012; Anbu *et al.*, 2013). Pesquisas com *S. pasteurii* tem precipitado calcita (Stocks-Fischer *et al.*, 2009), calcita e vaterita (Okwadha e Li, 2010), vaterita e ACC (Sensoy *et al.*, 2017). Por outra parte Jonker e Schlangen (2008), reportaram a precipitação de calcita com *B. cohnii*.

As cepas *S. pasteurii* DSM 33, *B. lentus*, *L. sphaericus* e *B. megaterium*, precipitaram a menor quantidade de CaCO_3 (menos que 0,25 g) e, de maneira concordante, nas análises por FTIR apresentaram as bandas em 876 cm^{-1} com menor intensidade, o que é interpretado como a menor presença de carbonato de cálcio. O bioprecipitado nestas cepas corresponde a vaterita e ACC. O desempenho da cepa *S. ureae* foi intermediária, com 0,6 g de CaCO_3 precipitado.

Algumas bactérias uréase positiva (*B. lentus*, *L. sphaericus* e *B. megaterium*) não mostraram resultados satisfatórios na precipitação de carbonato de cálcio, sob as condições deste triagem. Como foi descrito na revisão da literatura, isso pode ser devido a vários fatores que afetam a precipitação de CaCO_3 , como a concentração do microrganismo, a atividade ureolítica, a temperatura, e concentração da ureia e o cálcio (Phillips *et al.*, 2013). De acordo com Whiffin (2004), a resposta da enzima uréase ao amônio é muito importante para a MICCP, e em bactérias como a *B. megaterium*, a atividade urease é reprimida pela toxicidade do amônio. A *B. megaterium* tem sido utilizada para a MICCP com sucesso (Dhami *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013; Soon *et al.*,

2013), mas, utilizando uma concentração do inóculo de 10^7 cel/ml e como reagentes uma solução de ureia (20 g/l) e CaCl_2 (25 mM) em comparação com 10^8 cel/ml, 15 g/l de ureia e 225 mM de cloreto de cálcio em nossos bioensaios. Dhamsi *et al.* (2013), reportaram em seus experimentos, que a *B. megaterium* atingiu a máxima atividade uréase aos 4 dias do ensaio, com pH acima de 10 e foram precipitados os polimorfos vaterita e calcita.

Dick *et al.*, (2006) isolaram cepas das espécies *B. sphaericus* e *B. lentus*, para precipitar carbonato de cálcio sobre pedra calcária. As cepas foram crescidas em meio sólido agar com ureia e CaCl_2 , porém, as concentrações foram menores que as utilizadas nos presentes bioensaios. Eles utilizaram 10 g/l de ureia e 7,5 g/l de CaCl_2 em comparação com 15 g/l de ureia e 37 g/l de CaCl_2 , valores bem acima daqueles, que podem ter afetado os resultados de precipitação de carbonato nos microrganismos. Além disso, para evitar a possível toxicidade com amônio na *B. lentus*, nos ensaios realizados por Dick *et al.* (2006), o amônio evaporado (NH_3) foi capturado (com ácido sulfúrico) e diminuído, sugerindo, uma especial importância desta variável (quantidade de amônio) no processo de MICCP na *B. lentus*. No entanto, os resultados de Dick *et al.* (2006), mostraram na *B. lentus* muita baixa capacidade para degradar a ureia e muito pouca precipitação de carbonato de cálcio e as cepas de *B. sphaericus* precipitaram calcita, contrário à precipitação de vaterita do presente bioensaio. No trabalho de Shirakawa *et al.* (2011), uma cepa de *B. sphaericus* foi utilizada para a MICCP, em meio líquido B4 modificado (acetato de cálcio 5 g/l). Os resultados mostraram uma precipitação de 74% do cálcio fornecido e o polimorfo precipitado foi vaterita. O meio utilizado (B4 modificado) não tem ureia, nem fonte de amônio, sugerindo que a cepa de *B. sphaericus* poderia estar utilizando outro metabolismo para a precipitação de carbonato de cálcio, diferente da hidrólise da ureia. Shirakawa *et al.* (2011b), em outro ensaio com *B. sphaericus*, em meio sólido agar, confirmaram a precipitação de calcita, como nos resultados de Dick *et al.* (2006), mostrando a grande influência dos componentes do meio de cultura no polimorfo de carbonato de cálcio precipitado.

Não são conhecidos estudos sobre a capacidade de bioprecipitar carbonato de cálcio utilizando *S. ureae*. As pesquisas de Mavroulidou *et al.* (2011) e Sarmast *et al.* (2014), focaram na utilização da *S. ureae* na melhoria de solos (argila, siltes e areia), com reagentes de cimentação ureia (20g/l) e CaCl_2 em diferentes concentrações, 0,5, 1 e

1,5M, porém, os resultados não foram satisfatórios, no caso de Sarmast *et al.* (2014), a observação micromorfológica das amostras tratadas com *S. ureae* não mostrou cimentação nem precipitação visível do carbonato de cálcio. Nos presentes bioensaios com *S. ureae*, houve precipitação de vaterita, mas em pouca quantidade (13% do total a precipitar).

Nos 15 dias de bioensaio, as cepas uréase negativa bioprecipitaram carbonato de cálcio, embora em quantidades muito menores (menos que 0,15 g) em relação às cepas uréase positiva, isso é, 3% do total a precipitar. O bioprecipitado se identificou como calcita e ACC, exceto na cepa *B. halodurans*, que foi relacionada à vaterita, com bandas pouco intensas e pouco definidas. No caso dos microrganismos uréase negativa, a pouca precipitação de carbonato de cálcio pode ser devida às condições do triagem, que não representaram as condições particulares necessárias em cada bactéria, como a temperatura, a concentração do ácido orgânico fornecido e a duração do ensaio, entre outros. Por exemplo, a concentração do acetato de cálcio utilizada foi de 2,5 g/l (meio B4), e alguns autores tem modificado o meio B4 a fim de obter melhores resultados de precipitação, aumentando a concentração do acetato de cálcio a 5g/l (Shirakawa *et al.*, 2011), 15 g/l (Valencia, 2009), 100 g/l (Daskalakis *et al.*, 2015).

Os estudos com *B. pseudofirmus* e *B. halodurans*, desenvolvidos por Jonkers e Schlangen (2007, 2008, 2009), utilizaram os esporos dos microrganismos, para remediação de trincas no concreto. Segundo Jonker e Schlagen, estes microrganismos precisam da presença de ácidos orgânicos para promoverem a precipitação de carbonato de cálcio, e em suas experimentações encontraram que a precipitação de carbonato foi devida à conversão metabólica de citrato de sódio e o lactato de cálcio, resultando em aumento da alcalinidade do meio e a consequente precipitação, neste caso de calcita. Nos ensaios desta pesquisa foi utilizado acetato de cálcio e também foi precipitada calcita, mas em muita pouca quantidade.

Baskar *et al.*,(2006), isolaram *B. pumilus* de cavernas na Índia e foram crescidas em meio sólido (agar B4) para precipitar carbonato de cálcio. Eles encontram que a temperatura é uma variável crítica no processo da MICCP com *B. pumilus*, sendo 25°C a temperatura ótima de incubação e de precipitação de carbonato de cálcio, enquanto que a 30°C, temperatura dos bioensaios realizados nesta pesquisa, há uma redução significativa de bactérias. Nas condições dos ensaios de Baskar *et al.* (2006), 25°C e

meio B4, foi precipitada calcita, depois de 7 dias do início do ensaio. Porém, Daskalakis *et al.* (2015), em *B. pumilus* isolados em cavernas na Grécia, encontrou maior remoção de cálcio do meio líquido e em consequência maior precipitação de carbonato de cálcio a uma temperatura de 30°C, e foram precipitadas vaterita e calcita aos 9 dias, mas, utilizaram uma concentração de acetato de cálcio de 10% w/v em comparação com 0,25% w/v em nos presentes bioensaios.

Os estudos de Barabesi *et al.* (2006) sugerem na *B. subtilis*, uma ligação entre a precipitação de carbonato de cálcio e o metabolismo dos ácidos graxos, e que o processo de biomineralização corresponde a uma biomineralização controlada, não induzida. Tiano *et al.* (1999) e Montoya *et al.* (2005), utilizaram *B. subtilis* em uma concentração de 10⁶ cel/ml e em meio sólido agar B4 durante 15 dias e os cristais precipitados foram de calcita. Fujita *et al.*, 2004, tentaram promover a MICCP da *B. subtilis* com ureia, mas, não obtiveram resultados satisfatórios e não houve consumo de ureia. Shirakawa *et al.* (2011b) utilizaram o meio líquido B4 modificado, com 5g/l de acetato de cálcio, para precipitar carbonato de cálcio com *B. subtilis* durante 12 dias e obtiveram precipitação de vaterita e calcita, mas em pouca quantidade, 28% de precipitação.

Estes resultados confirmam que o tipo de bactéria, a via metabólica utilizada na MICCP e a concentração dos reagentes, tem influência na precipitação do carbonato de cálcio e no tipo de polimorfo precipitado e por outra parte, a hidrólise da ureia demonstrou ser um processo muito eficiente para a MICCP.

✓ *Comportamento do pH*

De maneira geral o pH do meio, em todos os bioensaios sem substrato mineral, diminui rapidamente nas primeiras fases do ensaio, apresentando posteriormente um acréscimo até se estabilizar ou convergir ao final do experimento em valores em torno de 8. Pode se observar nos ensaios deste estudo, uma relação direta entre o comportamento do pH e a precipitação de carbonato de cálcio, sendo que naqueles ensaios onde o pH começou a subir primeiro (com *S. pasteurii* DSM 276 e 323) atingindo os maiores valores de pH e se estabilizando ao final do experimento em valores em torno de 8, foram aqueles onde apresentou-se maior precipitação de carbonato de cálcio. Nos ensaios com linhagens onde o pH caiu inicialmente e subiu paulatinamente até chegar em torno de 8,

mostraram as menores quantidades de carbonato de cálcio (com *L. sphaericus* e *S. pasteurii* DSM 33).

Gat *et al.* (2014) e Seifan *et al.* (2017), atribuíram a diminuição do pH no início do processo ao aumento da respiração celular, levando ao enriquecimento em CO₂ e, conseqüentemente, à acidificação do ambiente.

Van Paassen (2009) atribui a diminuição do pH ao início da precipitação do carbonato de cálcio e desenvolveu um modelo teórico para explicar a cinética combinada da hidrólise da ureia e a precipitação do carbonato de cálcio, explicando a diminuição do pH baseado no equilíbrio ácido-base ao início do processo, entre o cálcio livre e o complexo de bicarbonato de cálcio (C_{CaHCO₃⁺}), acidificando ligeiramente o meio (Equação 4-1).



No início da reação, assim que um pouco de ureia é hidrolisado, o pH aumenta, nesse ponto, o carbonato produzido excede o produto de solubilidade e o carbonato de cálcio começa a precipitar. Depois disso, o pH cai rapidamente, principalmente como resultado do equilíbrio entre o cálcio livre e o complexo de bicarbonato de cálcio (C_{CaHCO₃⁺}), que é o composto mais abundante de CID (carbono inorgânico dissolvido) durante a primeira metade do processo, quando a concentração de cálcio ainda é alta. Enquanto o cálcio está se esgotando pela precipitação, a quantidade total de carbonatos (CO₃²⁻) e, portanto, o CID aumenta e o pH começa a aumentar novamente, atingindo um valor mais ou menos estável, uma vez que todos os substratos estão esgotados.

A Figura 4-18 mostra em (a) o comportamento do pH e sua relação com a precipitação do carbonato de cálcio e o esgotamento do cálcio, no modelo teórico proposto por Van Paassen (2009) e em (b) as medições de pH durante as primeiras 20 h de um experimento, onde foi obtido um comportamento similar ao modelo proposto.

Uma observação interessante no estudo de Van Paassen (2009), foi que a maior parte da precipitação ocorre em torno do pH neutro. Ao contrário de outras sugestões na literatura, Van Paassen concluiu que, o aparecer do aumento do pH não é um requisito para a MICCP, mas, é o resultado da especiação no equilíbrio ácido-base e o

desequilíbrio entre a hidrólise da ureia, que consome ácido e a precipitação de CaCO_3 que gera ácido.

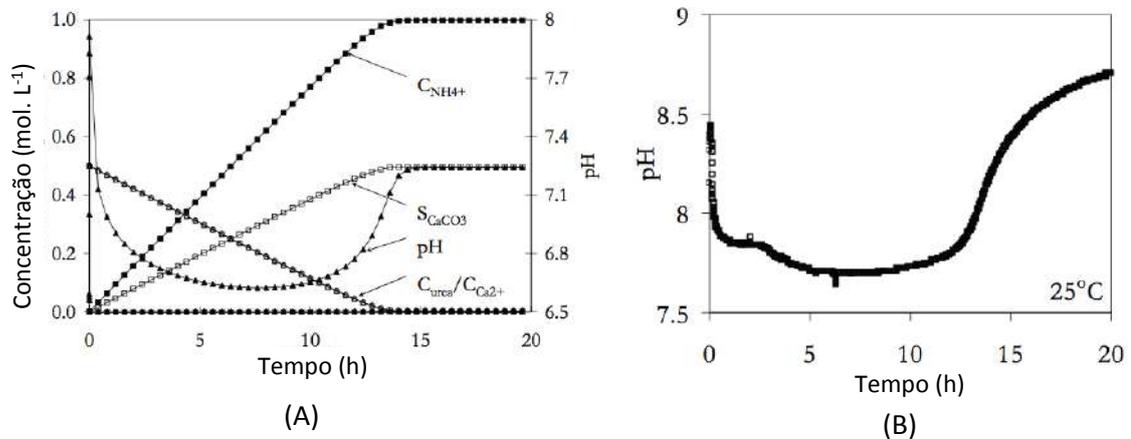


Figura 4-18. Comportamento do pH na MICPP segundo Van Paassen (2009). a) Concentração das principais espécies dissolvidas, $C_{\text{ureia}}/C_{\text{Ca}^{2+}}$, $C_{\text{NH}_4^+}$, carbonato de cálcio precipitado, S_{CaCO_3} e pH, calculado com o modelo numérico que incluiu o equilíbrio ácido-base. b) Medições de pH em experimento a 25°C. (Modificado de Van Paassen, 2009).

O modelo explica o comportamento do pH nas cepas uréase positiva nos ensaios realizados, mas, é necessário aprofundar no entendimento do comportamento das cepas uréase negativa, para tentar explicar isso, dependendo da via metabólica utilizada dentro do ciclo do nitrogênio.

Nos bioensaios com as cepas uréase positiva testadas neste estudo, o pH diminui rapidamente nas primeiras 2 h e desce até 7,7, nos ensaios com as cepas *L. sphaericus*, *S. ureae* e *S. pasteurii* DSM 33, até 7,8 no ensaio com *B. megaterium*, até 7,9 nos ensaios com *B. cohnii*, *C. ammoniagenes* e *B. lentus* e até pH de 8 nos ensaios com *S. pasteurii* DSM 276 e 323. Depois da diminuição, o pH aumenta novamente até acima de 8, tentando se estabilizar no valor do pH inicial de 8,6, (exceto para a *S. pasteurii* DSM 33 e *L. sphaericus*, que atingiram o valor máximo de pH de 7,9).

O aumento do pH ocorreu em diferentes dias dependendo dos microrganismos. As cepas DSM 276 e DSM 323 da *S. pasteurii*, foram as que apresentaram o aumento mais rápido e no dia 3 têm pH de 8,3, seguida pela *B. cohnii* que alcança pH de 8 no dia 6, depois os ensaios com *S. ureae*, *B. lentus*, *C. ammoniagenes*, e *B. megaterium*, que alcançaram pH de 8 no dia 9 e finalmente os ensaios com *S. pasteurii* DSM 33 e *L. sphaericus*, foram as mais lentos, aumentando o pH a partir do dia 6 e 9 respectivamente, mas o pH foi inferior a 8.

Estes resultados sugerem, nos ensaios com *S. pasteurii* 276 e 323, o início da precipitação do carbonato de cálcio, desde o início do experimento e a maior precipitação durante os primeiros 3 dias. Isso foi observado durante o ensaio, como uma mudança da cor do meio líquido nas primeiras horas (mudança de amarelo para creme) e com a aparição no fundo do Erlenmeyer de um precipitado branco no dia 3. Nos bioensaios com as outras cepas, a maior precipitação do carbonato parece ocorrer após, às 72 h, no dia 6 e no dia 9.

O comportamento do pH nos bioensaios com as cepas uréase negativa foi diferente, no sentido de que o pH diminuiu inicialmente, mas mantém-se acima de 8, e em seguida continua aumentando até o final do experimento atingindo valores de pH até de 9,2, sem se estabilizar. Este comportamento, apesar de atingir maiores valores de pH na redução inicial, é similar àquele observado nos experimentos com as linhagens onde foram precipitadas as menores quantidades de carbonato de cálcio, ou seja, queda inicial e aumento paulatino até o final do experimento, chegando a valores em torno de 8, mostrando que, apesar de que seguramente os mecanismos de formação de carbonato de cálcio foram diferentes seguindo caminhos distintos entre os microrganismos uréase positiva e uréase negativa, aparentemente ou o pH é fundamental no processo de precipitação deste ou ele é função da própria precipitação, ou mesmo enquadra-se nos dois sentidos.

Os resultados do pH, mostram uma relação direta com os resultados das análises por FTIR e a quantidade de carbonato de cálcio precipitado. Os ensaios onde foram usadas as cepas DSM 276 e DSM 323 da *S. pasteurii* e a *B. cohnii*, foram onde aumentou mais rápido o pH (às 2h e 72 h), sendo que no FTIR, apresentaram a banda de absorção do carbonato em $\sim 876\text{ cm}^{-1}$ mais pronunciada e precipitaram a maior quantidade de carbonato de cálcio. Por outro lado, nos ensaios usando *B. lentus*, *B. megaterium*, *S. pasteurii* DSM 33 e *L. sphaericus*, onde se apresentou o aumento mais lento do pH, observou-se no FTIR as bandas de absorção do carbonato em $\sim 876\text{ cm}^{-1}$ menos pronunciadas e a menor precipitação de carbonato de cálcio.

No entanto, nas cepas uréase negativa, o pH desceu menos que nas cepas uréase positiva e este sempre foi mantido acima de 8 (ambiente alcalino) e atingiu um valor máximo de 9,2. Nestes ensaios houve muita pouca precipitação de carbonato de cálcio e nas análises FTIR foi observada uma banda ampla correspondente a ACC.

4.2.3.2 Bioensaios em meio líquido com areia de quartzo como substrato mineral

✓ *Análises FTIR, pH e observações macroscópicas das amostras*

De maneira geral, o comportamento entre os ensaios com e sem areia de quartzo, usando as diferentes linhagens testadas foi similar com pequenas diferenças, porém mostrando que o efeito do mineral sendo menor é perceptível, especialmente nas quantidades de carbonato de cálcio precipitadas.

Deste modo, nos bioensaios com as cepas *S. pasteurii* DSM 276 e 323 e *B. cohnii*, foi observado nas primeiras 24 h que a areia apresentava aglomeração dos grãos pelo carbonato de cálcio, além de mostrar-se fortemente aderida ao fundo do Erlenmeyer, formando uma espécie de crosta ou camada dura. Nestas 24 h o pH do meio diminuiu de 8,6 até 8 e depois começou a subir novamente de modo similar ao observado nos ensaios sem mineral. Ao final do teste, as areias estavam efetivamente cimentadas, formando torrões de 1 a 3 cm de diâmetro, embora aglomerados maiores tiveram que ser destruídos para poder retirá-los do Erlenmeyer. Estes resultados, mostram a relação entre a diminuição do pH e a precipitação de carbonato de cálcio, já observadas nos ensaios sem mineral, explicados sem ter em conta o papel dos grãos de quartzo, pelo Van Paassen (2009). Nestas amostras, a maior precipitação ocorreu decorridas 24 h, tempo em que o pH diminuiu.

Similarmente aconteceu no bioensaio usando a linhagem de *C. ammoniagenes*, onde foi observada a areia aglomerada e fortemente aderida no fundo do Erlenmeyer, porém, só a partir do sexto dia do ensaio. Neste experimento, o pH diminuiu até 7,7, aumentando posteriormente a partir do dia 3, atingindo um valor de pH em torno de 8 no dia 6, que aparentemente foi a condição que disparou a precipitação de carbonato de cálcio (Stocks-Fischer *et al*, 2009). O comportamento do pH nos ensaios usando esta cepa, foi diferente daquele observado nos testes com *B. cohnii* e *S. pasteurii* 276 e 323, mas ao final do teste as areias estavam efetivamente cimentadas, porém formando torrões de menor tamanho (~ 1 cm).

As areias dos experimentos com as culturas de *L. sphaericus*, *S. ureae* e *B. lentus*, apresentaram uma cimentação fraca, que se perde agitando fortemente o Erlenmeyer. Ao final do teste, só na areia tratada *S. ureae*, foi encontrado um precipitado creme aglomerando alguns grãos de quartzo. Nas areias dos ensaios usando as linhagens de *L.*

sphaericus e *B. lentus* não foi observada cimentação dos grãos, nem mudanças físicas apreciáveis.

As análises por FTIR suportam os resultados das observações macroscópicas, identificando a presença de carbonato de cálcio pela banda de absorção em $\sim 876\text{ cm}^{-1}$, mostrando as maiores intensidades desta, nas areias que apresentaram cimentação dos grãos, onde foram usadas as linhagens de *S. pasteurii* DSM 276 e 323, *B. cohnii*, com menor intensidade nas areias tratadas com *C. ammoniagenes*, *S. ureae* *L. sphaericus* e *B. Lentus*.

De modo geral, nas amostras de areia de quartzo biocimentadas não foi possível definir o polimorfo de carbonato de cálcio, devido à pronunciada banda do quartzo em 780 cm^{-1} , a qual apresenta superposição com as bandas do carbonato em 745 cm^{-1} ou 713 cm^{-1} , correspondentes à vaterita e à calcita, respectivamente.

As areias produto dos ensaios com as cepas *B. megaterium* e *S. pasteurii* DSM 33 não apresentaram evidencia de cimentação durante os 15 dias do bioensaio e, consistentemente, nestes experimentos o pH diminuiu inicialmente até aproximadamente 7,5 e depois aumentou pouco e lentamente, sem alcançar o pH de 8. Este comportamento sugere que, embora houvesse precipitação de carbonato cálcio, a hidrólise da ureia não foi catalisada, e o carbonato precipitado permaneceu na forma de complexos dissolvidos de carbonato e bicarbonato, de acordo com as colocações do Van Paassen (2009). Nas análises por FTIR, nestas amostras não foram identificadas bandas de carbonato de cálcio.

As areias com as cepas uréase negativa, não apresentam cimentação dos grãos, nem mudanças físicas apreciáveis, onde só as amostras tratadas com *B. subtilis* e *B. pseudofirmus* mostraram um precipitado creme, sendo característico que nestes ensaios se atingiram os maiores pHs, com valores acima de 9.

Como já foi mencionado, nas cepas uréase negativa, o comportamento do pH foi similar àqueles dos ensaios usando as cepas uréase positiva que tiveram a menor precipitação de carbonato de cálcio, observando-se as únicas diferenças no início dos experimentos onde o pH é mantido constante durante as primeiras duas horas, diminuindo posteriormente até as 24 h, atingindo valores de pH em torno de 8, e no final, chegando em valores em torno de 9.

Os resultados sugerem, que nos ensaios usando linhagens uréase negativa, a precipitação de carbonato começa depois das 2h, enquanto que, naqueles com cepas uréase positiva, começa desde o início do experimento. Como nos ensaios em meio líquido sem mineral, apesar de se manter o pH acima de 8, o carbonato de cálcio precipitado foi muito pouco para ser observado por FTIR, permanecendo provavelmente na forma de complexo dissolvido (Van Paassen, 2009).

A presença de areia de quartzo no bioensaio não significou variações importantes no comportamento do pH das cepas uréase positiva. Nas cepas uréase negativa, houve uma pequena diferença, sendo que a diminuição inicial no pH foi mais pronunciada com areia de quartzo. Além disto, a presença da areia de quartzo fez com que o conteúdo de carbonato de cálcio nos ensaios fosse menor, evidenciando-se uma inibição à precipitação destes, nos experimentos usando culturas uréase negativa, especialmente as de *B. sphaeriucus* e *S. pasteurii* DSM 33.

4.2.4 Seleção dos microrganismos para a continuidade dos estudos

Para fazer a seleção dos três microrganismos com a melhor capacidade para bioprecipitar carbonato de cálcio, foram analisados os resultados de pH, CaCO_3 precipitado avaliado com base na quantificação e observações macroscópicas da cimentação e as análises mineralógicas usando FTIR, dos bioensaios sem e com o substrato mineral areia de quartzo.

A partir destes resultados, foram selecionados três (3) microrganismos, para continuar com os estágios de bioensaios de solos e biocimentação de solos.

- *Sporosarcina pasteurii*: as cepas 276 e 323 da *S. pasteurii*, apresentaram o melhor desempenho na precipitação de carbonato de cálcio em ambos experimentos, sem e com substrato mineral. A hidrólise da ureia e a precipitação do CaCO_3 com este microrganismo, começou rapidamente, desde o início dos ensaios, a diferença de outros microrganismos que tardaram até 9 dias para precipitar carbonato de cálcio.

Foi o microrganismo com maior precipitação de carbonato de cálcio nos ensaios em meio sem substrato mineral (70%-80%) e foi dos poucos que precipitou calcita (além de a *B. cohnii*), o polimorfo mais estável do carbonato de cálcio e que poderia ser o polimorfo de maior interesse do ponto de vista da obtenção do

biocimento para a melhora nas propriedades do solo. Por outra parte, este microrganismo tem sido utilizado em muitas pesquisas de MICCP e por isso, sua cinética e outras características tem sido amplamente estudadas. Para este estudo foi selecionada a cepa DSM 323.

- *Bacillus cohnii*: este microrganismo também apresentou bom desempenho em todos os bioensaios preliminares de triagem. A precipitação de carbonato de cálcio no ensaio sem mineral começou nas primeiras horas do ensaio, atingindo uma precipitação de 40% de CaCO_3 , e precipitou calcita. Até agora, este microrganismo tem sido usado na remediação do concreto (Jonkers, 2007), mas não tem sido utilizado para aplicações em solos.
- *Corynebacterium ammoniagenes*: é um microrganismo que apresentou bom desempenho nos bioensaios preliminares de triagem, mas que, no entanto, tem alta atividade uréase, por exemplo, maior que a *B. lentus*, ele não tem sido reportado na literatura para a MICCP. Seu uso nesta pesquisa e os resultados obtidos, seria uma contribuição importante para os avanços da MICCP por hidrólise da ureia.

Neste estudo não foram selecionados microrganismos uréase negativa, devido ao seu fraco desempenho sob as condições definidas no triagem.

4.3 BIOENSAIOS DE SOLOS- NÍVEL DE ERLLENMEYER (SOLOS EM SUSPENSÃO)

A fim de avaliar a influência da mineralogia dos solos na MICCP, os bioensaios de solos foram desenvolvidos em Erlenmeyer, com solos em suspensão (10% solo – 90% meio líquido).

Foram utilizados três solos: areia, caulim e bentonita e três microrganismos escolhidos do triagem preliminar: *S. pasteurii* (DSM 323), *B. cohnii* e *C. ammoniagenes*, cepas uréase positiva, usando as condições de cultura e do bioensaio descritas na Tabela 3-2, utilizando ureia e cloreto de cálcio como solução de cimentação, numa concentração 0,25 M.

Adicionalmente, durante os ensaios foi medido o teor de cálcio em solução, variável que não foi medida nos bioensaios de triagem. Em continuidade são apresentados os resultados destes bioensaios formais.

4.3.1 Caracterização macroscópica das amostras depois do processo

Nos bioensaios com os três microrganismos, foi possível observar, nas amostras de areia de quartzo e de bentonita, precipitados de cor creme associados a carbonato de cálcio. Nas areias de quartzo o efeito da MICCP é observado na formação de torrões de areia aglomerada de 2-3 cm, devido à precipitação de carbonato cimentando os grãos de quartzo (Figura 4-19A).

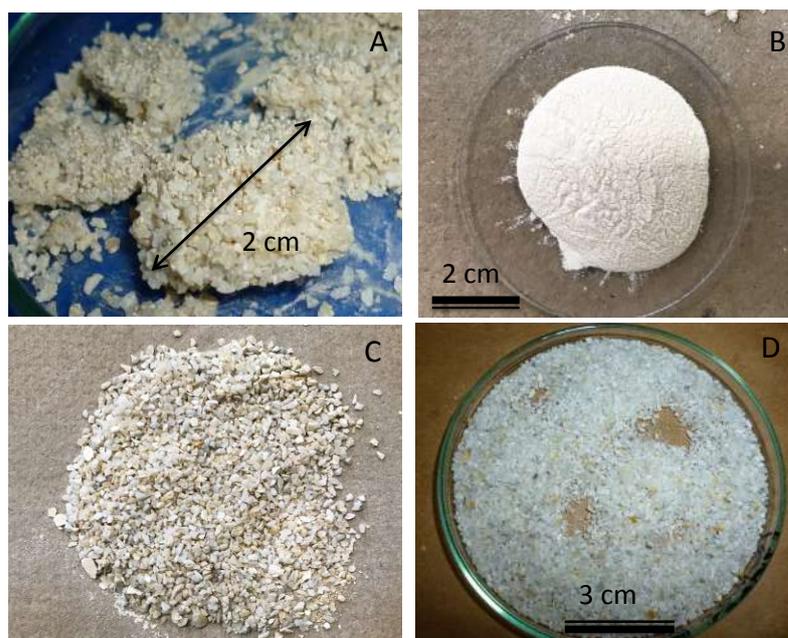


Figura 4-19. Evidência visual da cimentação da areia biotratada com *S. pasteurii*. A) torrões de areia biocimentada com o CC bioprecipitado. B) cristais finos de CC precipitados na amostra de areia e peneirados pela peneira #200. C) amostra de areia biotratada com *S. pasteurii*. D) amostra controle negativo. Nota: controle negativo: areia com meio VP+ureia/ CaCl_2 e sem microrganismo.

Outra parte do carbonato precipitado foi observada como cristais finos passando na peneira #200 (Figura 4-19B), misturados com as amostras de areia (sem cimentar os grãos), fazendo com que a amostra mude da cor branca para a creme (Figura 4-19C). Nas amostras dos experimentos controle os grãos de areia permaneceram desagregados, sem mudanças aparentes (Figura 4-19D).

Nas amostras de bentonita (Figura 4-20) do mesmo jeito que nas amostras de quartzo, foi evidente a precipitação de carbonato de cálcio como grãos de hábito lamelar, de vários milímetros de comprimento e poucos milímetros de espessura (Figura 4-20 C), assim como grãos pequenos entre ou sob os aglomerados de bentonita (Figura 4-20 A), mostrando uma aparente textura mosqueada de carbonato de cálcio numa matriz de bentonita.



Figura 4-20. Evidência visual da cimentação da bentonita biotratada e comparação com o controle negativo. A) bentonita biotratada com *B. cohnii*, com textura mosqueada pela precipitação de CC. B) amostra de bentonita controle C) bentonita com CC de hábito lamelar.

Também foi possível observar a formação de agregados na bentonita biotratada (Figura 4-20 A) e a ausência total destes na amostra de bentonita do controle abiótico (Figura 4-20 B). Além disto, foi possível perceber que as amostras tratadas biologicamente secaram ao ar em aproximadamente cinco dias, mostrando uma textura terrosa, porém aquelas sem tratamento permaneciam úmidas após esse tempo, mostrando uma textura de dessecação típica (Figura 4-21).

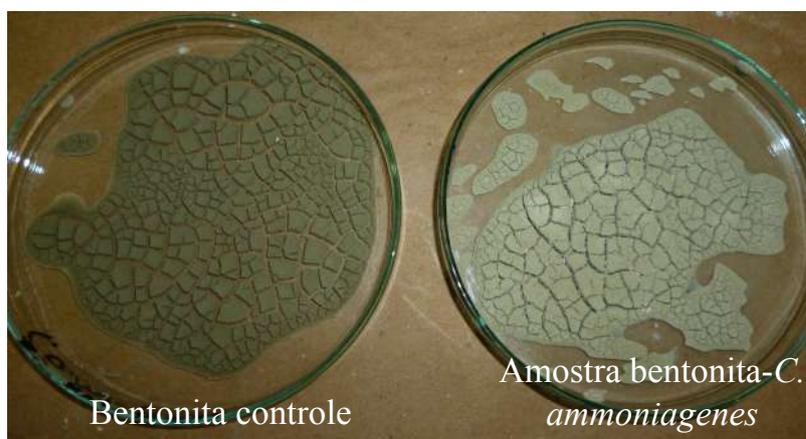


Figura 4-21. Secagem das amostras de bentonita depois de 5 dias. A amostra controle ainda com umidade, enquanto que a amostra de bentonita biotratada é observada seca e com textura terrosa.

As diferenças observadas entre as amostras da bentonita controle e a biotratada, em relação com a agregação das partículas e a umidade, podem ser atreladas a diferenças na sucção como consequência do tratamento microbiológico.

Nas amostras de caulim, macroscopicamente não foram observadas evidências de precipitação ou cimentação, após a submissão ao processo biológico (Figura 4-22).



Figura 4-22. Comparação amostras de caulim depois do tratamento. Amostra controle caulim e amostra caulim biotratada com *S. pasteurii*, sem evidencia de cimentação.

4.3.2 Comportamento do pH do meio líquido

✓ Amostras biotratadas: A Figura 4-23, apresenta o comportamento do pH durante os 15 dias dos bioensaios usando areia de quartzo, caulim e bentonita em suspensão e biotratados com *S. pasteurii*, *B. cohnii* e *Cammoniagenes*, incluídos os controles negativos. Nesta figura pode se observar, de forma geral, que o comportamento em todos os experimentos quanto ao pH é similar com pequenas variações entre os experimentos usando minerais diferentes, mostrando uma queda inicial nos primeiros dias, depois da qual o pH aumenta até atingir valores médios em torno de 8 (similar ao observado nos experimentos de triagem) até o final dos experimentos. Na areia de quartzo o comportamento foi diferente, com pH quase constante entre as 24 h e o dia 6.

Fica evidente a partir dos resultados de pH em todos os experimentos, que existe um efeito claro dos microrganismos quando são comparados os dados com os experimentos de controle negativo (abiótico). Observa-se nos resultados das amostras controles uma pequena queda no pH com o tempo, chegando até o valor de estabilidade em torno de 8, e não se observa a queda inicial evidente nos experimentos usando microrganismos.

As diferenças entre os experimentos com os diferentes minerais são explicadas a seguir:

Nas amostras dos ensaios usando a areia de quartzo (Figura 4-23A), a partir das duas horas, o pH diminui rapidamente até o dia 1 (24 h) atingindo um pH~ 7,7, sendo que depois continua quase constante entre o dia 1 e o dia 6, depois do qual aumenta rapidamente até o dia 9, e se mantém praticamente estável em pH ~8,2 até o final do experimento. Vale a pena notar que nestes experimentos, entre o dia 1 e o dia 6, o pH

do meio líquido é muito perto ao PCZ da areia (7,9). Nos experimentos usando a linhagem de *B. cohnii*, o aumento do pH começa mais rápido (dia 3), mas é menos pronunciado do que nos ensaios com as outras duas cepas.

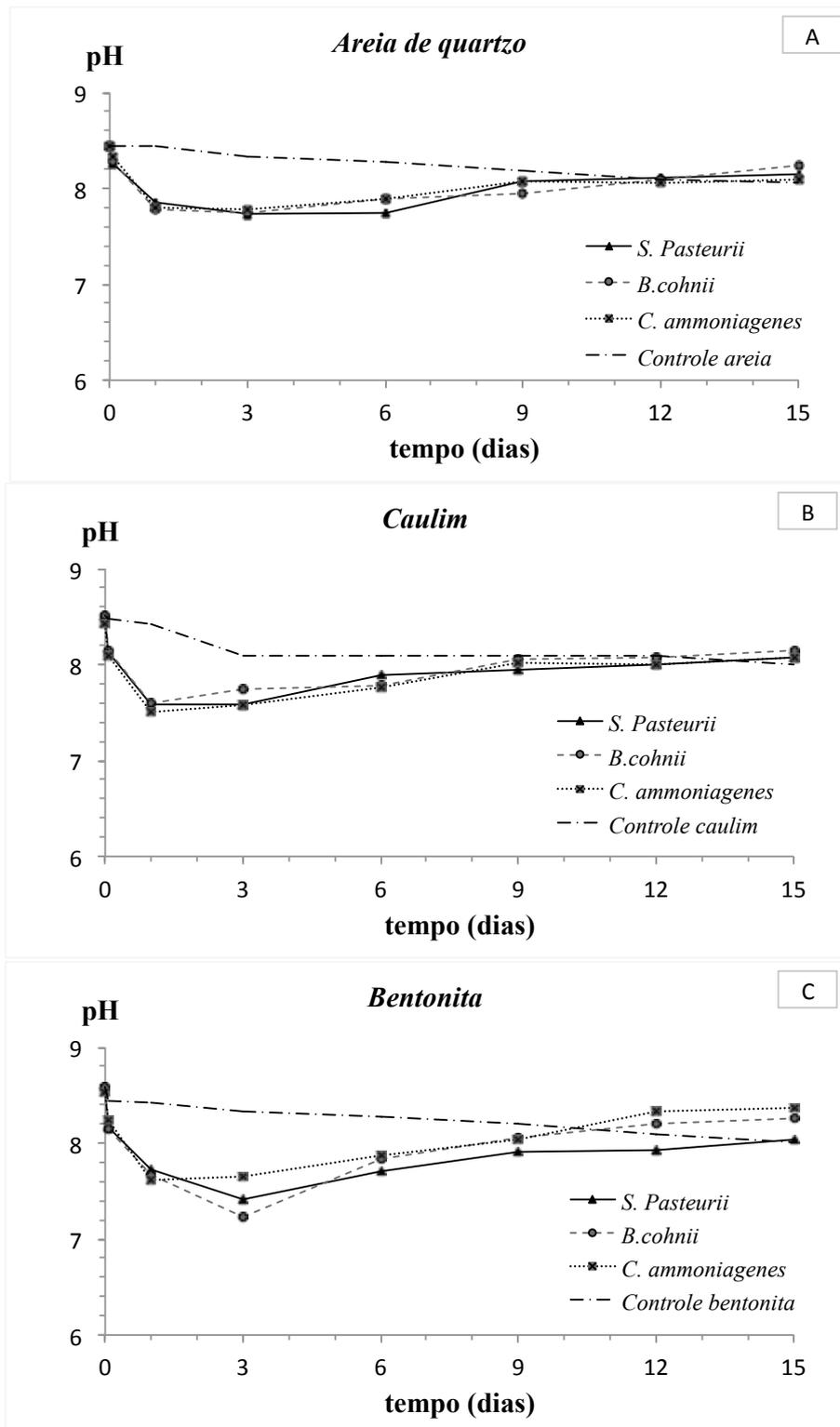


Figura 4-23. Comportamento do pH no tempo, dos bioensaios de solos em suspensão. Nota: A) areia, B) caulim e C) bentonita.

Chama a atenção que nestes ensaios o pH não aumentou depois do dia 1, como foi observado nos ensaios do triagem, possivelmente devido a algum efeito como consequência de que nos ensaios de triagem não houve controle de pH no início. Também, a ordem para a preparação dos experimentos foi um pouco diferente, sendo que no triagem, ao meio de cultura foi agregado o mineral, seguida pela linhagem, para finalmente agregar a ureia e o cálcio, já nos ensaios deste item, inicialmente ao meio de cultura foi agregado a ureia, o cálcio e o mineral, então o ajuste de pH foi feito e finalmente foi adicionado o microorganismo. Aparentemente estas pequenas mudanças no procedimento alteraram incipientemente o comportamento quanto ao pH dos experimentos, porém aparentemente este fato não fez com que a precipitação de carbonato de cálcio fosse afetada, o que é evidente nos resultados dos controles positivos que serão apresentados posteriormente. Isso indica que aparentemente o pH por si só não é condicionante para determinar a capacidade para a precipitação de carbonato de cálcio, assim como foi sugerido por Van Paassen (2009).

Nos ensaios usando o caulim (Figura 4-23B) o pH diminui rapidamente até o dia 1 (24 h) onde é observado um pH ~7,5, valor um pouco menor do que aquele observado para os experimentos onde foi usada a areia de quartzo, depois do qual este aumenta lentamente até o dia 9, e é mantido praticamente estável em pH ~8, até o final do experimento. Novamente, é observado, que nos experimentos usando a linhagem de *B. cohnii*, o aumento do pH começa mais rápido, mas é menos pronunciado do que nos ensaios com as outras duas cepas.

Nos testes usando a bentonita (Figura 4-23C) o pH diminui rapidamente até o dia 3 (72 h), atingindo valores diferentes para os experimentos com as diferentes linhagens, com valores em torno de 7,55, 7,45 e 7,25 para os experimentos com *C. ammoniagenes*, *S. pasteurii* e *B. cohnii*, respectivamente, mostrando os menores valores de todos os experimentos, se comparados os três minerais. Depois desta queda, o pH aumenta rapidamente nos experimentos usando *B. cohnii* e mais lentamente naqueles com *S. pasteurii* e *C. ammoniagenes*, até o dia 9, tentando se estabilizar em pH~8,1 até o final do experimento. A partir dos resultados de pH, aparentemente o comportamento é diferente nos ensaios usando a cultura de *C. ammoniagenes*, onde o pH diminui só até no dia 1(24 h) com um pH~ 7,6, e depois aumenta lentamente até o dia 12, alcançando pH um pouco maior, em torno de 8,4.

O comportamento geral do pH foi semelhante no caulim e na bentonita, e foi diferente na amostra de areia, que apresentou pH quase constante entre as 24 h e o dia 6. Este comportamento poderia estar relacionado com o ponto de carga zero, que no caso da areia é de PCZ=7,9, e os pHs do meio líquido estiveram sempre pertos a este valor (pH entre 7,7 e 8,2). Entanto que, na bentonita e o caulim, os valores de pHs do meio líquido estiveram bem acima do PCZ destes solos, PCZ=6,2 na bentonita e PCZ=2,7 no caulim.

Com este comportamento do pH, e levando em conta que a diminuição do pH no início do ensaio marca o início da precipitação de carbonato de cálcio (Van Paassen, 2009), é esperado que nos resultados das medições do cálcio em solução, às duas horas seja refletido o esgotamento de cálcio. Vale a pena notar que no geral não houve grandes diferenças entre os resultados dos ensaios usando as diferentes culturas para cada mineral.

✓ *Controles sem microrganismos*: os controles negativos ou abióticos, indicaram em todos os casos, que definitivamente os ensaios bióticos estavam ativos, já que em todos eles o pH diminui ligeiramente desde o início até o final do experimento (o menor valor de pH foi de 8), em contraste, com a rápida diminuição do pH em todos os bioensaios, entre as duas horas (2h) e o dia 3, sendo 7,2, o menor valor de pH. Vale a pena notar que para o caso dos ensaios abióticos usando caulim, o pH mostra valores menores do que aqueles observados para os experimentos com quartzo e bentonita (os quais apresentam um comportamento praticamente idêntico).

✓ *Controles sem mineral*: o comportamento do pH nos controles positivos, usando *S. pasteurii*, *B. cohnii* e *C. ammoniagenes*, é apresentado na Figura 4-24.

Nestes experimentos o pH diminui rapidamente a partir do início do experimento (pH de 8,5) até o dia 3 com pH de 7,7, 7,6 e 7,4, nos ensaios com *S. pasteurii*, *C. ammoniagenes* e *B. cohnii*, respectivamente. A partir desse momento ele volta rapidamente a aumentar até atingir um pH de 8,3, quase o pH inicial, depois de 15 dias. Este comportamento é similar àquele observado para os ensaios com minerais, porém com algumas diferenças, como a que o pH no dia 1 é maior do que aquele observado na maioria dos ensaios com microrganismos e a queda e posterior aumento no pH dos controles positivos foi quase sempre posterior àquele observado nos ensaios com microrganismos, com exceção dos experimentos usando as linhagens de *B. cohnii* e *S. pasteurii* em bentonita.

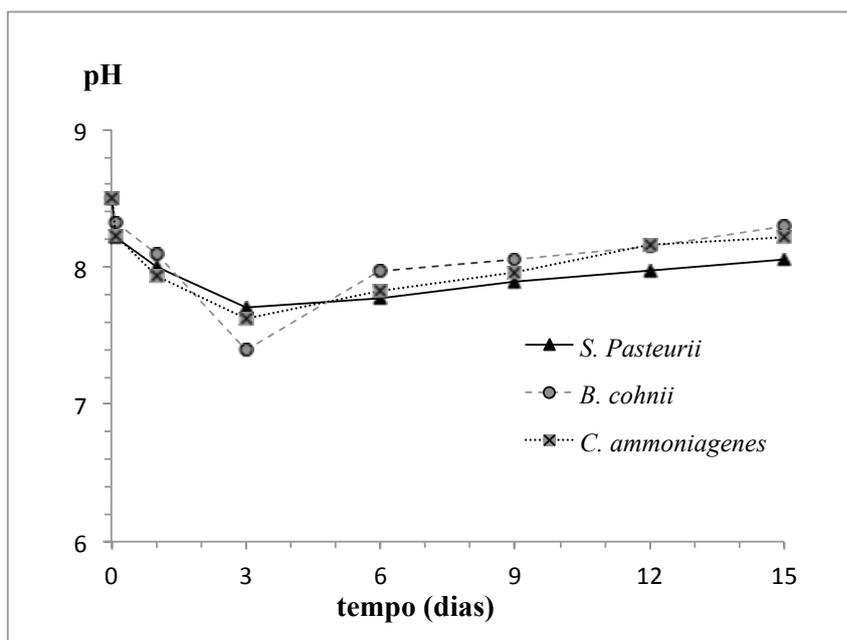


Figura 4-24. Comportamento do pH – tempo nos controles positivos usando *S. pasteurii*, *B. cohnii* e *C. ammoniagenes*. Nota: ensaios sem substrato mineral.

4.3.3 Comportamento do cálcio em solução.

A solução de cimentação fornecida em todos os experimentos, tem como fonte de cálcio o cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,25 M, que corresponde a uma concentração de cálcio inicial de ~10000 mg/l.

Os valores de cálcio em solução, correspondente ao tempo 0h posteriormente à adição do mineral, foram diferentes para os três bioensaios, usando os diferentes substratos minerais, e sempre menores que 10000 mg/l, sendo que para os experimentos com a areia de quartzo 9931 mg/l, para os experimentos com o caulim 9209 mg/l e 8996 mg/l para aqueles com bentonita, indicando que aparentemente se deu uma incipiente precipitação de carbonato de cálcio, diferente para cada substrato mineral ainda no início do processo ou possivelmente uma parte do cálcio foi utilizado no início para troca catiônica.

A Figura 4-25 mostra o comportamento no tempo da percentagem de cálcio no meio líquido, para os diferentes substratos minerais, onde A) areia de quartzo, B) caulim e C) bentonita, biotratados com cepas de *S. pasteurii*, *B. cohnii* e *C. ammoniagenes*, incluídos os controles negativos. A percentagem de cálcio foi calculada a partir das medições do cálcio em solução a cada tempo, em relação com a concentração inicial de cálcio.

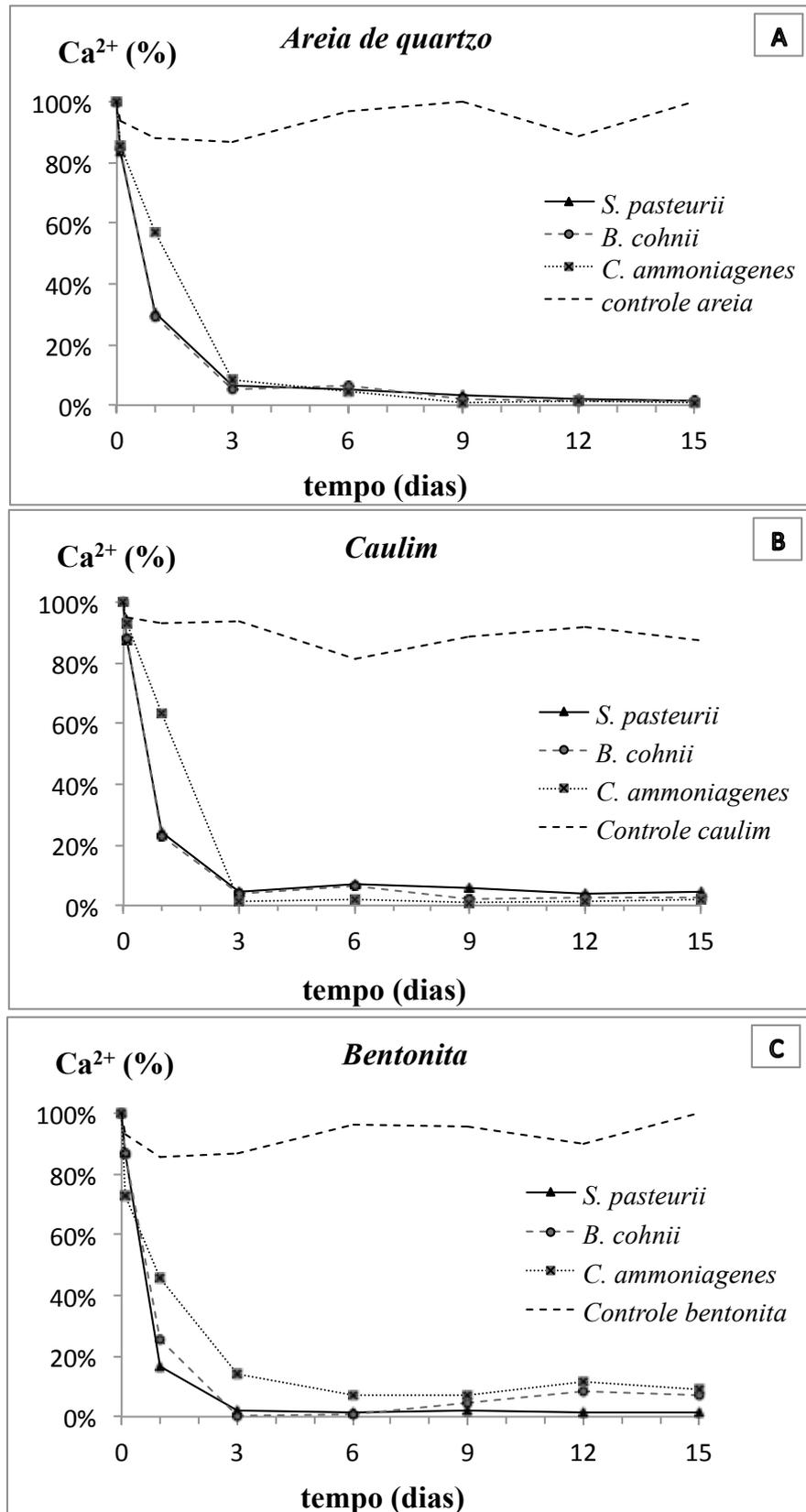


Figura 4-25. Cálcio em solução nos bioensaios de solos em suspensão. Nota (A) Areia, (B) Caulim, (C) Bentonita.

De maneira detalhada, pode-se descrever o processo assim: depois de duas horas, o cálcio em solução no meio líquido em quase todos os experimentos é aproximadamente 85% do cálcio total, a exceção dos bioensaios com *C. ammoniagenes* no caulim (93% de Ca^{2+} disponível) e na bentonita (73% de Ca^{2+} disponível). Isto indica que passadas duas horas, 15% do Ca^{2+} foi removido do meio líquido, e foi utilizado para a precipitação de CaCO_3 em todos os bioensaios com areia de quartzo e nos bioensaios com *S. pasteurii* e *B. cohnii*, no caulim e na bentonita. É evidente também que nas amostras com *C. ammoniagenes*, o Ca^{2+} utilizado nas primeiras 2 h depende do substrato mineral, sendo que nos experimentos com o caulim apenas precipita 3%, nos do quartzo em torno de 14%, e naqueles com bentonita 27%. Possivelmente, no início do experimento, uma parte do cálcio poderia ter sido usado em troca catiônica.

Às 24 h (dia 1), o Ca^{2+} em solução, diminui rapidamente em todos os bioensaios utilizando *S. pasteurii* e *B. cohnii* e diminui ligeiramente nos bioensaios com *C. ammoniagenes*. Nos bioensaios utilizando *S. pasteurii* e *B. cohnii*, a percentagem disponível de Ca^{2+} , depende do substrato mineral: 24% no caulim, 30% nas amostras de quartzo e na bentonita, vê-se uma diferença entre as duas cepas, com 17% disponível nos ensaios com *S. pasteurii* e 26% disponível nos ensaios com *B. cohnii*. Nas amostras com *C. ammoniagenes*, o Ca^{2+} disponível no dia 1 é de 57% na areia de quartzo, 63% no caulim e 46% na bentonita, mostrando que os bioensaios com *C. ammoniagenes*, foram mais lentos em comparação com as outras linhagens. Já no dia 3, o conteúdo de cálcio disponível é inferior a 1000 ppm (10% de Ca^{2+} em solução) em todos os bioensaios, exceto nas amostras de bentonita biotratadas com *C. ammoniagenes*, com uma percentagem de Ca^{2+} disponível de 14%. De forma geral pode-se assegurar que os ensaios usando *C. ammoniagenes*, sempre foram mais lentos.

Já nos controles, a concentração de cálcio no meio líquido é mantida numa média de 96%, durante todo o processo. Este comportamento suporta o fato da precipitação de carbonato ser principalmente devida à ação dos microrganismos e não uma simples precipitação química.

O comportamento descrito confirma que no meio existem cátions de cálcio disponíveis para se ligar aos carbonatos e precipitar até 72 h (dia 3) depois do início do tratamento. Após este tempo, o cálcio disponível é inferior a 10%. Portanto, a MICCP nos solos

estudados, ocorre principalmente nos primeiros três dias do tratamento. Isto, para um sistema com um único fornecimento de microrganismos e reagentes.

Finalmente, pode se concluir que, embora existam pequenas diferenças entre os ensaios, aparentemente, de modo geral, não são evidentes grandes diferenças entre os resultados usando diferentes minerais.

4.3.4 Comportamento do oxigênio dissolvido no meio líquido.

A Figura 4-26, apresenta o comportamento do oxigênio dissolvido na solução, durante os 15 dias, nos bioensaios com areia de quartzo, caulim e bentonita, biotratados com *S.pasteurii*, *B. cohnii* e *C.ammoniagenes*, incluídos os controles negativos.

O oxigênio dissolvido na solução apresenta uma queda significativa as primeiras 24 h, em todos os substratos minerais, sendo que na areia e o caulim, o oxigênio está abaixo de 1 mg/l e na bentonita está entorno de 2 mg/l. O consumo de oxigênio pelos microrganismos é utilizado para a respiração celular, e conseqüente geração de CO₂ (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2012; Anbu *et al.*, 2016), sendo que este aumento do CO₂ favorece a precipitação do carbonato de cálcio, devido ao aumento do carbono inorgânico dissolvido (CID) na solução, um dos fatores necessários para a carbonatogênese (Castanier *et al.*, 1999). Se espera que neste período, desde as duas horas até o sexto dia, ocorra a maior precipitação de carbonato de cálcio.

A partir do sexto dia, é observado o aumento do OD novamente, que é interpretado como o começo da morte celular, evidenciado devido a que não tem consumo de oxigênio pelos microrganismos, pelo que o OD na solução volta a seu valor inicial, no dia 12. Devido a isso, a concentração de oxigênio é considerada uma medida indireta da biomassa (Doran, 1998).

É observado que nos ensaios usando a linhagem de *C. ammoniagenes* o consumo de oxigênio ao início do experimento é mais lento do que nos outros microrganismos.

Por outro lado, nos controles, a ausência de microrganismos faz com que o OD permaneça quase constante durante os 15 dias, em seu valor inicial de 6,5 mg/l. Mais uma vez, verifica-se que o processo é um processo de MICCP e não um processo de precipitação química.

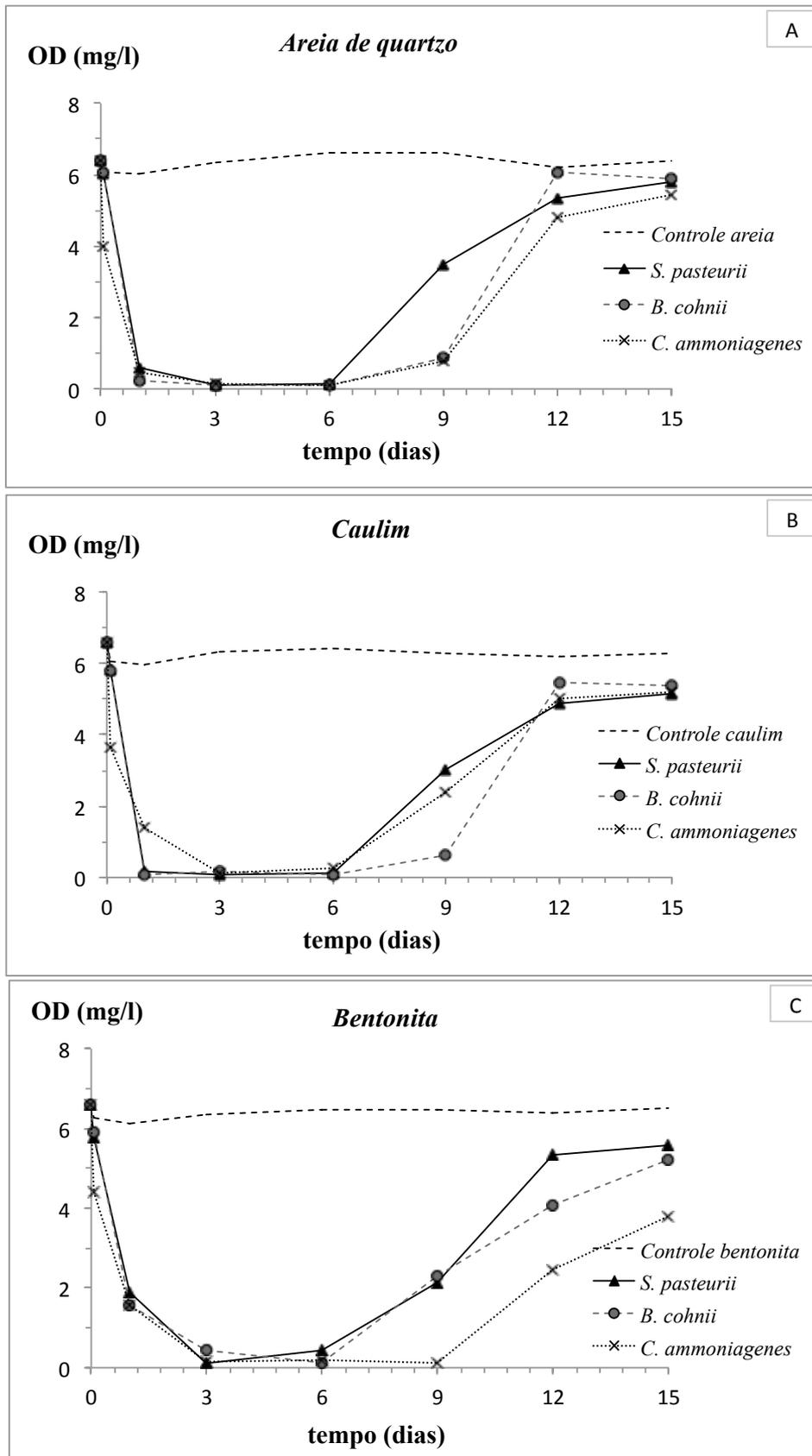


Figura 4-26. Comportamento do OD, oxigênio dissolvido nos bioensaios de solos em suspensão. A) Areia, B) Caulim, C) Bentonita.

4.3.5 Análise comportamento do pH, cálcio em solução e oxigênio dissolvido

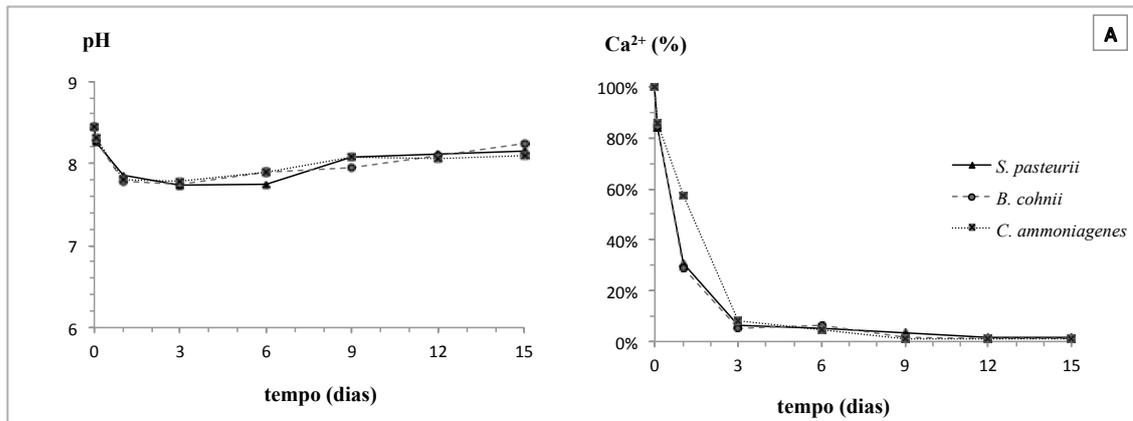
O comportamento geral do pH em todos os experimentos foi: na primeira etapa do processo uma diminuição tentando atingir um pH ligeiramente alcalino e uma segunda etapa com aumento do pH e posteriormente poucas variações, tentando se estabilizar no pH do início.

✓ *Amostras sem mineral:* nas amostras sem substrato mineral, no processo de precipitação de carbonato de cálcio, são observadas as duas etapas descritas por Van Paassen (2009). A primeira, uma diminuição rápida do pH nas primeiras 72 h (3 dias), desde pH~ 8,5 até um pH ligeiramente alcalino (pH~ 7,7), a segunda etapa, um aumento do pH, começando no dia terceiro até atingir um pH~8,3, quase o pH inicial, aos 15 dias, tempo onde, ainda não parece ter estabilizado. Estes resultados sugerem que o processo de precipitação ocorre desde o início do experimento e a partir das 72 h (dia 3) o cálcio é esgotado.

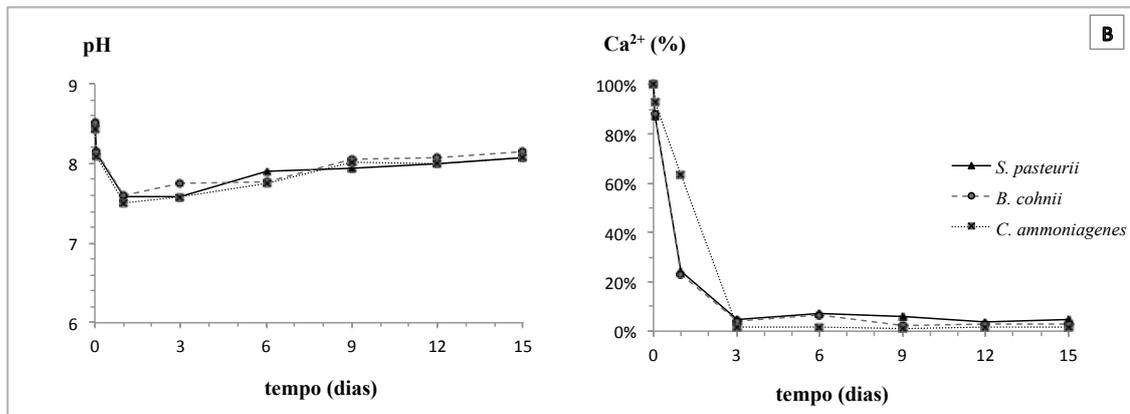
✓ *Amostras com substratos minerais:* os bioensaios com diferentes substratos minerais, apresentaram diferenças nos tempos de diminuição e aumento do pH e nos valores atingidos, e diferenças, não tão apreciáveis, no cálcio disponível e no oxigênio dissolvido. A Figura 4-27, mostra o comportamento pH e cálcio disponível, nos bioensaios como os três substratos minerais, onde pode se observar o seguinte:

- No solo predominantemente composto de quartzo areia, o pH diminui ligeiramente desde o início do experimento até as 2 h, sugerindo o início da precipitação de carbonato de cálcio. A gráfica do cálcio em solução, mostra uma disponibilidade de cálcio de 86% às 2h. Depois, ocorre uma diminuição rápida do pH até as 24 h, que é refletida no consumo do cálcio, de modo que entre as 2h e 24 h foi retirado do meio líquido 71% do cálcio, e conseqüentemente precipitado carbonato de cálcio, nos ensaios usando as linhagens de *B. cohnii* e *S. pasteurii*. Mais de 50% do cálcio foi precipitado as primeiras 24 h. Do dia 1 (24 h) até o dia 3 (72 h), o pH é quase constante e é precipitado 24% de cálcio adicional, faltando apenas 5% por precipitar. O cálcio é esgotado praticamente às 72 h, e a partir deste momento o pH sobe novamente. Nos bioensaios com a *C. ammoniagenes*, a precipitação do carbonato é mais lenta, porém às 72 h, resta o mesmo conteúdo de cálcio na solução do que nos ensaios usando os outros microrganismos (~6%). O comportamento do

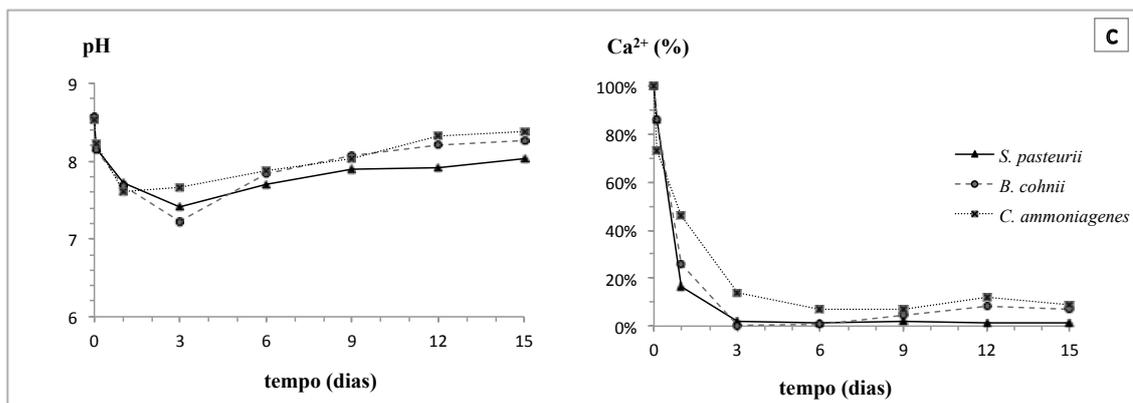
oxigênio dissolvido (Figura 4-26 A), mostra o máximo consumo de oxigênio pelos microrganismos nas primeiras 24 h (menor de 1 mg/l).



A. Comportamento do pH e o Ca²⁺ nas amostras de areias de quartzo.



B. Comportamento do pH e o Ca²⁺ nas amostras de caulim.



C. Comportamento do pH e o Ca²⁺ nas amostras de bentonita.

Figura 4-27. Comparação comportamento pH e Ca²⁺ disponível no meio. A) areia de quartzo, B) caulim, C) bentonita.

- No solo predominantemente composto de caulinita, o pH diminui rapidamente nas primeiras 24 h e imediatamente sobe de novo o que é interpretado como uma maior

taxa na hidrólise da ureia e uma maior geração de NH_4 , no caulim que no quartzo, onde o aumento do pH inicia às 72 h, porém no comportamento do esgotamento do cálcio estas diferenças não são percebidas.

- No solo predominantemente composto de montmorilonita, na amostra com *C. ammoniagenes*, o pH diminui rapidamente nas primeiras 24 h, e, nos bioensaios com *B. cohnii* e *S. pasteurii*, o pH diminui até o dia 3 (72 h). No entanto, no comportamento do esgotamento do cálcio estas diferenças não são significativas, sendo que só nos testes usando a linhagem de *C. ammoniagenes* em bentonita, às 72 h ainda tem 14% de cálcio disponível em solução. Estes dados concordam com o comportamento do oxigênio dissolvido nos ensaios com a linhagem de *C. ammoniagenes*, que tardou, nos ensaios usando bentonita, mais 24 h do que as outras cepas em iniciar a morte celular.

No resumo, as principais diferenças no esgotamento do cálcio, nos três substratos minerais, foram observadas às 24 horas; na bentonita foi removido 71% enquanto que no caulim e na areia, foram semelhantes, ~62% de cálcio removido. Porém, passadas 72 h do início do experimento, as diferenças não foram apreciáveis.

Nos controles, foi observada uma ligeira diminuição do pH e do cálcio disponível no tempo, mas estes permaneceram quase constantes durante os 15 dias. A diminuição do cálcio possivelmente foi devida a sua utilização para troca catiônica e/ou é possível que nas amostras abióticas o cálcio tente se nuclear e precipitar incipientemente carbonato de cálcio, mas existe uma grande diferença nos ensaios usando microrganismos, onde a reação de precipitação é catalisada, precipitando praticamente todo o cálcio em solução como carbonato de cálcio.

4.3.6 Caracterização mineralógica do precipitado nos controles positivos

Nos controles positivos (sem mineral) da *S. pasteurii*, *B. cohnii* e *C. ammoniagenes*, houve precipitação de um sólido branco, presumivelmente carbonato de cálcio, que foi analisado por FTIR e SEM/EDX.

4.3.6.1 Análises por FTIR

A Figura 4-28, apresenta os resultados do FTIR para o precipitado dos controles positivos com as cepas *S. pasteurii*, *B. cohnii* e *C. ammoniagenes*.

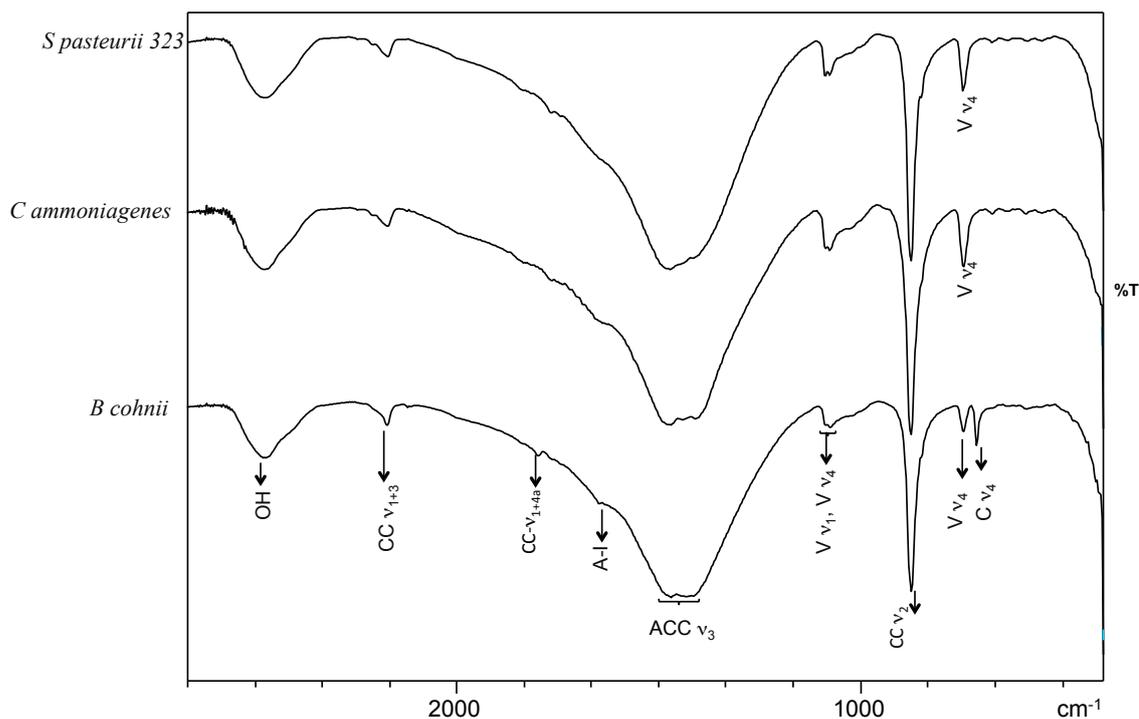


Figura 4-28. FTIR controles positivos (sem mineral). Nota: presença de carbonato de cálcio cristalino (CC ν_2) em $\sim 876 \text{ cm}^{-1}$ e carbonato de cálcio amorfo (ACC). V: vaterita, C: calcita.

Nos três espectros, observa-se a presença de uma banda de absorção de maior intensidade em $\sim 876 \text{ cm}^{-1}$, que corresponde a carbonato de cálcio cristalino (CC), modo de vibração ν_2 . Também observa-se a presença da banda específica e característica do polimorfo vaterita (V) em 745 cm^{-1} ($V\nu_4$), e outras típicas dos carbonatos de cálcio em 1086 e 1074 cm^{-1} ($V\nu_1$) e na região entre 1410 cm^{-1} e 1470 cm^{-1} ($V\nu_{3b}$ e $V\nu_{3a}$), sendo que estas últimas são também interpretadas como devidas a presença de carbonato de cálcio amorfo estável (ACC) (Addadi *et al.*, 2003).

É importante notar que também se identificou calcita (C), evidente mediante a banda bem definida em $C\nu_4 \sim 712 \text{ cm}^{-1}$, unicamente na amostra do precipitado do ensaio usando a linhagem de *B. cohnii*, apresentando maior intensidade do que a banda da vaterita em 745 cm^{-1} ($V\nu_4$), sendo que esta última banda ($V\nu_4$) na *B. cohnii* é de menor intensidade do que nas amostras provenientes dos ensaios usando as linhagens de *S. pasteurii* e *C. ammoniagenes*. Uma banda muito pequena (quase insinuada) de calcita (em 849 cm^{-1}) (Trushina *et al.*, 2014), é observada nos espectros usando as cepas de *B. cohnii* e *S. pasteurii*.

4.3.6.2 Análises MEV/EDX

Do precipitado dos controles positivos, foram preparadas seções polidas e observadas no MEV e foram feitas análises microquímicas pontuais com EDX. As imagens obtidas revelaram que nos três precipitados foi detectada a presença de carbonato de cálcio.

Na Figura 4-29 são apresentadas imagens do precipitado pela *S. pasteurii* e o *B. cohnii*, onde se observam carbonatos de cálcio com tamanhos entre 60 e 300 μm , assim como também grãos de forma esférica com tamanhos menores de entorno de 20 μm .

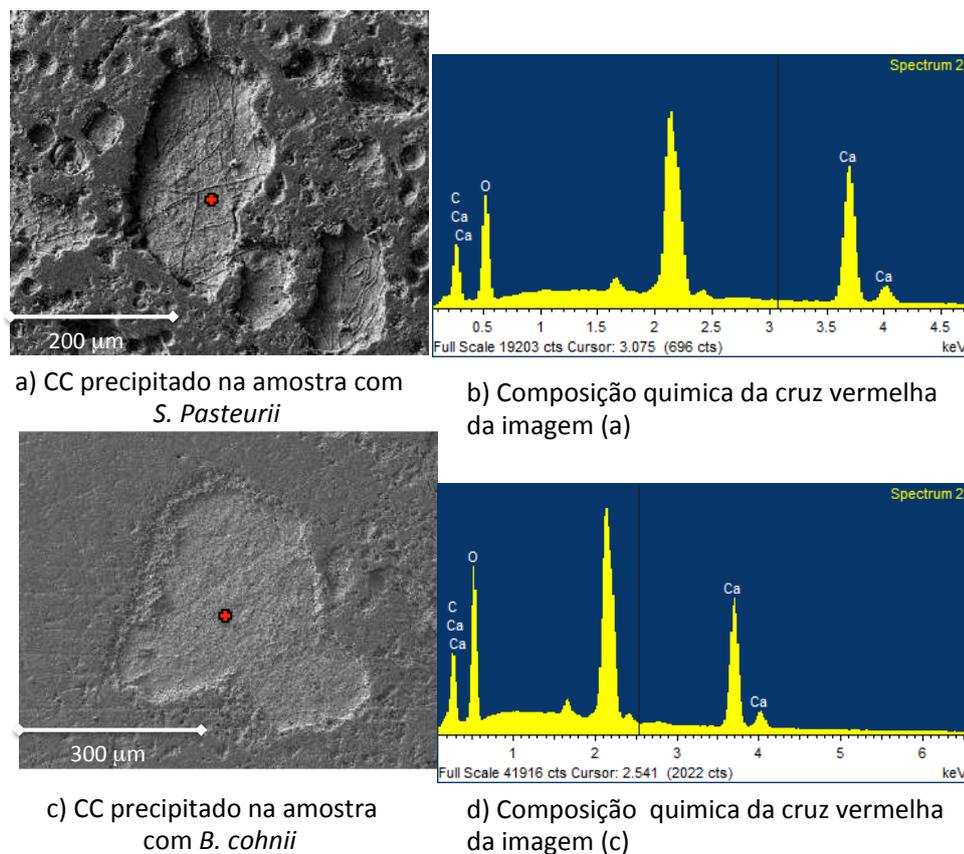


Figura 4-29. Imagens no MEV do CC bioprecipitado nos bioensaios com *S. pasteurii* e *B. cohnii* (imagem SE, em 200X). a) CC precipitado pela *S. pasteurii*, com tamanhos entre 60 e 280 μm . b) EDX pontual mostrando a presença dos elementos Ca, C e O na amostra. d) CC precipitado pela *B. cohnii*, com tamanhos entre 100 -300 μm d) EDX pontual mostrando a presença dos elementos Ca, C e O na amostra.

Na Figura 4-30 são apresentadas imagens do precipitado nos ensaios usando a linhagem de *C. ammoniagenes* onde se observaram carbonatos de cálcio com tamanhos ao redor de 40 μm , de forma esférica e outros de até 240 μm . O mapa composicional de elementos (EDX) mostra a presença principalmente de carbonato de cálcio, evidente

pela imagem de cálcio (laranja). Vale a pena mencionar que não foi detectada a presença de outros elementos diferentes além do Ca, nas amostras analisadas.

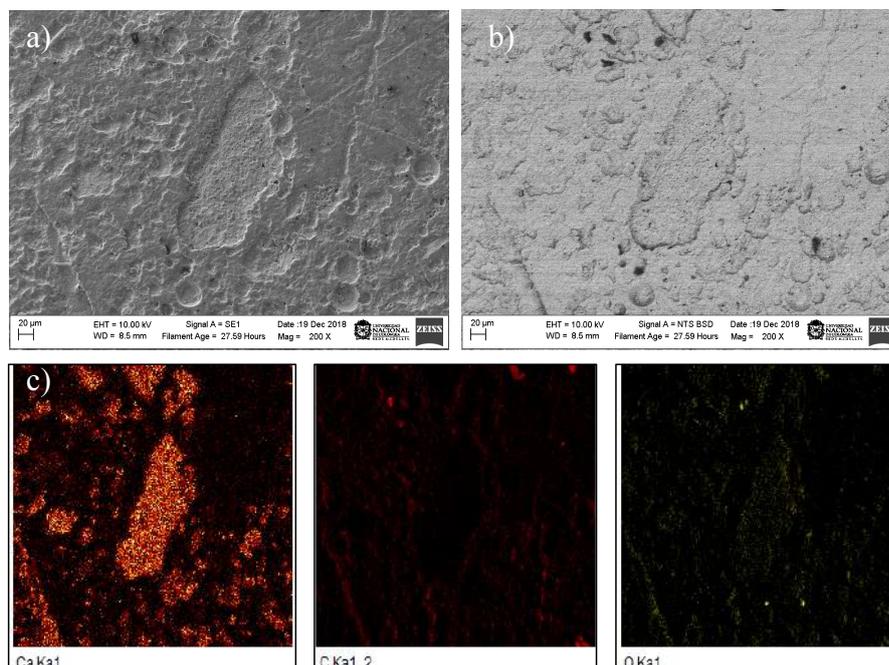


Figura 4-30. Imagens no MEV do CC bioprecipitado nos bioensaios com *C. ammoniagenes*. a) imagem SE, em 200X, do CC com tamanhos entre 40 e 240 μm . b) imagem BSE, em 200X. c) Mapa composicional de elementos obtido por EDX.

4.3.7 Solos biotratados por MICCP

4.3.7.1 Análises por FTIR

A Figura 4-31 mostra os resultados do FTIR da amostra proveniente dos ensaios usando o controle da areia de quartzo (linha pontilhada) e biotratadas usando as linhagens de *S. pasteurii*, *B. cohnii* e *C. ammoniagenes*.

Nos espectros das areias de quartzo biotratadas é evidente a presença de bandas de absorção correspondentes a quartzo (Q), além de bandas de absorção associadas ao carbonato de cálcio em estado cristalino (CC_{ν_2} , 876 cm^{-1}) e amorfo (ACC_{ν_3} , entre 1420 cm^{-1} e 1480 cm^{-1}), (Van der Marel e Beutelespacher, 1976; Andersen e Brecevic, 1991), que não foram identificadas no espectro da areia controle, como era de se esperar. Além disto, nas amostras provenientes dos ensaios com areia de quartzo tratada com culturas de *S. pasteurii* e *C. ammoniagenes*, foram observadas bandas de absorção de baixa intensidade na região entre $700 - 750\text{ cm}^{-1}$, interpretadas como devidas à banda absorção ν_4 típica da calcita (Van der Marel e Beutelespacher, 1976).

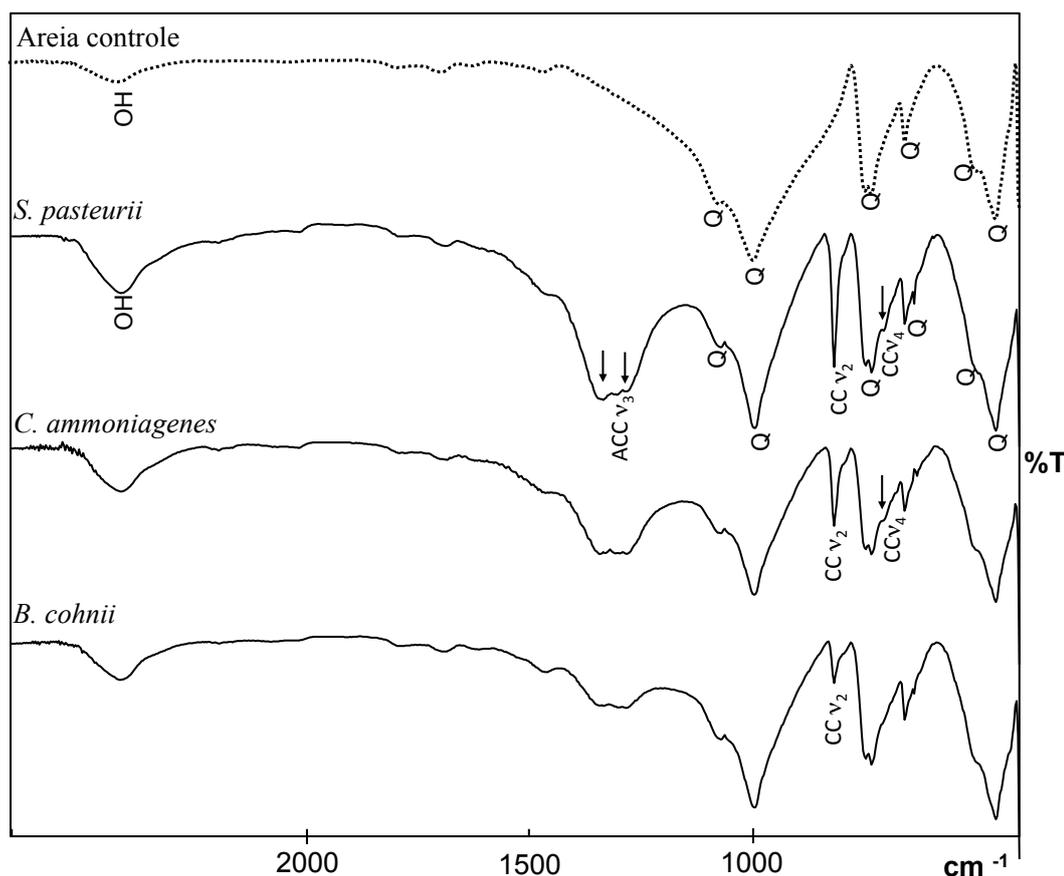


Figura 4-31. FTIR da areia de quartzo biotratada usando MICCP. Nota: ACC: carbonato de cálcio amorfo, CC: carbonato de cálcio cristalino, Q: quartzo.

Nas amostras de areia de quartzo biotratadas, a maior intensidade das bandas de CC e ACC e conseqüentemente a maior quantidade de CC precipitado, foi observada nas amostras provenientes dos ensaios usando a linhagem de *S. pasteurii*.

Devido à pronunciada banda de absorção do quartzo em 780 cm^{-1} , não foi possível observar nos espectros da areia de quartzo biotratada, as bandas de CCv_2 em 745 cm^{-1} ou 713 cm^{-1} correspondentes à vaterita e à calcita, respectivamente. No entanto, foi retirada uma amostra do sólido de grão fino que foi precipitado na areia e fez-se uma análise por FTIR (Figura 4-32). Os espectros FTIR, do precipitado de cor creme na amostra de areia de quartzo, apresentaram bandas de absorção correspondentes à vaterita (na areia biotratada com as cepas de *B. cohnii* e *S. pasteurii*) (Vv_4 , 745 cm^{-1}) e bandas de absorção correspondentes à vaterita (Vv_4 , 746 cm^{-1}) e calcita (Cv_4 , 712 cm^{-1}), na areia de quartzo tratada com a cultura de *C. ammoniagenes*.

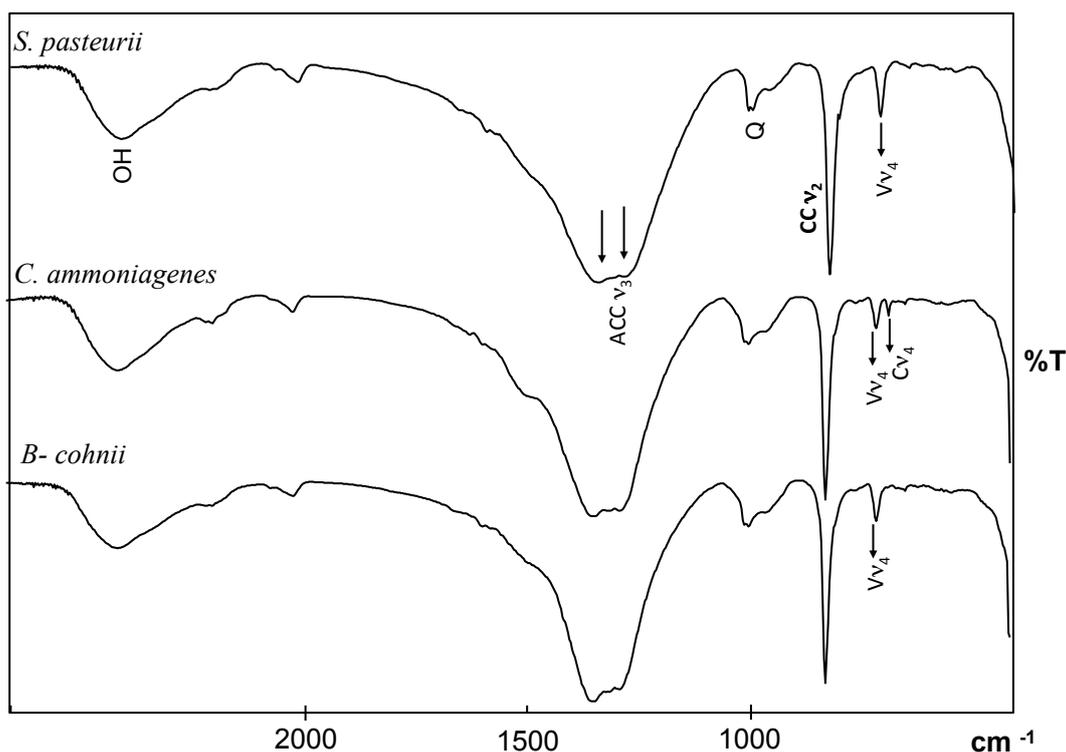


Figura 4-32. FTIR do precipitado de grão fino nas amostras de areia. Nota: ACC: carbonato de cálcio amorfo, CC: carbonato de cálcio cristalino, Q: quartzo, V: vaterita, C: calcita.

Estes resultados mostram que o polimorfo precipitado mudou aparentemente pela presença do mineral no meio. Deste jeito, no bioensaio usando *B. cohnii* (sem mineral) precipitaram calcita e vaterita, no entanto que nos ensaios com substrato mineral de quartzo precipitou unicamente vaterita. Por outro lado, nas amostras provenientes dos bioensaios usando *C. ammoniagenes* (sem mineral) precipitou principalmente vaterita, sendo que nestes mesmos usando substrato mineral foi identificada a presença de calcita.

A Figura 4-33 mostra os resultados do FTIR das amostras usando o controle caulim (linha pontilhada) e biotratadas com as cepas de *S. pasteurii*, *B. cohnii* e *C. ammoniagenes*. Em todos os espectros de caulim biotratado e o controle, foram observadas bandas do quartzo (Q) e da caulinita (K), além de que são evidentes bandas de absorção correspondentes a carbonato de cálcio em estado cristalino (CCv_2 , 876 cm^{-1}) e amorfo ($ACCv_3$, entre 1420 cm^{-1} e 1480 cm^{-1}), não sendo possível identificar o polimorfo de CaCO_3 bioprecipitado, devido seguramente à superposição das bandas de absorção da caulinita com as bandas características destes polimorfos do carbonato de cálcio, entre 700 e 750 cm^{-1} (CCv_4).

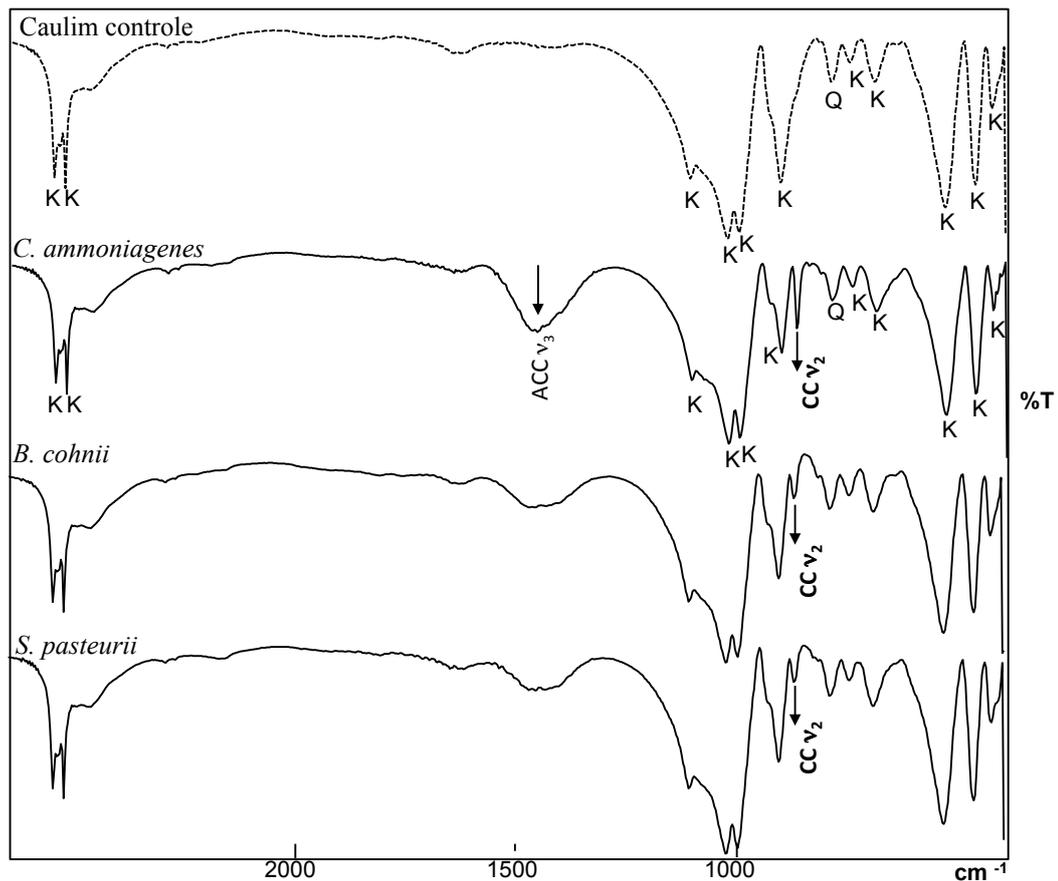


Figura 4-33. FTIR do caulim bio-tratado usando MICCP. Nota: ACC: carbonato de cálcio amorfo, CC: carbonato de cálcio cristalino, Q: quartzo, K: caulinita.

No intuito de identificar o polimorfo de carbonato de cálcio presente, foi retirada uma pequena amostra do sólido de grão fino, o qual precipitou nas paredes do Erlenmeyer, e fez-se uma análise por FTIR. Os resultados fizeram possível evidenciar nos espectros bandas de absorção correspondentes à vaterita nas amostras de caulim tratado com *B. cohnii* e *S. pasteurii* (Vv_4 , 745 cm^{-1}) e bandas de absorção correspondentes a vaterita (Vv_4 , 746 cm^{-1}) e calcita (Cv_4 , 713 cm^{-1}) no caulim tratado com a cepa de *C. ammoniagenes*.

A Figura 4-34 mostra os resultados do FTIR das amostras usando bentonita controle e biotratadas com as culturas de *S. pasteurii*, *B. cohnii* e *C. ammoniagenes*. Os espectros das amostras dos ensaios usando bentonita com tratamento e do controle são idênticos, mostrando as mesmas bandas de montmorilonita (M), misturada com quartzo (Q), caulinita (K) e um sinal em 1460 cm^{-1} , interpretado como correspondente a carbonato de cálcio (CCv_3).

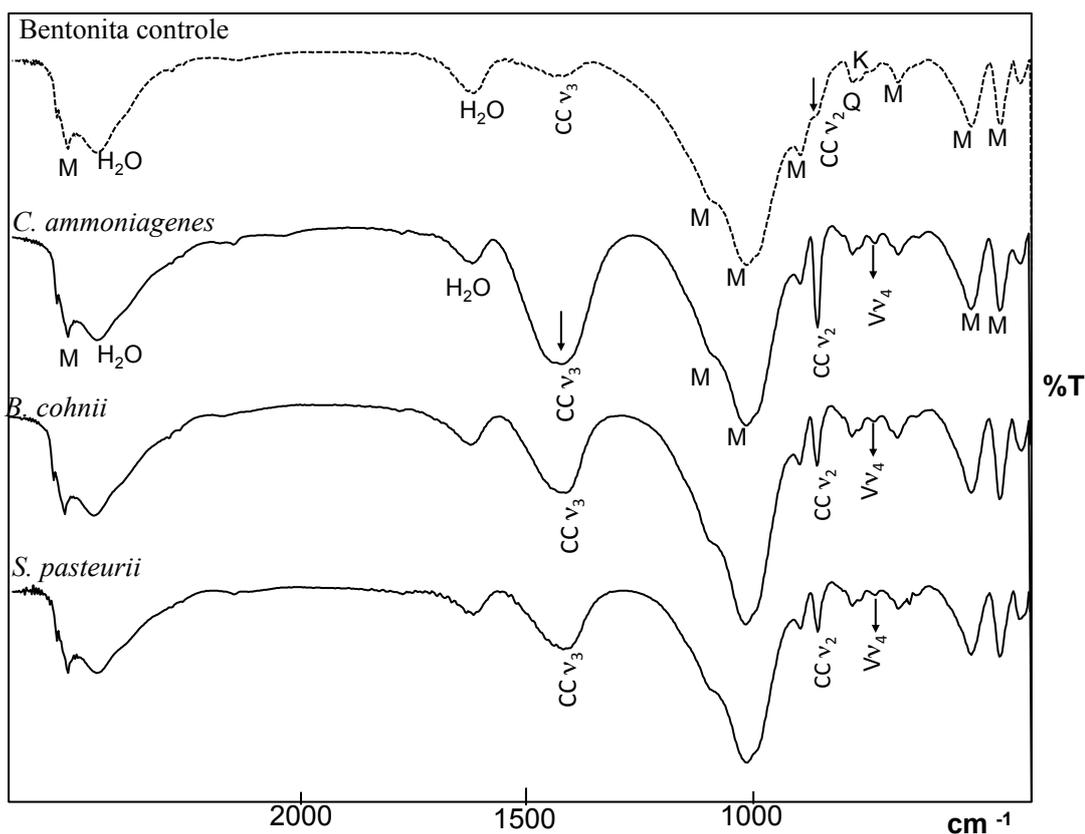


Figura 4-34. FTIR da bentonita biotratada usando MICCP. Nota: CC: carbonato de cálcio cristalino, V: vaterita, M: montmorilonita, Q: quartzo, K:caulinita.

Em todos os espectros das amostras usando bentonita biotratada por MICCP aparece uma banda de absorção correspondente ao carbonato de cálcio em estado cristalino (CCv_2 , 876 cm^{-1}). Este sinal de CCv_2 (876 cm^{-1}) é insinuado incipientemente no espectro da amostra de bentonita controle, mas nas amostras biotratadas, as bandas de absorção são claramente maiores. Uma nova banda de absorção interpretada como devida ao carbonato de cálcio é incipientemente insinuada só nos espectros das amostras com bentonita biotratada em 747 cm^{-1} , típica da ocorrência de vaterita (Vv_4), permitindo supor que o polimorfo precipitado nas amostras usando a bentonita é este.

Do mesmo jeito do que nas outras amostras dos outros ensaios, foi retirada uma amostra do sólido de grão fino precipitado nas paredes do Erlenmeyer nos ensaios com bentonita biotratada para fazer uma análise por FTIR. Estes espectros evidenciaram a presença de bandas de absorção correspondentes a vaterita (Vv_4 , 745 cm^{-1}) e calcita (Cv_4 , 713 cm^{-1}), nas amostras de bentonita tratada com os três microrganismos utilizados.

No resumo, nos bioensaios sem substrato mineral, precipitou vaterita com todos os microrganismos, porém, na amostra produto dos ensaios usando a linhagem de *B. Cohnii* foi identificada principalmente calcita. Nos bioensaios utilizando substratos minerais, o polimorfo de CC identificado em todos os espectros foi a vaterita, fase metastável do CC, mas houve diferenças na precipitação ou não da calcita. Nas amostras usando a areia de quartzo e caulim, foi precipitada calcita unicamente nos bioensaios com *C. ammoniagenes*, enquanto que, nas amostras com bentonita precipitou calcita com todos os microrganismos utilizados.

Na precipitação do CaCO_3 , podem ser formados diferentes minerais (diferente rede cristalina e produto de solubilidade), em função de muitas variáveis como a concentração dos microrganismos, a concentração da solução de cimentação, a temperatura, a atividade ureolítica e a supersaturação entre outros (Whiffin, 2004; Al-Thawadi, 2008; Van Paassen, 2009; Phillips *et al.*, 2013).

A precipitação de calcita nos bioensaios com *C. ammoniagenes*, poderia ser favorecida pela baixa atividade ureolítica, a qual foi refletida no comportamento do pH, cálcio em solução e o oxigênio dissolvido, com uma reação mais lenta em comparação com os outros dois microrganismos. Uma baixa taxa de hidrólise da ureia está relacionada com uma baixa supersaturação (Van Paassen, 2009) e portanto, nos ensaios com *C. ammoniagenes*, pode ter sido favorecida cineticamente a formação de calcita (mineral mais estável) (Kralj *et al.* em 1990 citado por Al-Thawadi, 2008). No contrário, a alta taxa de hidrólise da ureia da *S. pasteurii*, pode ter sido favorecida a precipitação de fases metaestáveis (ACC amorfo, $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e vaterita).

Por outra parte, algumas pesquisas sobre o efeito da granulometria e a mineralogia do substrato na formação dos polimorfos, mostraram que a presença de um substrato cálcico promove a formação da calcita e a presença de um substrato de silicato, promove a formação da vaterita (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2012; Lioliou *et al.* em 2007, citado por Van Paassen, 2009). Isto poderia explicar a precipitação de calcita em todas as amostras de bentonita independente do microrganismo utilizado. Vale lembrar, que segundo os análises por FTIR de caracterização dos minerais iniciais, na amostra original de bentonita foi identificada a presença de carbonato de cálcio.

4.3.7.2 Análises por Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

No mapa de elementos da amostra de areia de quartzo tratada com *S. pasteurii* (Figura 4-35), é possível observar a relação da textura entre os grãos quartzo (combinação de Si de cor azul e oxigênio de cor verde) e o carbonato de cálcio entre os grãos de quartzo (C em vermelho e Ca de cor laranja), indicado também pelas setas brancas na imagem MEV-SE.

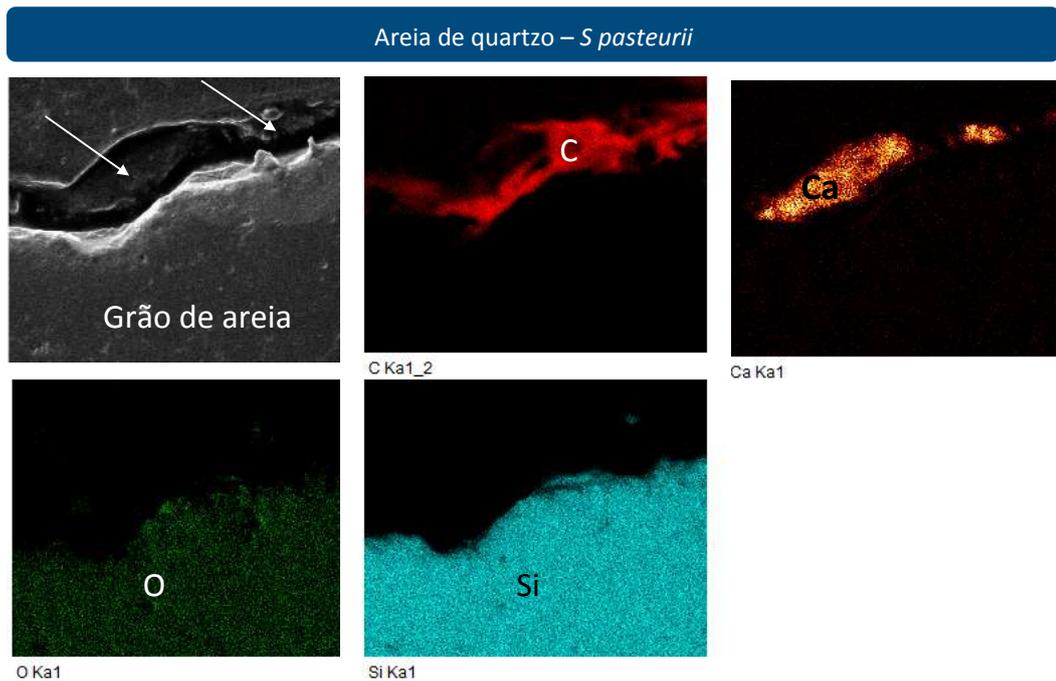


Figura 4-35. Mapa composicional obtido no MEV da amostra de areia de quartzo biotratada com *S. pasteurii*. O silício (Si, cor azul) e oxigênio (O, cor verde) na parte inferior, correspondem ao grão de quartzo e na borda do grão é observado o carbono (C, cor vermelho) e o cálcio (Ca, cor laranja), correspondente ao carbonato de cálcio nas áreas indicadas pelas setas brancas da imagem MEV-SE (acima a esquerda).

A Figura 4-36 mostra a imagem BSE da amostra de areia de quartzo biotratada com *C. ammoniagenes* onde foram observadas diferenças na composição química da amostra, refletidas nos diferentes tons de cinza, atribuídos à presença de carbonato de cálcio como cimento entre os grãos de quartzo. Da imagem mostrada na Figura 4-36, foi feito um mapa de composição de elementos (Figura 4-37), confirmando a existência do carbonato de cálcio. Os grãos de areia de quartzo, áreas com abundância de Silício (Si) e oxigênio (O), são ligados nos pontos de contato por o carbonato de cálcio, enchendo o espaços vazios entre os grãos.

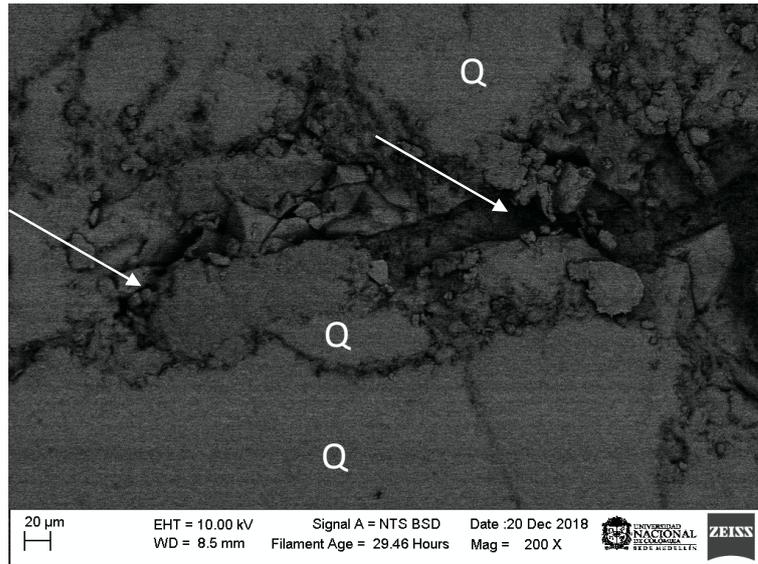


Figura 4-36. Imagem no MEV modo BSE da amostra de areia de quartzo biotratada com *C. ammoniagenes*. Grãos de areia de quartzo, Q (quartzo) e carbonato de cálcio nas áreas indicadas pelas setas brancas.

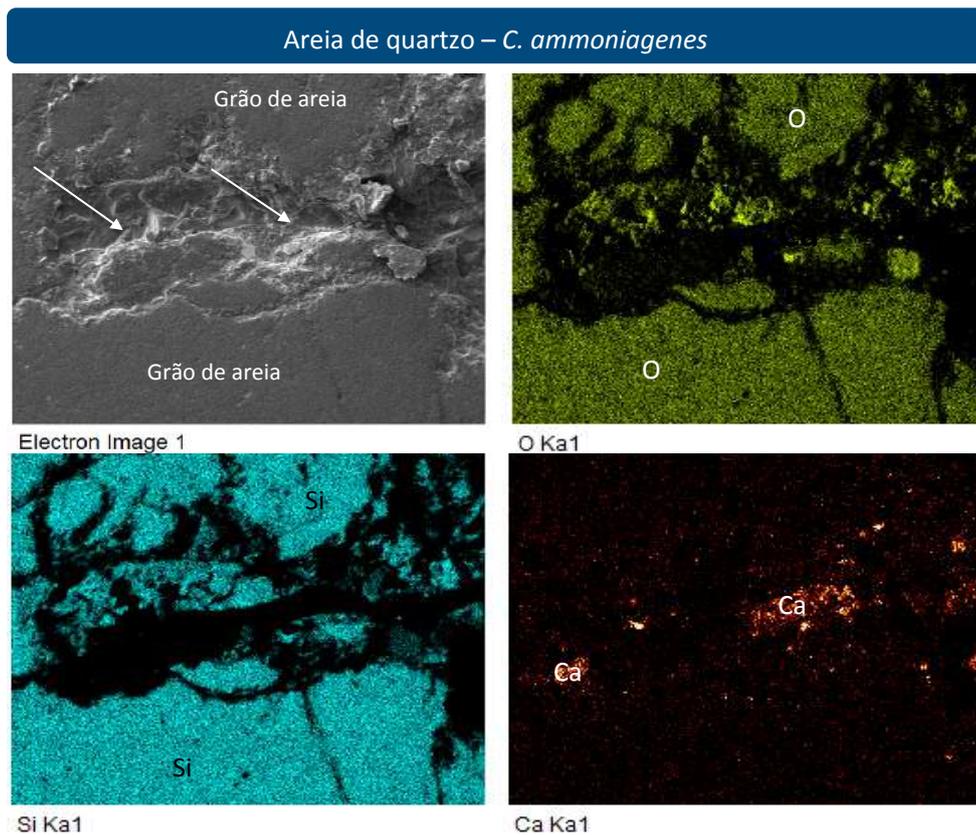
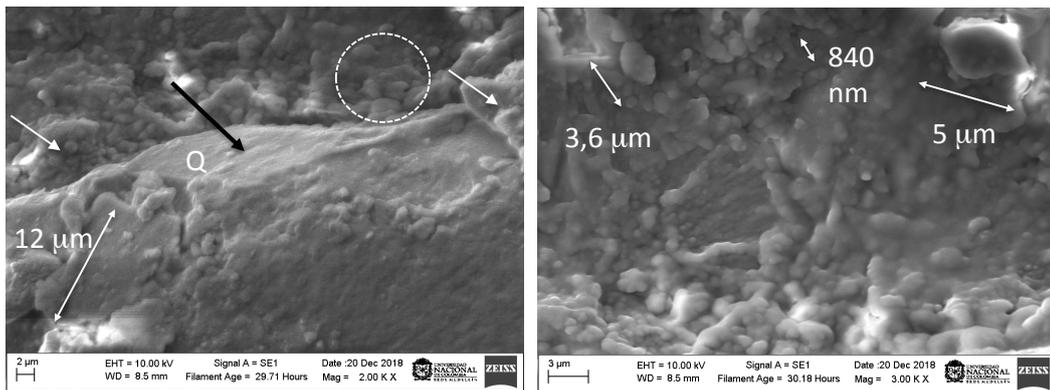


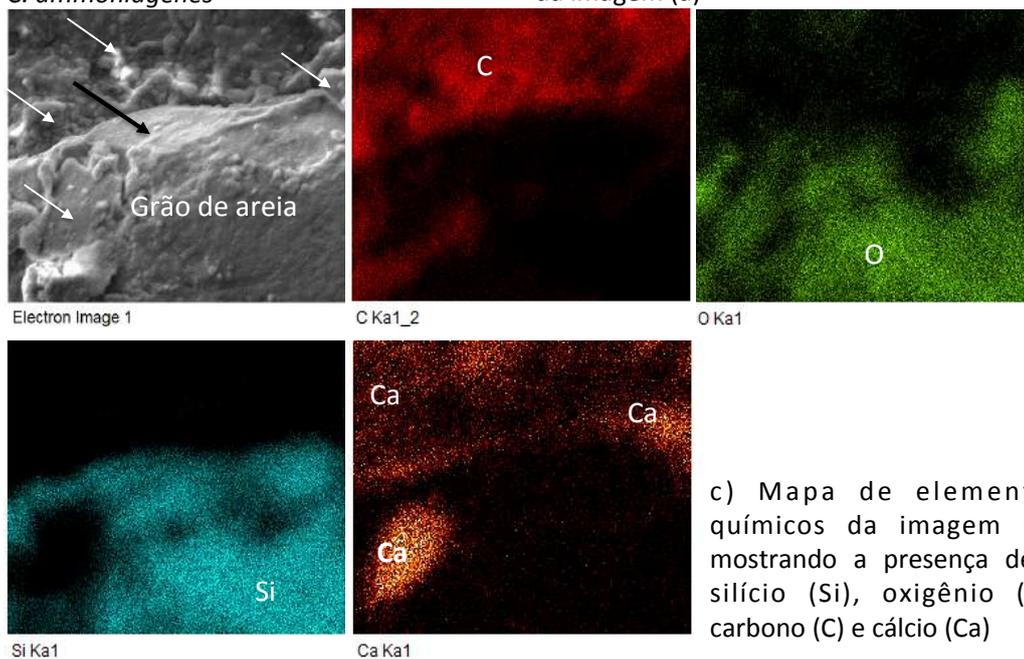
Figura 4-37. Mapa composicional obtido do MEV da amostra de areia de quartzo biotratada com *C. ammoniagenes*. O silício (Si, cor azul) e oxigênio (O, cor verde) correspondem a grãos de quartzo, no meio dos grãos precipitou carbonato de cálcio, nas áreas indicada pela setas brancas.

Na Figura 4-38 são apresentadas a imagem SE da amostra de areia de quartzo biotratada com *C. ammoniagenes*, onde são observados na imagem (a) um grão de areia de quartzo

(seta preta), recoberto pelo que parece um filme de hábito botrioidal de carbonato de cálcio (setas brancas). No topo da imagem, pode se observar uma área coberta completamente de carbonatos, que foi ampliada na imagem (b). No lado esquerdo do grão de areia (imagem a), é observada a presença de cálcio (mapa EDX), associada ao carbonato de cálcio de forma planar, de 12 μm de lado (possivelmente de calcita e/ou vaterita).



a) Imagem SE em 2000 X. Areia de quartzo - *C. ammoniagenes* b) Aumento em 3000 X da zona selecionada da imagem (a)



c) Mapa de elementos químicos da imagem (a), mostrando a presença de o silício (Si), oxigênio (O), carbono (C) e cálcio (Ca)

Figura 4-38. Imagem no MEV em modo SE das amostras de areia de quartzo biotratada com *C. ammoniagenes*. a) imagem em 2000 X, com CC de forma planar de 12 μm de lado, cobrindo o grão de areia (seta preta) e áreas cobertas por correntes de CC (setas brancas). b) imagem aumentada em 3000 X da zona selecionada em (a), com CC de forma oval e esférica, em tamanhos menores que 1 μm e até 5 μm . c) mapa de composição química onde é observada a zona de Si e O (quartzo) e a zona de Ca e C (CC).

Na imagem Figura 4-38b foram observados carbonatos de cálcio de forma oval e esféricos (textura botrioidal), com tamanhos de nanômetros (840 nm) e micrômetros (3

e 6 μm), formando correntes, associados a vaterita. Na imagem (c) é observado o mapa da composição química da imagem em (a), onde é evidente a presença dos grãos de quartzo (silício em azul e oxigênio em verde), recoberto pelo carbonato de cálcio (C em vermelho e cálcio em laranja).

Os anteriores resultados evidenciam a relação entre os grãos de quartzo e o carbonato, seja como precipitados o cimento do carbonato de cálcio entre os grãos de quartzo. Na amostra com *S. pasteurii*, o carbonato de cálcio foi precipitado na borda dos grãos da areia de quartzo e na amostra com *C. ammoniagenes*, foi precipitado cobrindo os grãos, e principalmente enchendo o espaço nos pontos de contato entre os grãos da areia, agindo como ponte.

Na Figura 4-39 são apresentadas varias imagens MEV-SE da amostra de caulim biotratada com *C. ammoniagenes*, em 200, 400 e 750 aumentos.

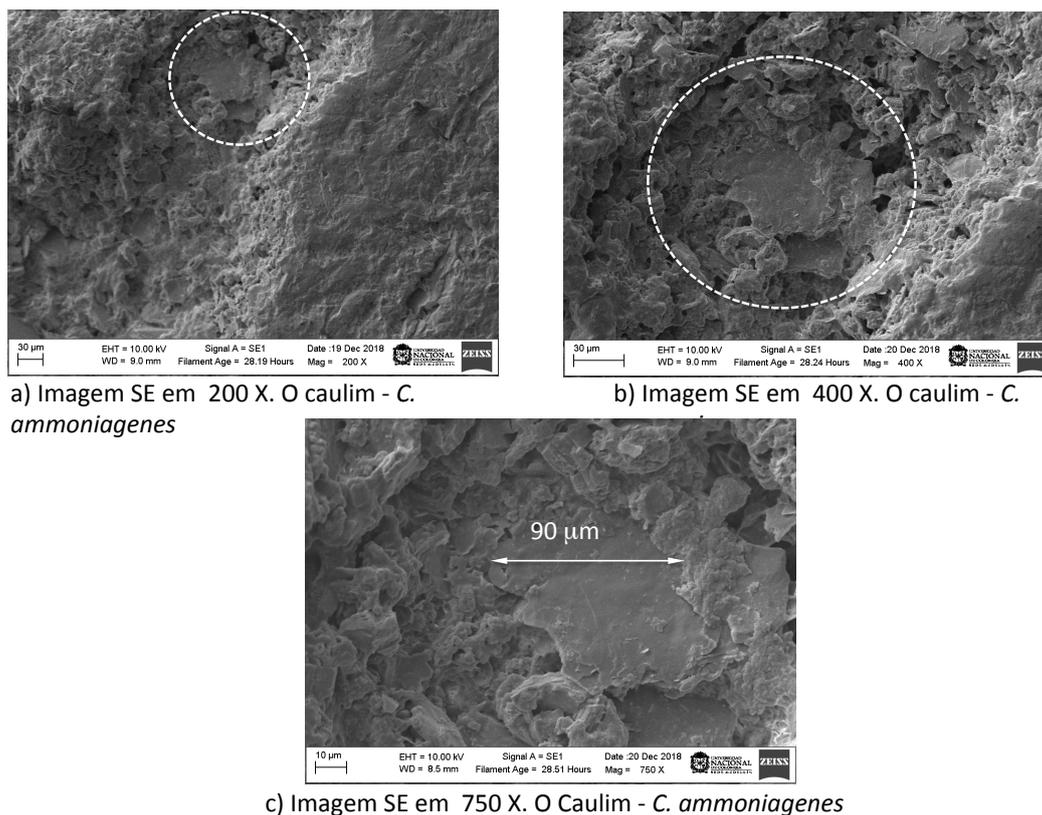


Figura 4-39. Imagem no MEV em modo SE das amostras de caulim biotratada com *C. ammoniagenes*. Imagem em 200 X, 400 X e 750 X.

Nestas foi observado um grão de hábito plano, de $\sim 90 \mu\text{m}$ de lado, que parece uma mistura de caulinita e carbonato de cálcio, coberto e rodeado por carbonato de cálcio de

hábito irregular, que (pela mistura de Al e Si nas análises de EDX) parece mais uma mistura íntima de fases (CC e caulinita presumivelmente), com mudanças nas proporções, já que em todas as análises é possível observar a presença tanto de Al e Si (caulinita) e Ca e C (carbonatos de cálcio), como é evidente na Figura 4-40. Desta maneira, segundo as análises EDX da Figura 4-40, a forma plana (espectro E2) está maiormente composta por alumínio, silício e oxigênio (Al, Si, O) possivelmente correspondente à caulinita, com pequenas quantidades de Ca e C (devido seguramente à presença de carbonato de cálcio em pequenas quantidades), uma massa de precipitado ao redor do grão plano, constituída principalmente por carbono, cálcio e oxigênio (C, Ca, O), devido à ocorrência de carbonato de cálcio (nos espectros E1 e E3) misturado com Al e Si em menor quantidade, devido provavelmente a que se têm uma mistura íntima entres as duas fases.

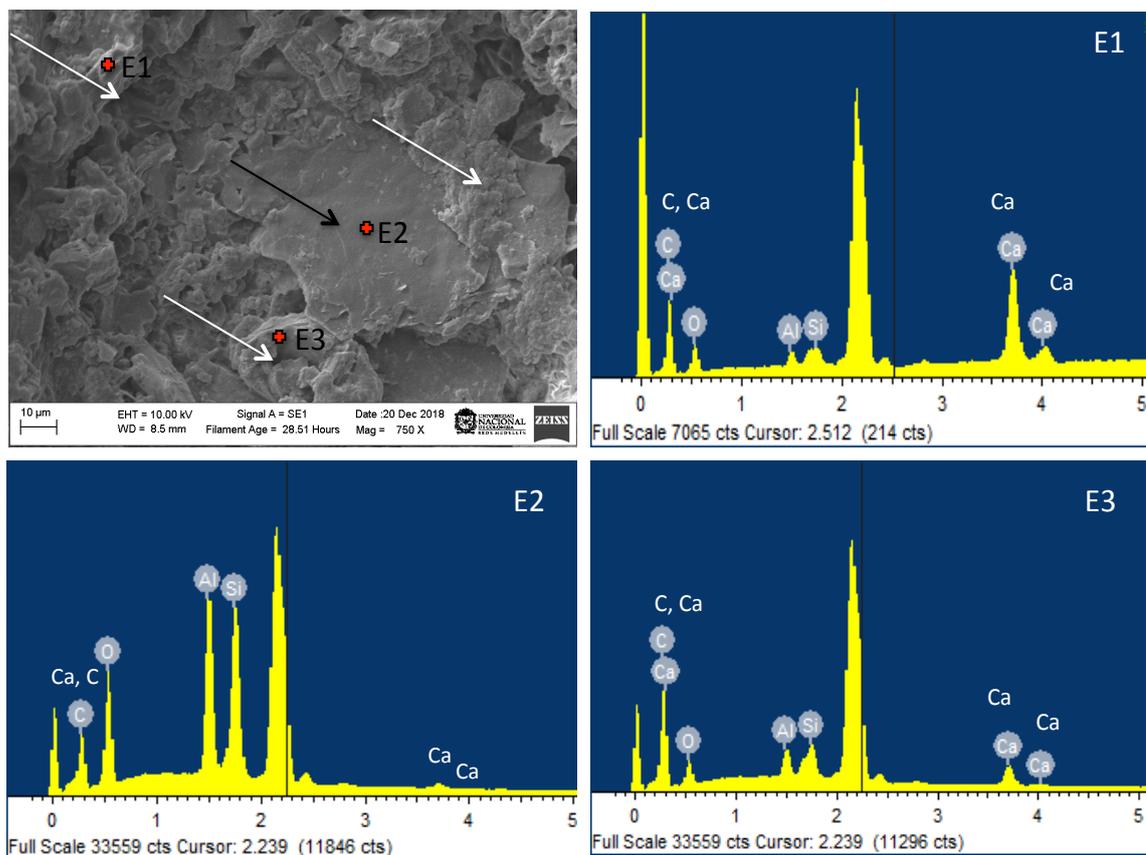


Figura 4-40. Análise EDX do caulim tratado com *C. ammoniagenes*. Espectros da composição química dos pontos E1, E2 e E3, mostrando a existência de carbono (C), oxigênio (O) e cálcio (Ca) misturado com silício (Si) e alumínio (Al), nos pontos E1 e E3, e mostrando no ponto E2 unicamente a presença de Si, Al, C e O, sem a presença de cálcio.

Estes resultados foram confirmados no mapa dos elementos da mesma área (Figura 4-41), que mostra além da presença de Al, Si e O em certos locais da imagem, uma

íntima correlação (intercrescimento) deles com Ca e C (além do mesmo O). Na Figura 4-41 as setas pretas indicam os locais onde predominam o Al, Si, no entanto que as setas brancas aqueles locais onde se tem predominantemente Ca.

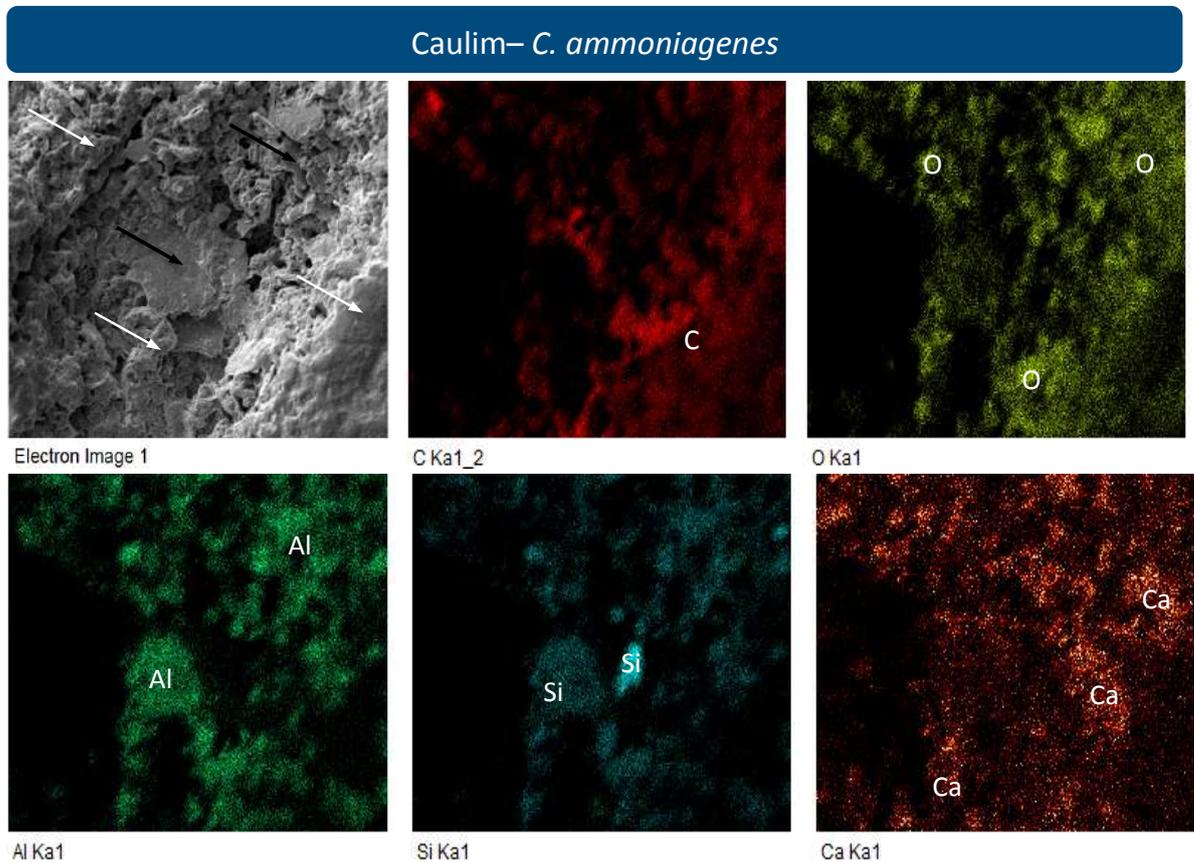


Figura 4-41. Mapa de composição química da amostra de caulim biotratado com *C. ammoniagenes*. Tem presença de alumínio carbono (C), oxigênio (O), alumínio (Al), silício (Si) e cálcio (Ca).

Na Figura 4-42 são apresentadas imagem SE da amostra de caulim biotratada com *S. pasteurii*, com 750 e 1780 aumentos. Na imagem (a) foram observados cristais de forma plana que, segundo o mapa composicional da Figura 4-43, são compostos principalmente de silício, alumínio e oxigênio (Si, Al, O), indicados pelas setas pretas, sendo que algumas áreas apresentam conteúdos de potássio (K) (provavelmente devido à presença de ilita ou muscovita misturada). O cálcio (Ca) foi observado em algumas zonas da parte esquerda da imagem. Na área central foi encontrada uma concentração de carbono (C) associada à presença de compostos orgânicos (ou carbonato de cálcio incipientemente precipitado ACC) e o que poderia ser a impressão de uma bactéria calcificada (bc).

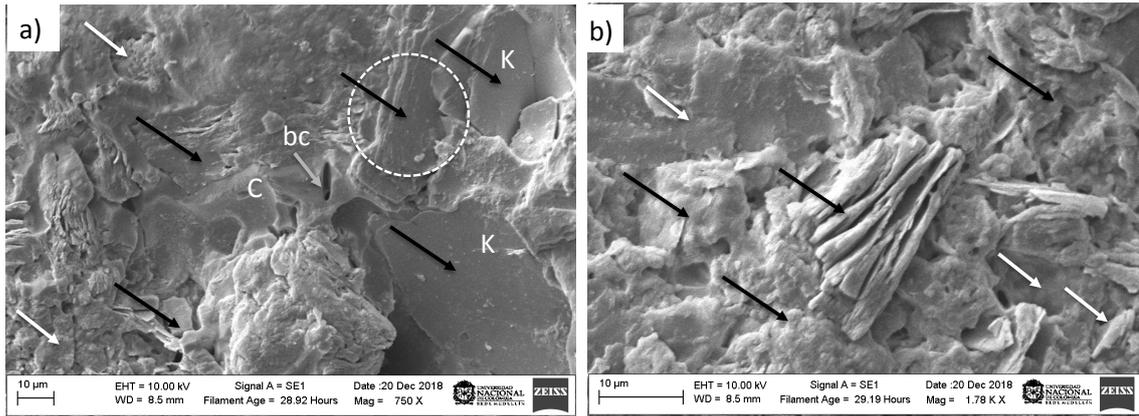


Figura 4-42. Imagem no MEV de amostras de caulim biotratada com *S. pasteurii* a) imagem em 750 X. As setas pretas indicam cristais planos associados a caulinita e alguns zonas tem concentração de potássio (K). No centro da imagem tem concentração de carbono (C), associado à presença de compostos orgânicos (bc: bactéria calcificada). b) imagem aumentada em 1780X da zona selecionada em (a), mostrando caulinita com forma de folhas (setas pretas). Em ambas imagens as áreas com carbonato de cálcio são indicadas pelas setas brancas.

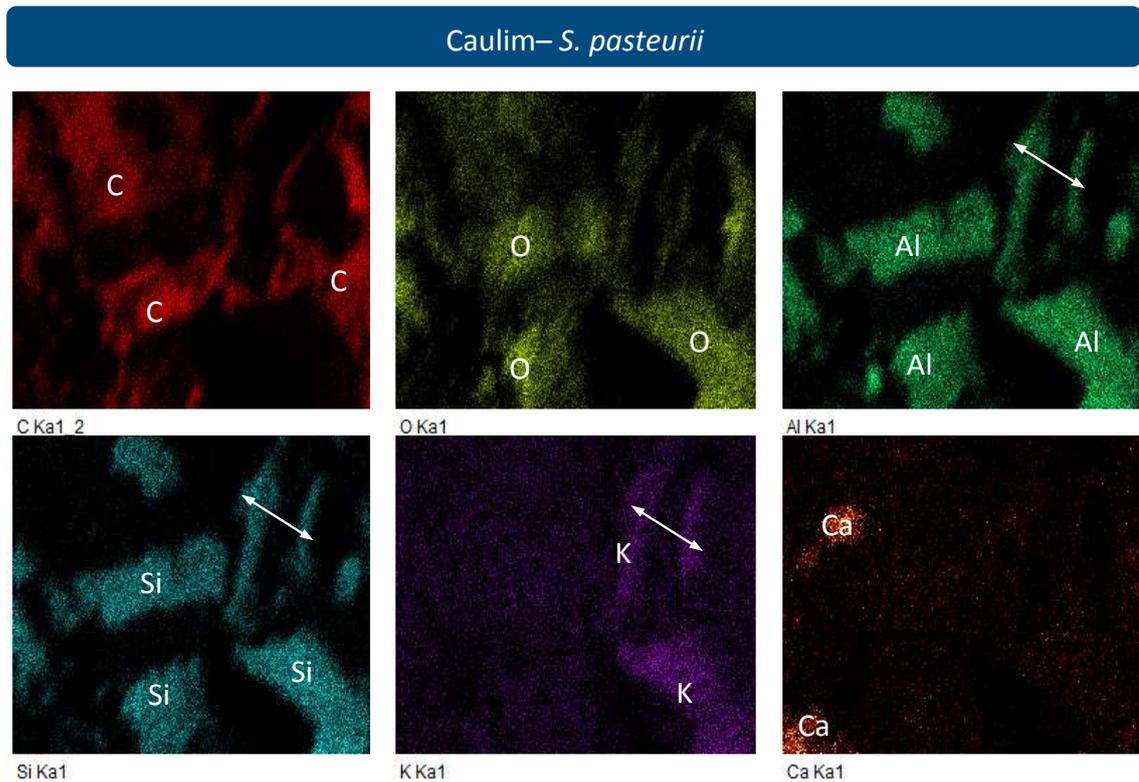


Figura 4-43. Mapa composicional obtido do MEV da amostra do caulim biotratada com *S. Pasteurii*, da imagem com 750 X. Contendo: C (carbono), O (oxigênio), Al (alumínio), Si (silício), K (potássio), Ca (cálcio).

Uma ampliação da zona selecionada na Figura 4-42 (a), é mostrada na imagem (b), onde é observada, na área central, cristais de hábito folheado, de em torno de 15 – 25 μm de comprimento. Nas imagens do mapa de composição de elementos (Figura 4-44) é

evidente o intercrescimento íntimo entre os grãos de caulinita (Si, Al, O) e carbonato de cálcio (Ca, C e O).

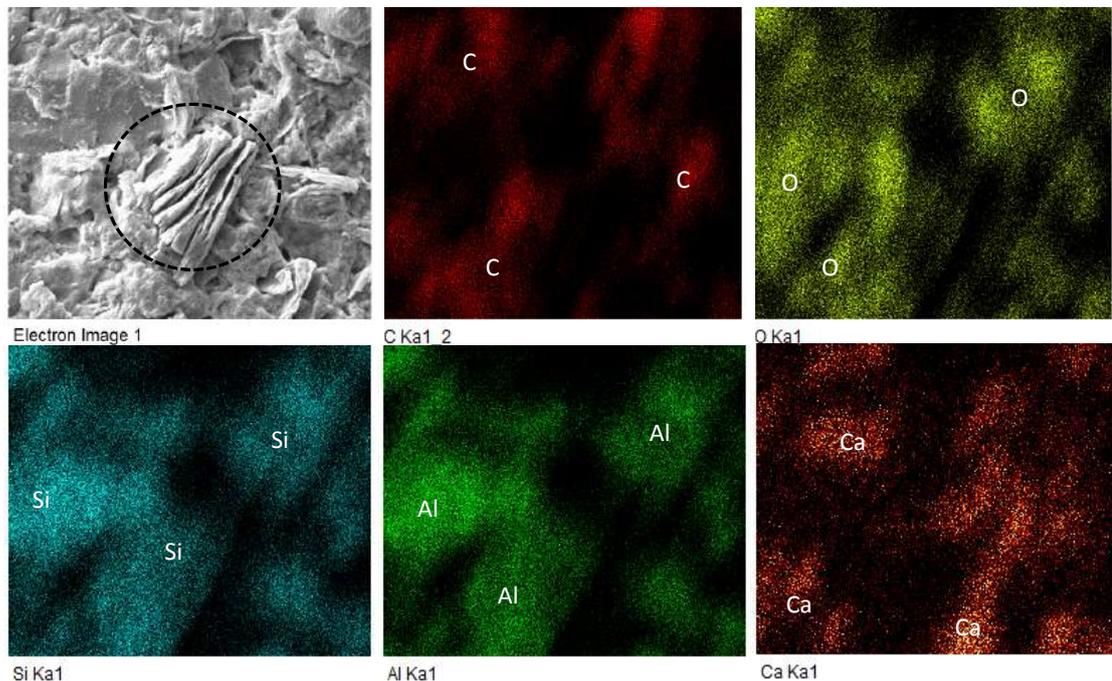


Figura 4-44. Mapa de composição química da amostra de caulim biotratado com *S. pasteurii*. Contendo: C (carbono), O (oxigênio), Si (silício), Al (alumínio) e Ca (cálcio).

Os anteriores resultados das análises por MEV/EDX confirmaram a precipitação de carbonato de cálcio nas amostras de areia de quartzo e caulim biotratadas com *S. pasteurii* e *C. ammoniagenes*. Na areia de quartzo, o carbonato de cálcio foi precipitado cobrindo os grãos, mas, principalmente nos pontos de contato entre os grãos, agindo como pontes de cimentação. Os carbonatos mostram hábito botrioidal, com esférulas intercrescidas muito pequenas (840 nm - 6 μ m), agrupados e formando agregados e outros de forma plana com tamanhos maiores (12 μ m). No caulim, o carbonato de cálcio foi encontrado finamente intercrescido com a caulinita, em alguns áreas, preenchendo os espaços vazios, mas não foram identificadas formas cristalinas evidentes.

A Figura 4-45a apresenta a imagem da amostra de bentonita biotratada com *B. cohnii*, com carbonato de cálcio precipitado na matriz de solo, e a imagem (b) corresponde a uma imagem no MEV, modo BSE em 100 aumentos da zona indicada no círculo preto da imagem (a). Os dois tons de cinza na imagem no MEV-BSE (Figura 4-45b), indica

duas composições mineralógicas na amostra, o que foi verificado no mapa de composição química mostrado na Figura 4-46.

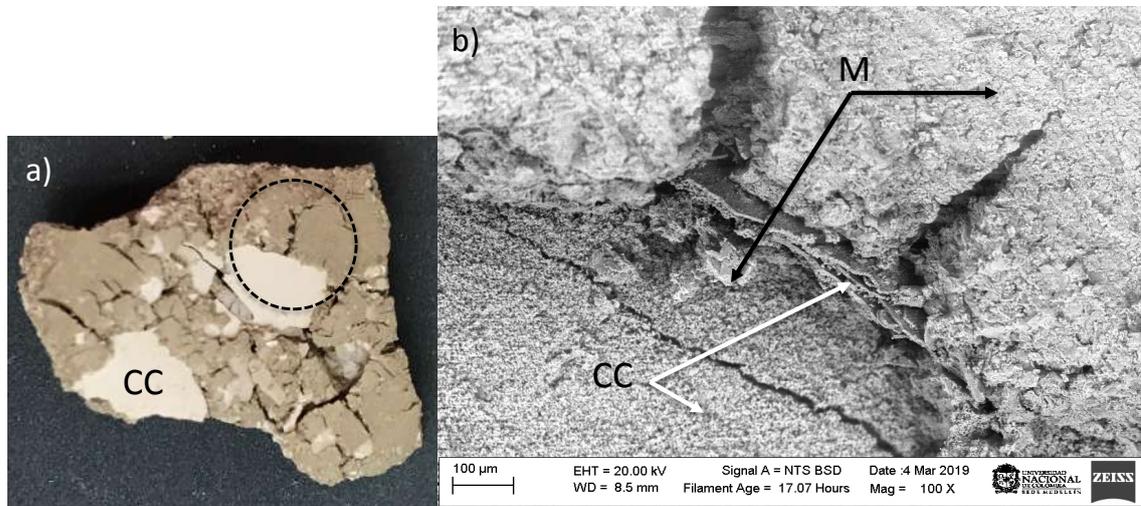


Figura 4-45. Amostra de bentonita biotratada com *B. cohnii*. a) Imagem amostra de bentonita biotratada com *B. cohnii*, com carbonato de cálcio com hábito lamelar. b) Imagem BSE em 100X da zona no círculo preto da imagem em (a). A zona de cor mais clara corresponde à bentonita (M) e a zona de cor mais escura corresponde a carbonato de cálcio (CC) precipitado. Nota: CC: carbonato de cálcio. M: montmorilonita.

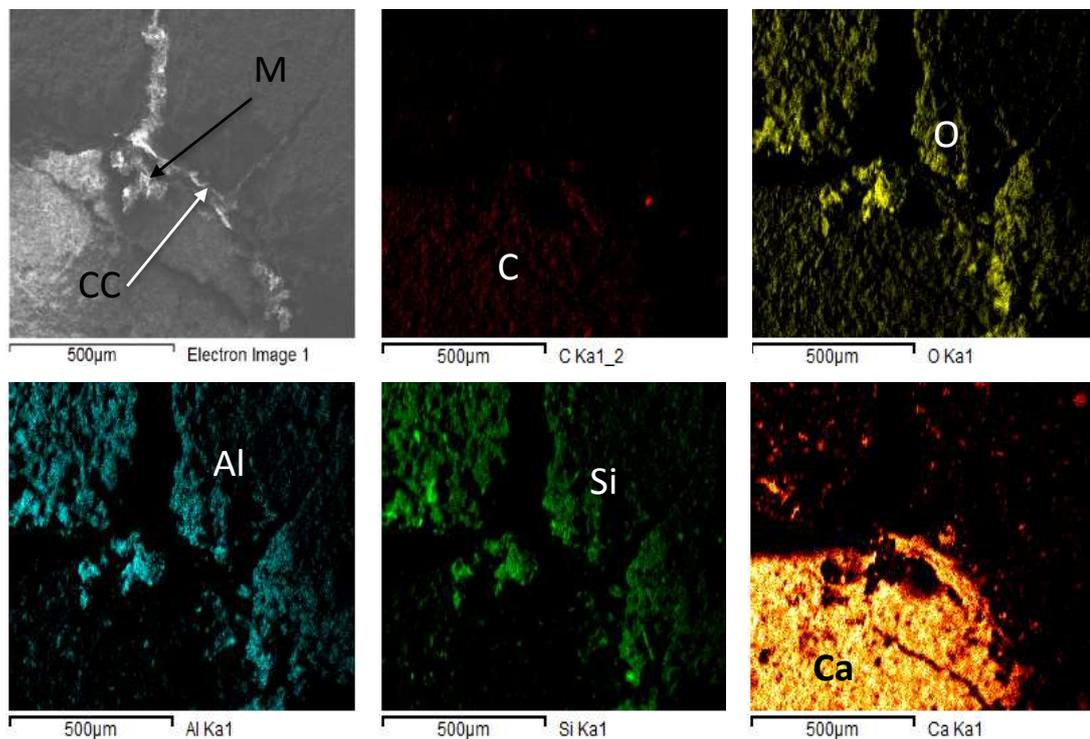


Figura 4-46. Mapa de composição química da amostra de bentonita biotratada com *B. cohnii*. Contendo: C (carbono), O (oxigênio), Al (alumínio), Si (silício) e Ca (cálcio).

O mapa de composição de elementos da Figura 4-46 confirma a existência do carbonato de cálcio precipitado (parte inferior da imagem) correspondente à zona de cor cinza claro na imagem MEV-SE e a montmorilonita (Al e Si) correspondente à zona de cor cinza escuro, localizada principalmente na parte superior da imagem. Na zona de contato, os minerais estão intimamente misturados e foi observado carbonato de cálcio, de forma plana, provavelmente calcita, localizado perpendicular ao eixo da montmorilonita (seta branca na imagem MEV-SE). Na imagem MEV-BSE da Figura 4-45b, é observado mais facilmente o carbonato de cálcio de hábito planar e perpendicular à bentonita.

A Figura 4-47 apresenta a imagem no MEV-BSE da zona composta principalmente por bentonita da Figura 4-45a (zona cinza), em 2000 aumentos e na Figura 4-48 é apresentado o mapa de elementos químicos.

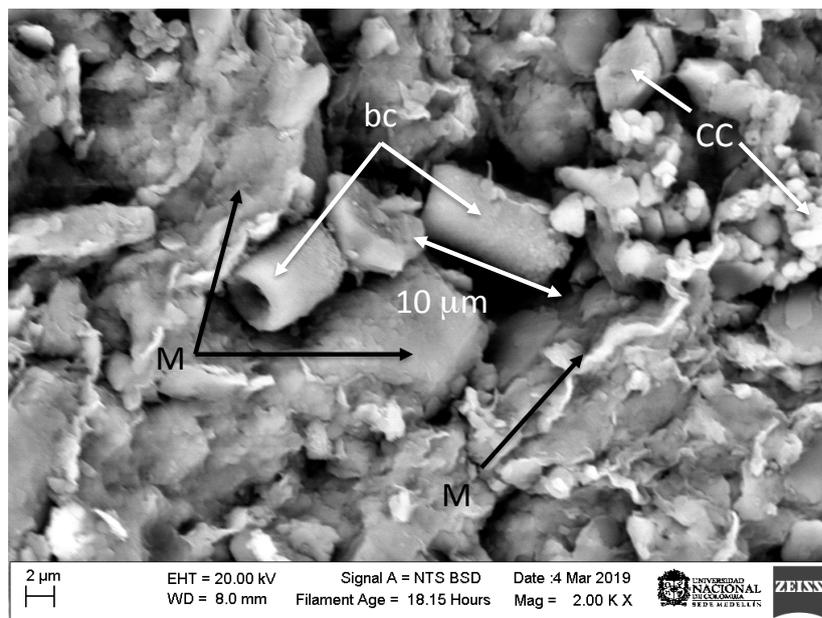


Figura 4-47. Imagem no MEV, em 2000 X, modo BSE, da amostra de bentonita biotratada com *B. cohnii*, zona da bentonita na figura 4.45 (a).

Na Figura 4-47 é observado carbonato de cálcio de hábito botrioidal, de apenas uma micra de diâmetro, precipitado na matriz de bentonita e também foram observadas dentro do aglomerado de bentonita, duas estruturas de forma cilíndrica, aparentemente de bactérias calcificadas de 10 µm de comprimento. No mapa de elementos (Figura 4-48) é observado o carbonato de cálcio preenchendo os espaços vazios da matriz de montmorilonita (Al, Si).

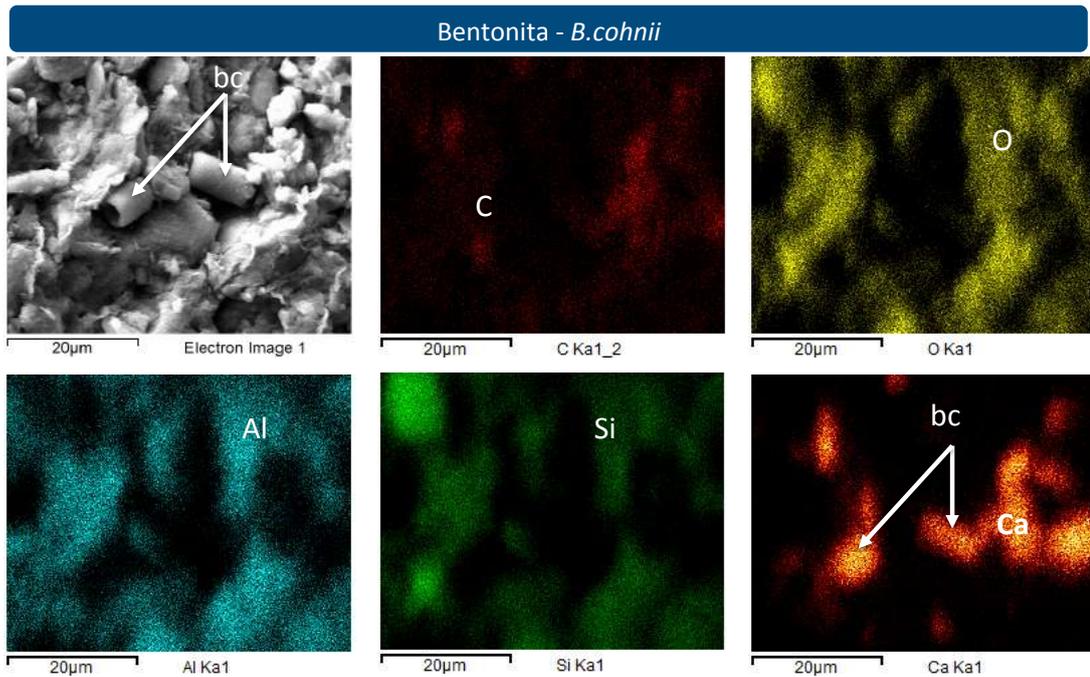


Figura 4-48. Mapa de composição química da amostra de bentonita biotratada com *B. cohnii*, da Figura 4.47. Contendo: C (carbono), O (oxigênio), Al (alumínio), Si (silício) e Ca (cálcio) e mostrando a presença de uma bactéria calcificada (bc) na matriz de bentonita.

A Figura 4-49 apresenta a imagem no MEV-BSE da zona composta principalmente por carbonato de cálcio da Figura 4-45a (zona creme), em 2000 aumentos e na Figura 4-48 é apresentado o mapa de elementos químicos.

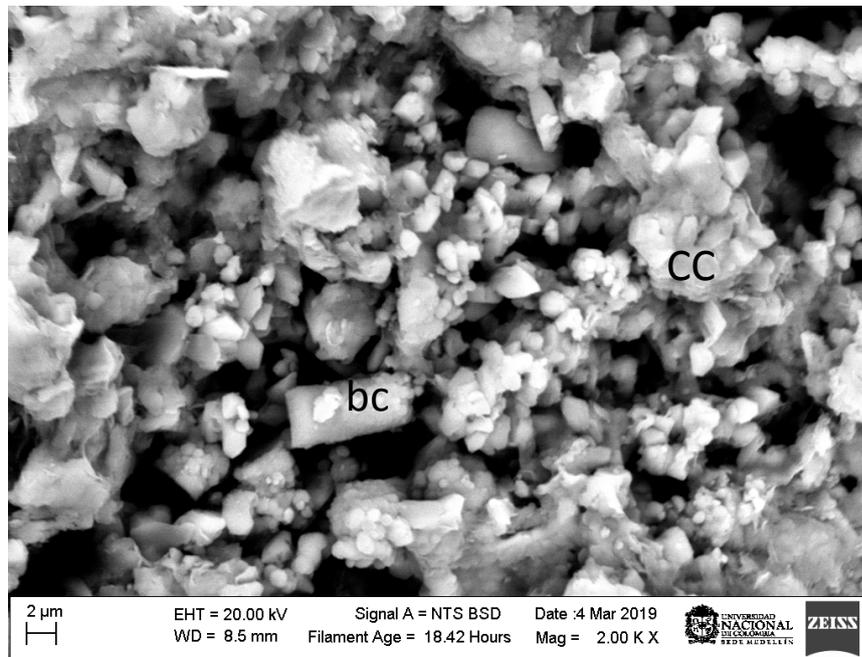


Figura 4-49. Imagem no MEV, em 2000 X, modo BSE, da amostra de bentonita biotratada com *B. cohnii*, zona do carbonato de cálcio precipitado na figura 4.45 (a).

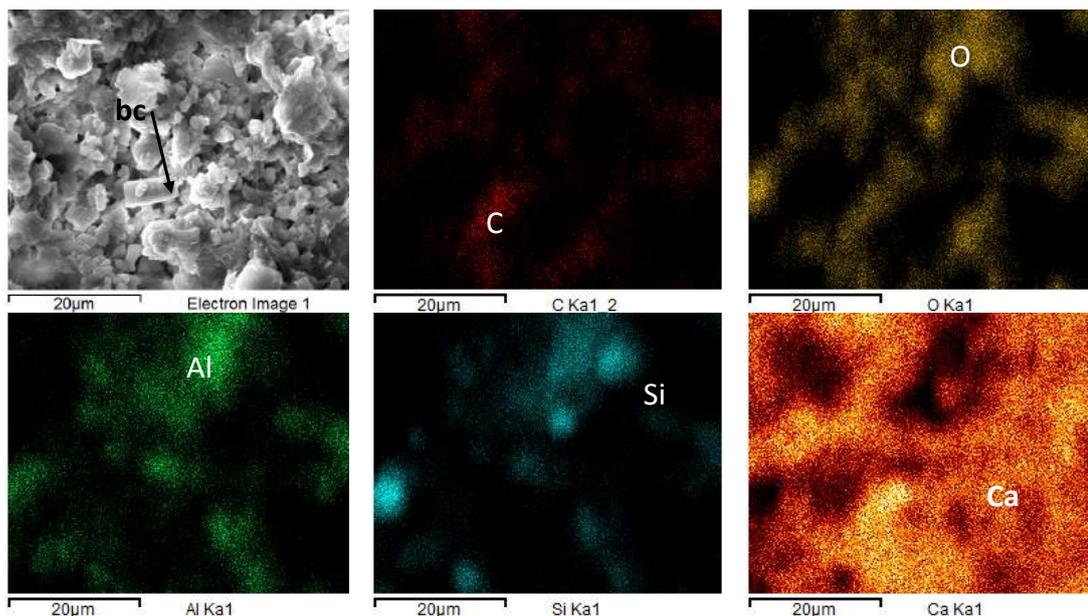


Figura 4-50. Mapa de composição química da amostra de bentonita biotratada com *B. cohnii*, da Figura 4.49. Contendo: C (carbono), O (oxigênio), Al (alumínio), Si (silício) e Ca (cálcio).

A Figura 4-49 e o mapa de composição química (Figura 4-50), confirmam que a zona de cor creme na amostra de bentonita biotratada, corresponde a carbonato de cálcio, precipitado sob a matriz de bentonita.

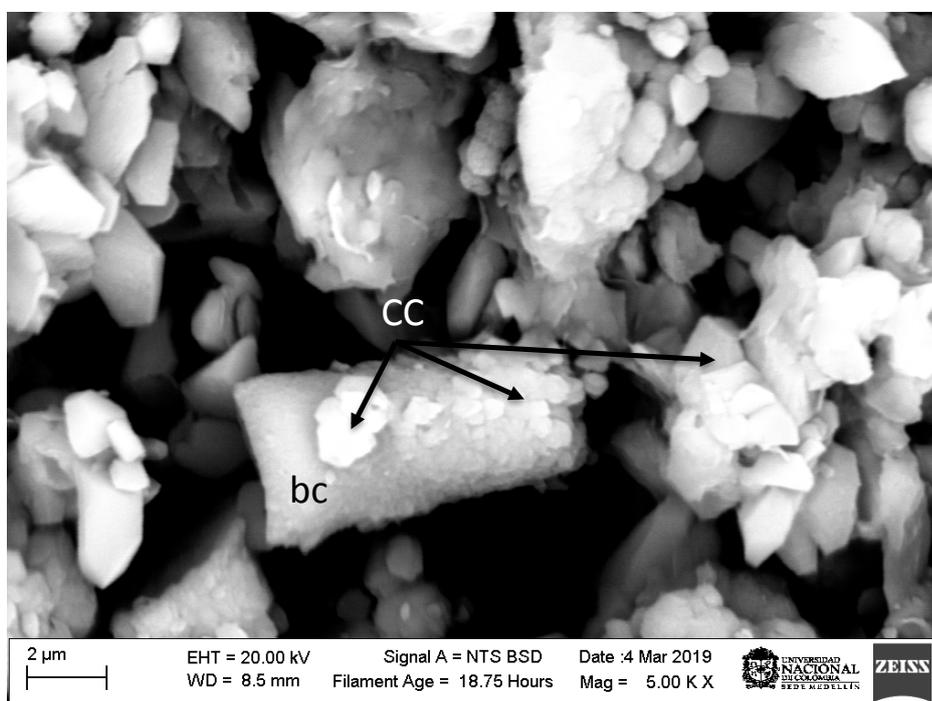


Figura 4-51. Imagem no MEV, em 5000 X (modo BSE), da Figura 4.49, amostra de bentonita biotratada com *B. cohnii*, zona do carbonato de cálcio.

Na ampliação a 5000 aumentos do carbonato de cálcio precipitado (Figura 4-51), foi observado que os cristais de carbonato de cálcio têm uma forma romboédrica e/ou de placa hexagonal. Também foram observados cristais de carbonato muito pequenos cobrindo totalmente uma forma cilíndrica, associada à bactéria que foi calcificada.

4.3.8 Quantificação da massa de carbonato de cálcio bioprecipitado

Os resultados da massa de carbonato de cálcio precipitada nas amostras de solos são mostrados na Figura 4-52. Cada ensaio foi feito por triplicado e assim o conteúdo de CaCO_3 foi determinado considerando 95% de confiabilidade com o teste de comparação de médias de Tukey.

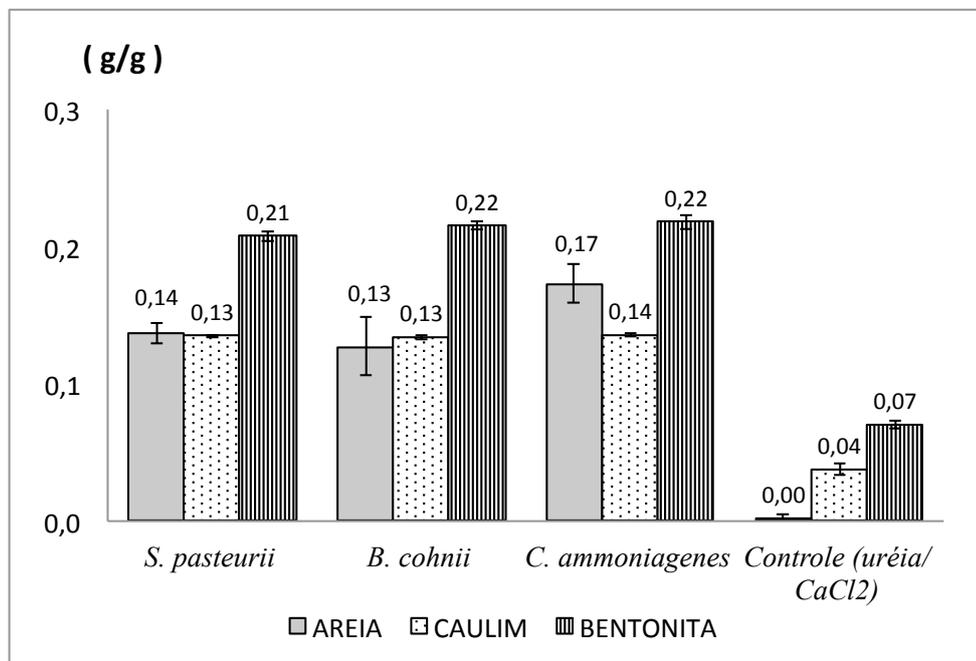


Figura 4-52. Carbonato de cálcio precipitado nas amostras de areia, caulim e bentonita, em gramas de CC precipitado por 1 grama de solo (g/g).

A massa de carbonato de cálcio precipitado nas amostras biotratadas, foi semelhante nas amostras de areia de quartzo e caulim, de em torno de 0,13 g de carbonato de cálcio/g de solo; no entanto, nas amostras de bentonita foi precipitado quase o dobro, com ao redor de 0,22 g de carbonato de cálcio/g de solo.

As análises estatísticas confirmaram, com uma confiabilidade do 95%, diferenças significativas no processo de MICPP, entre a amostra de bentonita e as amostras de

areia de quartzo e o caulim. Entre as amostras de areia e caulim, não há diferenças estatisticamente significativas.

Em resumo, é possível afirmar que nas amostras de areia de quartzo e caulim houve uma precipitação entre 13% - 17% de carbonato de cálcio da massa do solo, isto é, que em média houve um conteúdo de CaCO_3 de 0,14 g/g, enquanto, na amostra de bentonita houve uma precipitação de 22% de carbonato de cálcio da massa do solo, em média um conteúdo de CaCO_3 de 0,22 g/g, quer dizer 1,6 vezes o carbonato de cálcio precipitado nas amostras de areia e caulim.

Nestes bioensaios é evidente que existe uma diferença incontestável em relação à influência da mineralogia dos solos nos processos de MICCP, especialmente levando em conta que neste tipo de experimento, onde os minerais se colocaram em suspensão conjuntamente com o meio de cultura e os microrganismos, se elimina grandemente a influência da porosidade do solo, que sempre tinha sido base para explicar as diferenças nos processos de biocimentação de solos com diferentes minerais (Van Paassen, 2009; Mortensen *et al.*, 2011).

Por outra parte, foi verificada a tendência para maior precipitação de CaCO_3 sobre substratos cálcicos, bentonita com presença de carbonato de cálcio, que por exemplo em substratos de silicatos, areia de quartzo (Rebata-Landa, 2007; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2012).

A Figura 4-52 mostra, que nos controles houve certo grau de precipitação de carbonato de cálcio. O controle da bentonita apresenta a maior quantidade de carbonato de cálcio precipitado, com 0,07 g, seguido pelo caulim com 0,04 g, numa grama de solo. Estas quantidades de carbonato de cálcio, possivelmente são relacionadas com a precipitação abiótica de CaCO_3 , intervindo as partículas minerais como sítios de nucleação, principalmente as partículas de maior área superficial específica como a bentonita e o caulim, com carga elétrica negativa. A diferença no CC precipitado biótica e abioticamente, apoiaria a hipótese de que a presença do microrganismo catalisa a reação de precipitação de carbonato de cálcio.

4.4 BIO CIMENTAÇÃO DE SOLOS- nível de colunas de solos

A continuação são apresentados os resultados dos ensaios de biocimentação de solos em moldes cilíndricos, divididos em dos estágios.

4.4.1 Estágio 1

Num primeiro estágio, foram preparadas nove (9) colunas de solos com os seguintes solos e microrganismos (Tabela 4-4).

Tabela 4-4. Solos e microrganismos no primeiro estágio dos ensaios de biocimentação em colunas

Nomenclatura	Solos	Microrganismo
<i>S.p-Q</i>	100% areia de quartzo, D ₆₀ : 1,4 mm	<i>S. pasteurii</i>
<i>S.p-Q-C 10%</i>	Dosagem 90% quartzo-10% caulim	<i>S. pasteurii</i>
<i>S.p-Q-B 10%</i>	Dosagem 90% quartzo-10% bentonita	<i>S. pasteurii</i>
<i>B.c-Q</i>	100% areia de quartzo, D ₆₀ : 1,4 mm	<i>B. cohnii</i>
<i>B.c-Q-C 10%</i>	Dosagem 90% quartzo-10% caulim	<i>B. cohnii</i>
<i>B.c-Q-B 10%</i>	Dosagem 90% quartzo-10% bentonita	<i>B. cohnii</i>
<i>C.a-Q</i>	100% areia de quartzo, D ₆₀ : 1,4 mm	<i>C. ammoniagenes</i>
<i>C.a-Q-C 10%</i>	Dosagem 90% quartzo-10% caulim	<i>C. ammoniagenes</i>
<i>C.a-Q-B 10%</i>	Dosagem 90% quartzo-10% bentonita	<i>C. ammoniagenes</i>

Neste estágio foram utilizadas três (3) amostras de solos (Q, Q-C 10% e Q-B 10%) e três (3) microrganismos: *S pasteurii*, *B cohnii* e *C ammoniagenes*. Também foram preparadas três (3) colunas controles de solos, sem microrganismo. A cada 48 h, foram tomadas amostras do meio líquido que foi drenado, e um novo tratamento foi aplicado às amostras. Em total foram fornecidos quatro tratamentos (solução bacteriana + solução de cimentação).

4.4.1.1 Estágio 1: caracterização do meio líquido drenado ao final de cada tratamento

✓ *Comportamento do pH:*

O pH inicial do meio líquido, antes da adição dos microrganismos, foi de 8,5 em todos os experimentos. O pH ao final de cada tratamento é apresentado na Figura 4-53.

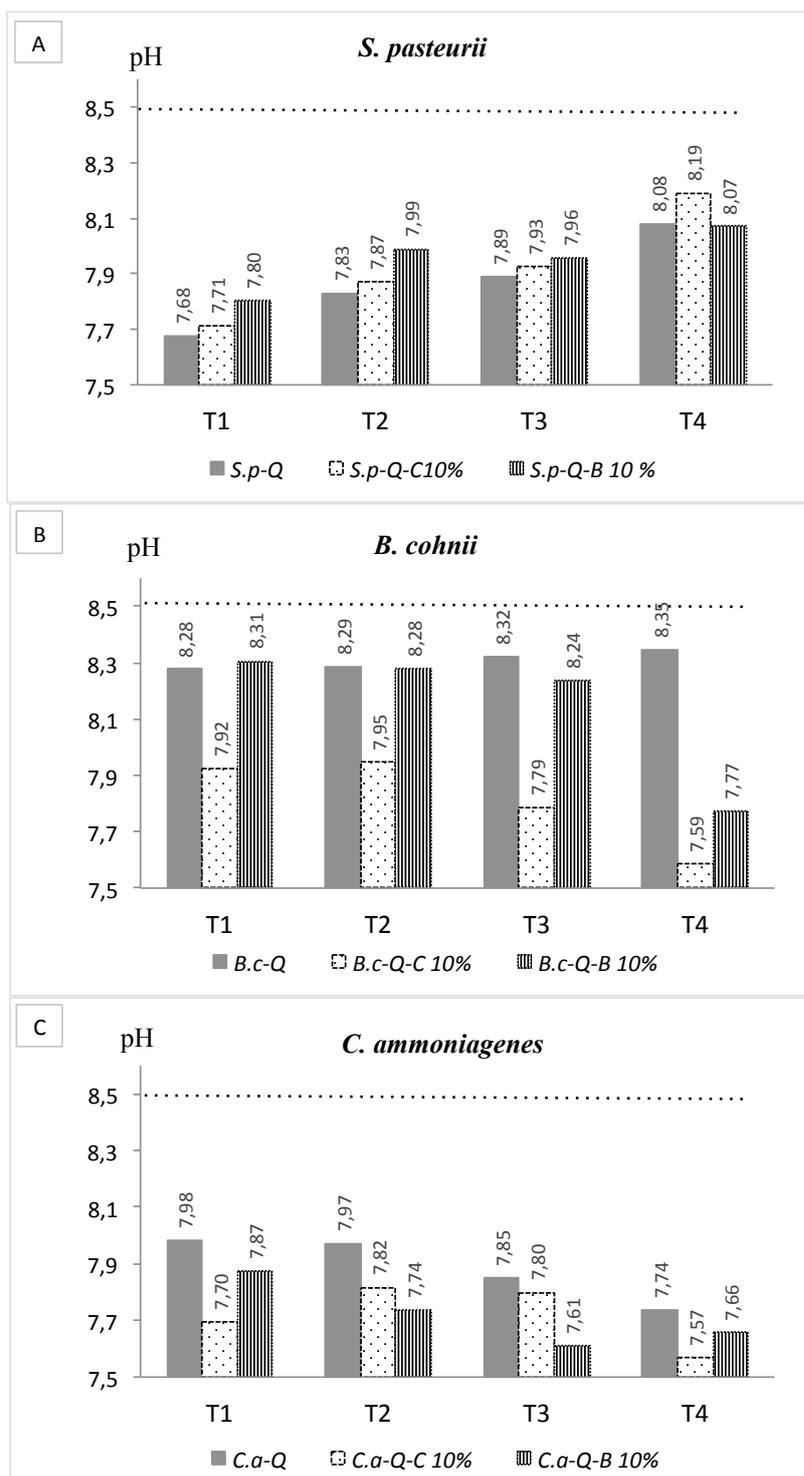


Figura 4-53. pH ao final de cada tratamento, amostras de Q, dosagem Q-C 10%, Q-B 10% biotratadas com (A) *S.pasteurii*. (B) *B.cohnii*. (C) *C. ammoniagenes*.

Em todas as amostras biotratadas depois das 48 h, ao final de cada tratamento o pH diminui. O comportamento foi diferente dependendo de cada microrganismo usado e de cada solo.

Nas amostras com *S. pasteurii* (Figura 4-53 A), ao final do primeiro tratamento o pH diminuiu em todas as amostras. Depois, a cada novo tratamento, o pH aproximou-se do pH inicial. Foi observada uma tendência nos valores de pH ao final de todos os tratamentos, onde o menor valor de pH foi observado na amostra de areia de quartzo (Q), valor intermediário de pH na mistura Q-C 10% e o maior valor de pH na amostra de Q-B 10%. No primeiro tratamento o pH foi de 7,7 (Q, Q-C 10%) e 7,8 (Q-B 10%) e no último tratamento o pH foi de em torno de 8,1.

No geral, observou-se que a medida que um novo tratamento foi fornecido o pH do efluente foi mais perto do pH inicial (8,5), o que pode ser interpretados de duas formas: i) a medida que foi aumentando o número de tratamentos, a mudança no pH foi mais rápida e este desceu e voltou a subir aproximando-se ao inicial, ou ii) com o aumento dos tratamentos, a reação de pH foi mais lenta e este diminuiu, mas não tanto quanto no anterior tratamento.

No monitoramento do pH nos bioensaios com solos em suspensão, nos ensaios com a areia de quartzo usando a linhagem de *S.pasteurii* (Figura 4-23A) o pH diminuiu até as 72 h mostrando um pH de 7,7 sendo que depois aumenta novamente até atingir um valor de 8,1. Com o intervalo de medição de 48 h, sem fazer monitoramento, não é possível determinar em que parte do processo está o pH, seja na rampa de descida do pH (precipitação de carbonatos com alta concentração de cálcio) ou na rampa de subida (com o cálcio sendo esgotado).

Nas amostras com *B. cohnii* (Figura 4-53 B) a tendência do pH foi diferente, ficando quase estável nos primeiros três tratamentos e só com variação apreciável no último tratamento. Os valores de pH não desceram tanto quanto como nos ensaios usando a linhagem de *S. pasteurii*. Na amostra de Q, o pH foi aumentando a cada tratamento, iniciando em pH em torno de 8,28 (T1) e terminando em pH aproximado de 8,35 (T4). Na amostra de Q-B 10% a tendência foi contrária, diminuindo a cada tratamento, iniciando em pH em torno de 8,31 (T1) e terminando em pH de 7,77 (T4). Na mistura Q-C10% a tendência foi também a diminuir a cada tratamento, porém, foram atingidos os menores valores do pH, iniciando em pH em torno de 7,92 (T1) e terminando em pH aproximado de 7,59 (T4).

Nas amostras com *C. ammoniagenes* (Figura 4-53 C) em média foram atingidos os menores valores de pH e a tendência geral foi a diminuir o pH a cada tratamento. Os

maiores valores de pH foram observados na amostra Q, iniciando em pH em torno de 7,98 (T1) e terminando em pH aproximado de 7,74 (T4). Na mistura Q-C10% os valores iniciaram em pH de 7,70 (T1) e terminaram em pH em torno de 7,57 (T4). Finalmente na amostra Q-B10% os valores no início foram de pH aproximado de 7,87 (T1) e ao final de pH aproximado de 7,66 (T4).

Nas amostras controles (sem microrganismo) (Figura 4-54), o pH ao final de cada tratamento sempre flutuo entre um pH de 8,2 e 8,5.

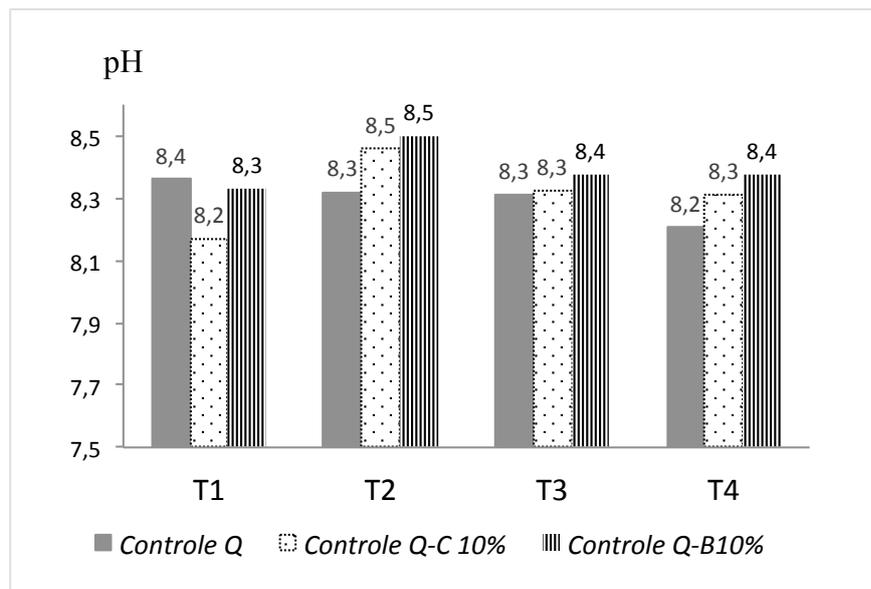


Figura 4-54. pH ao final de cada tratamento, amostras controles de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10%, (sem microrganismo)

✓ *Comportamento do oxigênio dissolvido:*

O comportamento do oxigênio dissolvido ao final de cada tratamento é apresentado na Figura 4-55, para os solos biotratados com *S. pasteurii* (Figura 4-55A), com *B. cohnii* (Figura 4-55B) e com *C. ammoniagenes* (Figura 4-55C).

Foram observadas diferenças, principalmente nos valores do OD, entre os microrganismos. Nos minerais biotratados com *S. pasteurii* e *C. ammoniagenes*, o oxigênio dissolvido foi sempre menor de 1,7 mg/l, enquanto que, nos minerais com *B. cohnii*, o OD foi sempre maior, com valor de aproximadamente 3 a 4 mg/l, exceto para as misturas Q-C 10%, com valores menores de 2 mg/l.

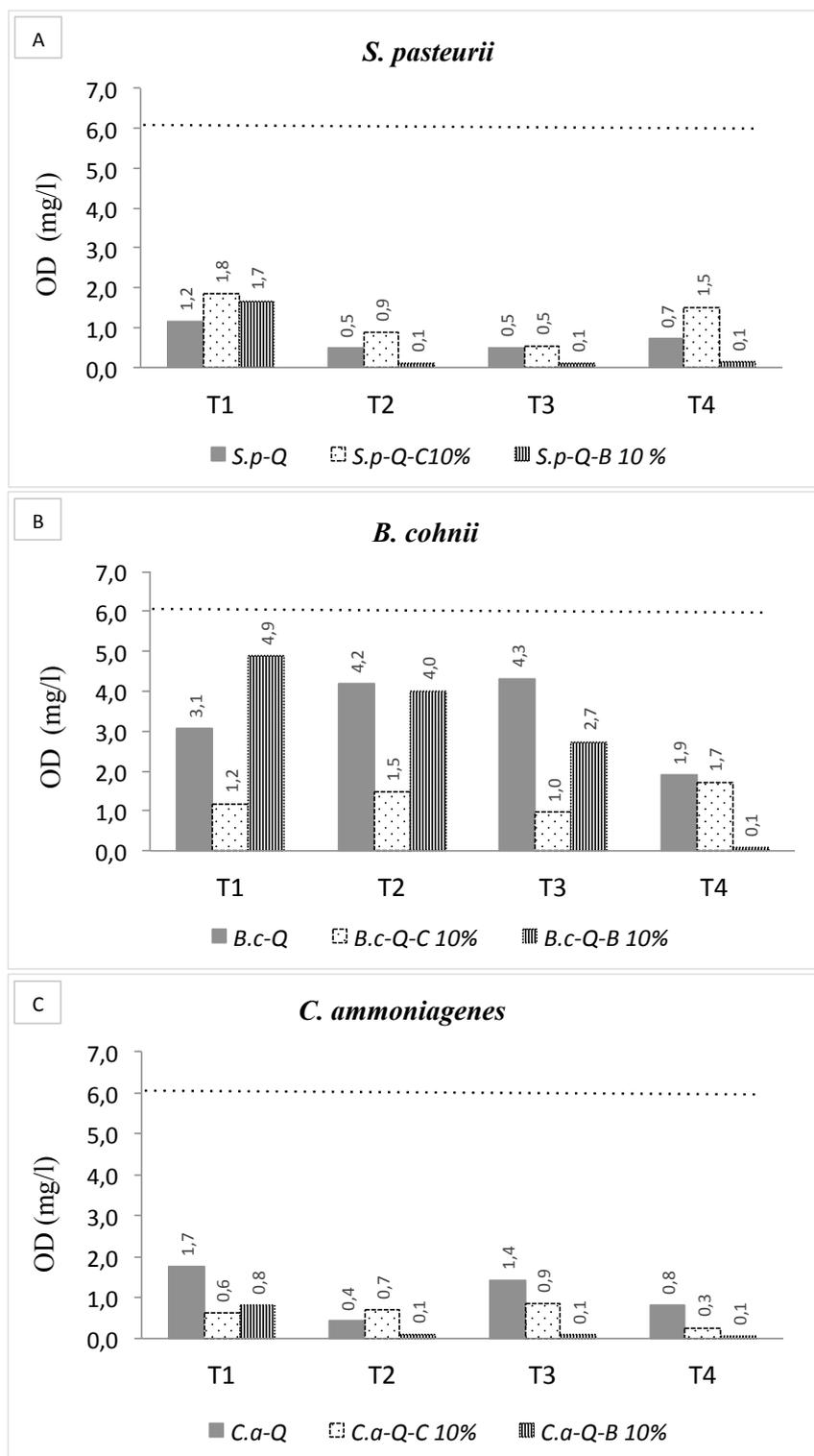


Figura 4-55. Oxigênio dissolvido (OD) ao final de cada tratamento, nas amostras de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10% biotratadas com (A) amostras com *S.pasteurii*. (B) *B.cohnii*. (C) *C.ammoniagenes*.

Com estes resultados, espera-se uma menor precipitação de carbonato de cálcio nos minerais biotratados com *B. cohnii*, e uma maior precipitação de carbonato de cálcio

nos minerais biotratados com *S. pasteurii* e *C. ammoniagenes*, principalmente na mistura Q-B 10%.

O comportamento do oxigênio dissolvido ao final de cada tratamento, nas amostras controles (sem microrganismo) é apresentado na Figura 4-56. O oxigênio dissolvido ao final dos tratamentos T1 e T2 foi acima de 5 mg/l. No tratamento T3 foi observada uma ligeira diminuição do OD, para finalmente no último dia do experimento, os valores de OD estiveram entre 2 a 3 mg/l.

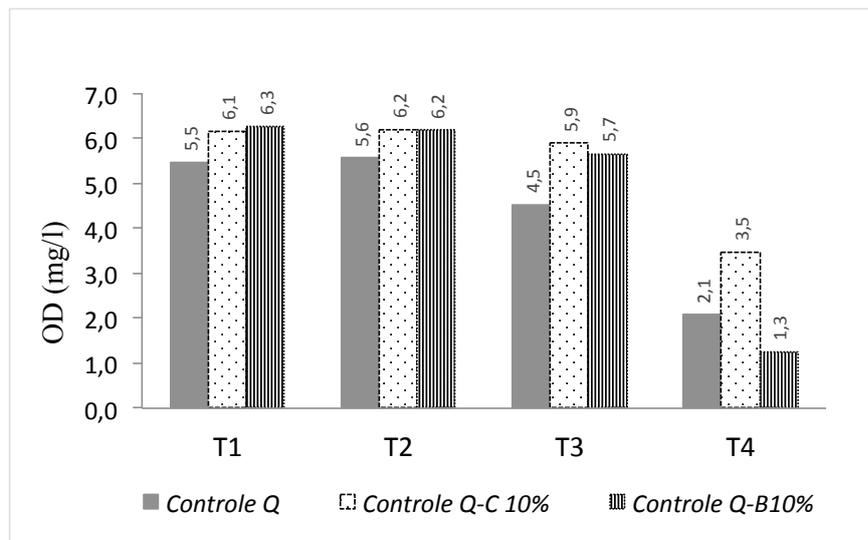


Figura 4-56. Oxigênio dissolvido (OD) ao final de cada tratamento, nas amostras controles (sem microrganismos) de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10%. (A) amostras com *S.pasteurii*. (B) *B.cohnii*. (C) *C. ammoniagenes*. (D) amostras controles.

✓ *Comportamento da concentração de cálcio:*

A Figura 4-57 apresenta os resultados do cálcio em solução, ao final de cada tratamento, em mg/l. Nas figuras A, B, C, são observadas diferenças entre as soluções produto das amostras de solos e entre os ensaios usando os diferentes microrganismos.

O cálcio inicial fornecido em cada tratamento foi em média de aproximadamente 18000 mg/l Ca e na Figura 4-57, foi observado que nas soluções produto do tratamento das diferentes amostras com *S. pasteurii* (Figura A), o consumo ou precipitação do cálcio foi mais eficiente que nas amostras com *B. cohnii* (Figura B) e *C. ammoniagenes* (Figura C). Nas amostras com *S. pasteurii*, o Ca^{2+} em solução depois do tratamento T1 foi menor que ~5000 mg/l Ca, enquanto que nos ensaios com *B. cohnii*, o Ca^{2+} em

solução esteve entre 10000 e 15000 mg/l Ca e naqueles experimentos usando a cepa de *C. ammoniagenes*, esteve entre 5000 e 15000 mg/l Ca.

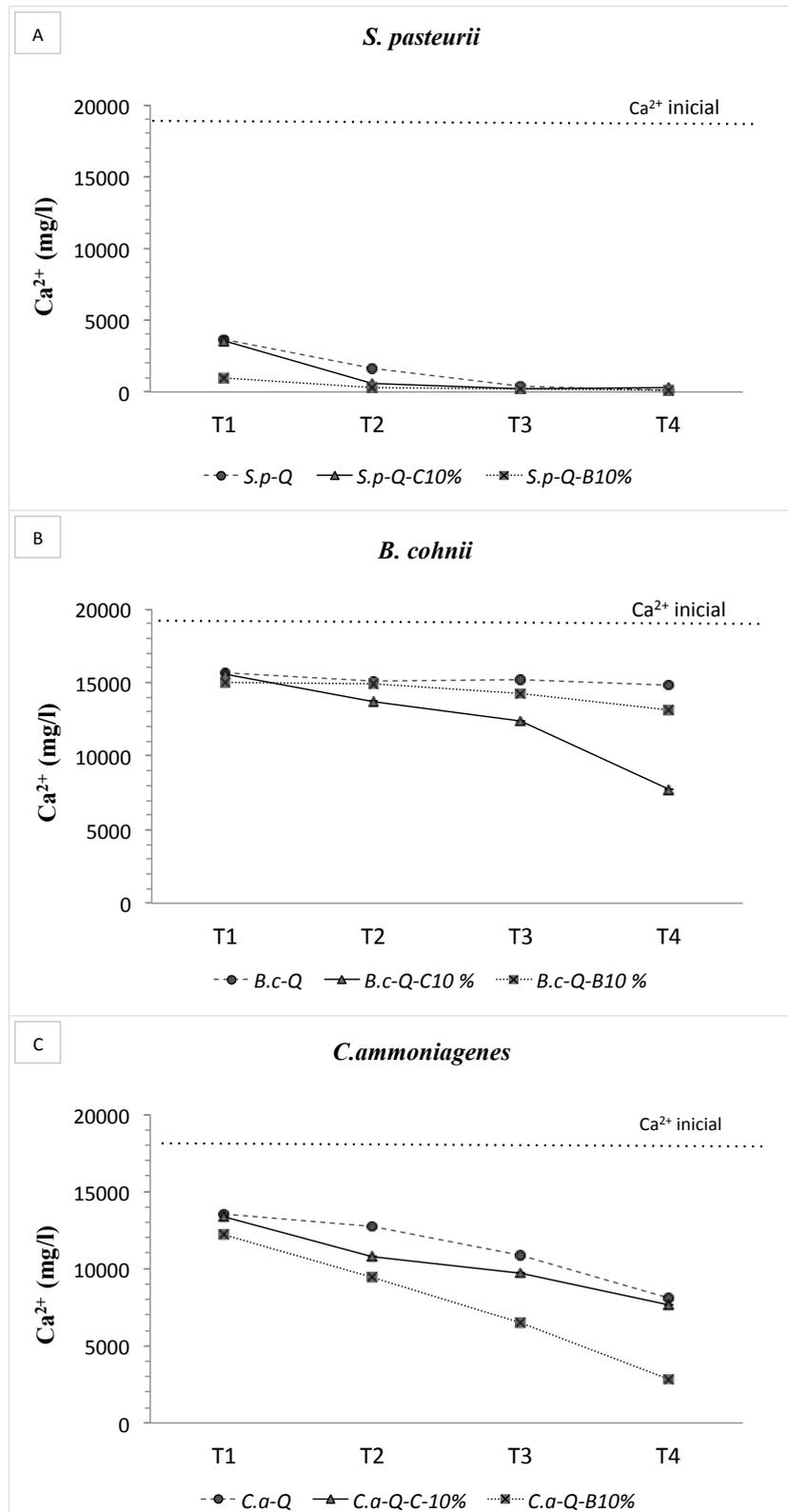


Figura 4-57. Cálcio em solução (mg/l) ao final de cada tratamento, nas amostras de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10% biotratadas com A) *S. pasteurii*. B) *B. cohnii*. C) *C. ammoniagenes*.

Nas amostras com *S. pasteurii* (Figura 4-57A) foram observadas diferenças significativas entre as amostras, principalmente no tratamento T1 e T2, com menor quantidade de cálcio em solução, aproximadamente 1000 mg/l Ca, na solução depois de tratada a amostra Q-B10% e maior quantidade, em torno de 4000 mg/l Ca, nas soluções produto do tratamento das amostras Q e Q-C10%. Os efluentes das amostras Q e Q-C10% não tiveram diferenças significativas entre elas. Após o tratamento T4, as diferenças entre todas as soluções dos diferentes tratamentos não são mais significativas.

Nos ensaios das diferentes amostras tratadas com *B. cohnii* (Figura 4-57B) o comportamento do cálcio em solução foi diferente aos ensaios usando a linhagem de *S. pasteurii*, sendo que a diferença entre as amostras só foi observada a partir do T2, tempo a partir do qual foi aumentando a diferença até chegar ao tratamento T4. Nestes ensaios, a menor quantidade de cálcio em solução foi para a amostra de Q-C10%, onde no T4 se observou o menor valor, em torno de 8000 mg/l Ca. Por outro lado, a maior quantidade do Ca^{2+} na solução sempre foi observado na solução produto do tratamento da amostra Q, mantendo nos quatro tratamentos em torno de 15000 mg/l do cálcio em solução. A amostra Q-B10%, apresentou valores de Ca em solução semelhantes daqueles das soluções produto do tratamento da amostra Q, porém, no T4 o cálcio em solução disponível foi ligeiramente menor e de aproximadamente 13000 mg/l Ca.

Nas amostras produto dos ensaios com a linhagem de *C.ammoniagenes* (Figura 4-57C) o comportamento do cálcio em solução foi semelhante à *B. cohnii*, porém com diferenças mais marcadas entre os experimentos com Q e Q-C. Nestes ensaios, no tratamento T1, não houve diferenças significativas entre as amostras, sendo que estas começaram a partir do T2 e aumentaram à medida que um novo tratamento foi aplicado. Como já mencionado, o comportamento dos minerais foi diferente que nos experimentos usando a linhagem de *B. cohnii*, com uma menor quantidade de cálcio em solução, onde o experimento da amostra Q-B10%, no T4 atingiu um valor de aproximadamente 3000 mg/l Ca, enquanto que a maior quantidade do Ca^{2+} em solução sempre foi na amostra Q, que no T4 atingiu um valor em torno de 8000 mg/l Ca. A maior quantidade do Ca^{2+} em solução, mais uma vez, foi na amostra de Q.

Na Figura 4-57 foi observado que o efluente produto do tratamento da amostra de areia Q (sem mistura com finos), sempre apresentou a maior quantidade de cálcio em solução

ao final de cada tratamento, independente do microrganismo utilizado, indicando, a priori, que a presença do 10% de caulim ou 10% de bentonita, melhorou a precipitação do cálcio.

Das medições do cálcio em solução é possível determinar o carbonato de cálcio precipitado, a partir da concentração inicial de cloreto de cálcio (0,5 M) fornecido em cada tratamento, levando em conta uma reação 1:1, onde um mol de cálcio gera um mol de carbonato de cálcio, e sem levar em conta o cálcio que poderia ter sido utilizado para troca catiônica. A Figura 4-58 apresenta o conteúdo de carbonato de cálcio precipitado, em gramas, ao final de cada tratamento.

Como foi observado no comportamento do cálcio disponível na solução, o microrganismo com melhor desempenho foi a *S. pasteurii*. Na Figura 4-58 A, é observado que nas amostras biotratadas com *S. pasteurii* foi precipitado em cada tratamento com ureia e cloreto de cálcio, em torno de 5 a 6 g de carbonato de cálcio. No tratamento T1 foram observadas diferenças significativas, com a maior precipitação na mistura Q-B10%, com uma precipitação de 5,6 g CaCO₃, enquanto que nas amostras Q e Q-C10% foram precipitados 4,7 g CaCO₃. A maior precipitação, foi dada no tratamento T3 (6,3 g de CaCO₃).

Ao final de cada tratamento nos solos com *B. cohnii* (Figura 4-58 B), apenas foi precipitado cerca de 1 g de carbonato de cálcio. A quantidade de carbonato foi aumentando ligeiramente a cada novo tratamento, mas a maior precipitação foi na amostra Q-C10%, no tratamento T4, com cerca de 3 g de carbonato de cálcio.

Nas amostras com *C. ammoniagenes* (Figura 4-58 C), também foram observadas diferenças na precipitação de carbonato de cálcio entre as amostras a partir do segundo tratamento, sendo que a quantidade de carbonato precipitado foi aumentando a cada novo tratamento. Como nos solos biotratados com *S. pasteurii*, a maior precipitação de carbonato de cálcio foi na mistura Q-B10%, mas com apenas 1,7 g de CaCO₃ no T1 e cerca de 5 g de CaCO₃ no T4. Nas amostra de Q e na mistura Q-C10%, os valores de carbonato de cálcio precipitado foram semelhantes, aumentando de 1,3 g de CaCO₃ (T1) a aproximadamente 3 g de CaCO₃ (T4).

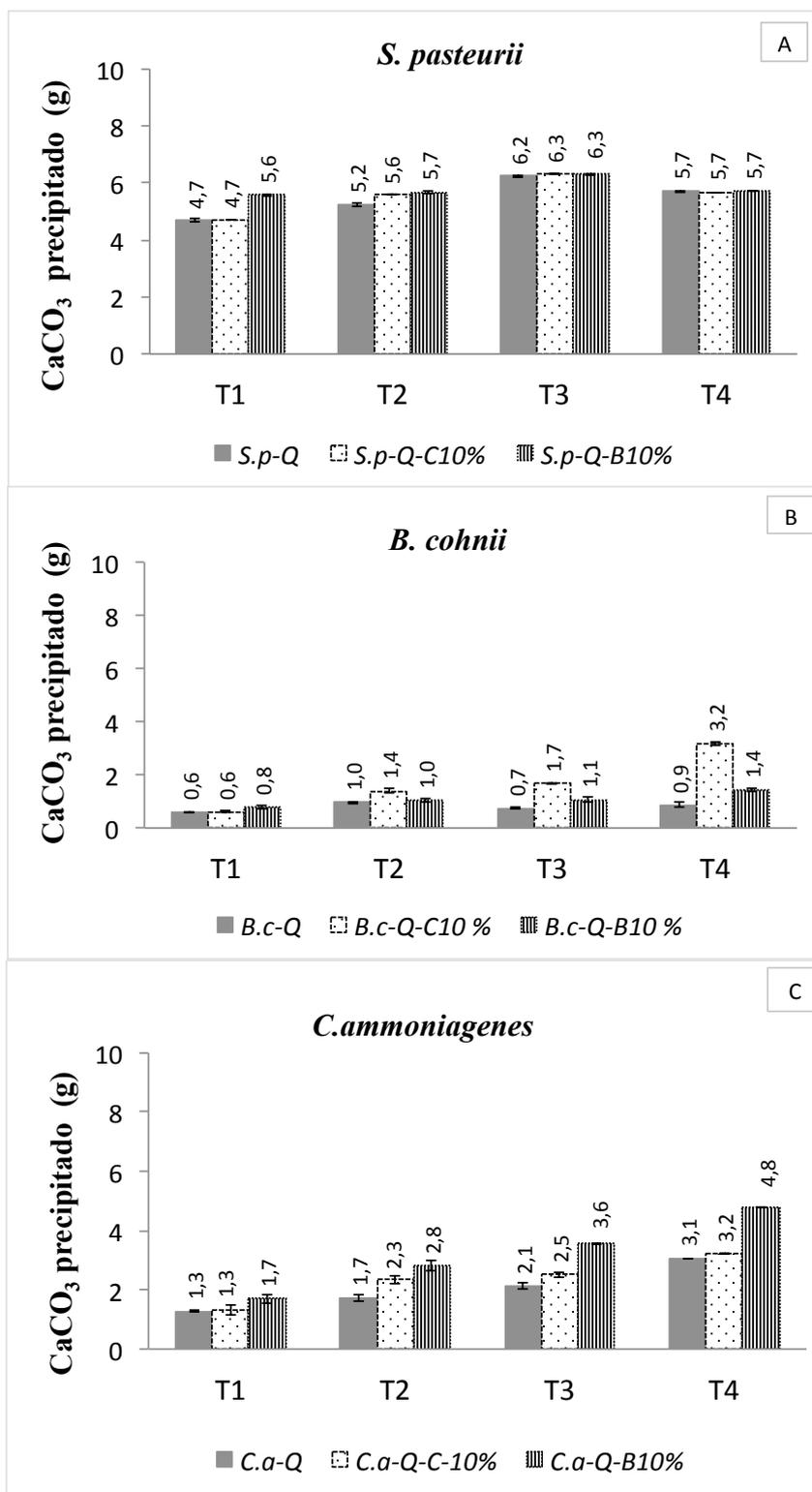


Figura 4-58. Carbonato de cálcio precipitado (g), ao final de cada tratamento nas amostras de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10% biotratadas com A) *S. pasteurii*. B) *B. cohnii*. C) *C. ammoniagenes*.

A eficiência do processo de MICCP, foi calculada a partir da concentração inicial do cloreto de cálcio fornecido, e é apresentada na Figura 4-59 como percentagem de cálcio precipitado.

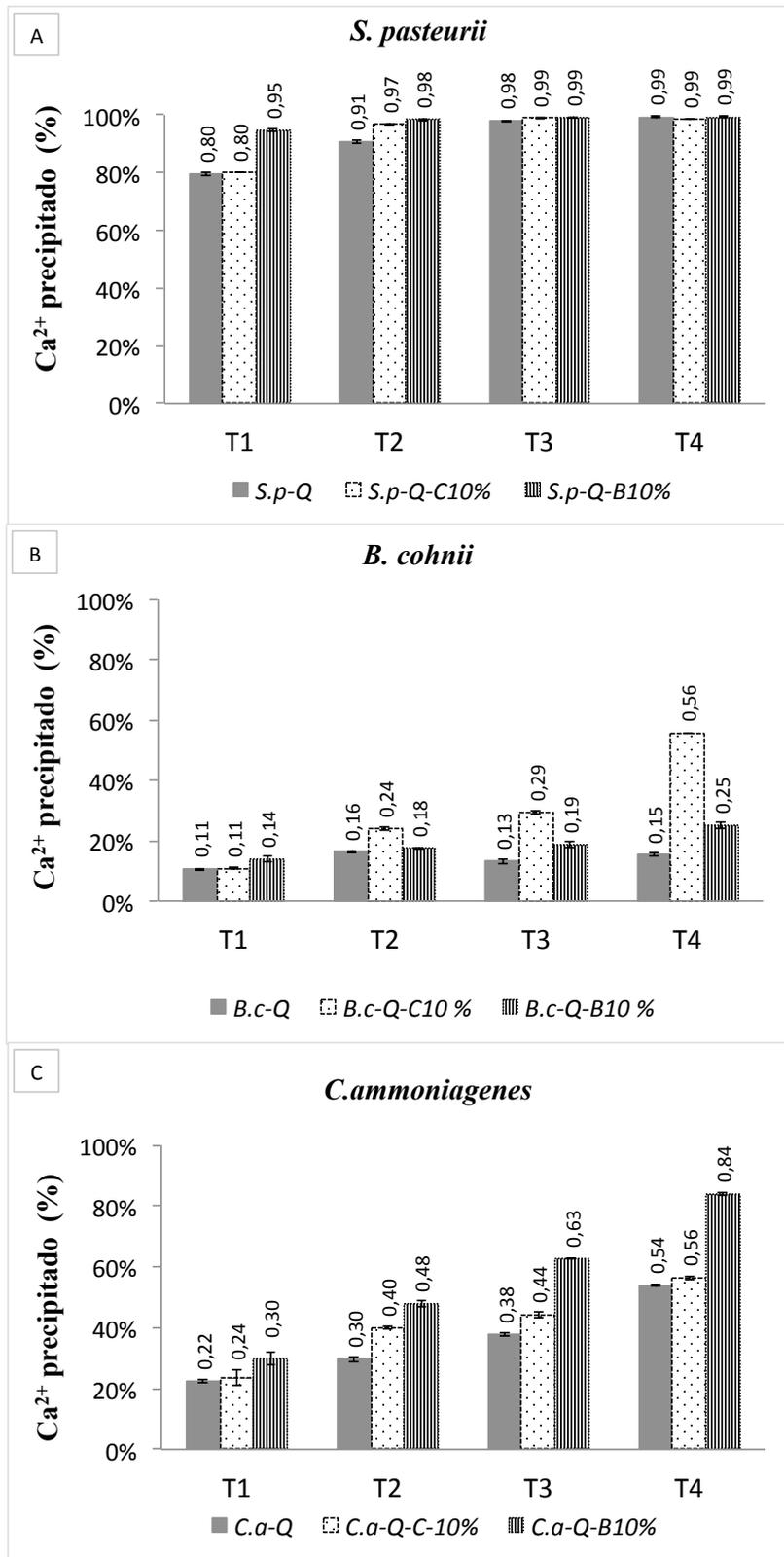


Figura 4-59. Eficiência do processo em cada tratamento (cálcio precipitado como percentagem do cálcio fornecido) nas amostras de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10% biotratadas com A) *S. pasteurii*. B) *B. cohnii*. C) *C. ammoniagenes*.

Nas amostras de solo biotratadas com *S. pasteurii* (Figura 4-59 A) a eficiência do processo foi alta desde o primeiro tratamento, com 95% de cálcio precipitado na amostra de quartzo-bentonita (Q-B10%) e 80% nas amostras de quartzo-caulinita (Q-C10%) e a areia de quartzo (Q), mostrando uma diferença de 15% de cálcio precipitado entre as amostras de Q-B10% e as amostras de Q, Q-C10%. No segundo tratamento, a eficiência aumentou a quase 100% nas duas misturas de solos, Q-C10% e Q-B10% e aumentou a 91% na areia de quartzo, Q. Finalmente, a partir do tratamento T3, a eficiência foi máxima e aproximadamente de 100% e foi semelhante em todas as amostras.

Em contraste, nas amostras biotratadas com *B. cohnii* (Figura 4-59 B) a eficiência do processo foi baixa em todos os tratamentos, com uma máxima eficiência de 56% de cálcio precipitado na mistura de solos quartzo-caulinita (Q-C10%), atingida apenas no último tratamento (T4). Na amostra de Q e na mistura quartzo-bentonita (Q-B10%), a diferença com a amostra Q-C10% foi de 25%, com uma máxima eficiência de 25% no T4. Nos tratamentos T1 a T3, a eficiência em todas as amostras foi aumentando muito ligeiramente.

Nas amostras biotratadas com *C. ammoniagenes* (Figura 4-59 C) o comportamento foi intermediário em relação aos ensaios usando *S. pasteurii* e *B. cohnii*. Foi observada, uma diferença na eficiência do processo entre a mistura de solos quartzo-bentonita (Q-B10%) e as amostras de Q e mistura de solos quartzo-caulinita (Q-C10%). Esta diferença aumentou nos últimos dois tratamentos (T3 e T4). A máxima eficiência foi de 84% na amostra Q-B10%, no T4, e na amostra de Q e na Q-C10%, a máxima eficiência foi em torno de 56 % de cálcio precipitado.

Nas amostras controles de Q, Q-C10% e Q-B10%, sem microrganismo, a máxima percentagem do cálcio precipitado foi de 8% na mistura de solos Q-B10% (Figura 4-60).

Com os resultados obtidos, foram observadas diferentes tendências na precipitação do cálcio segundo o tipo de amostra, sugerindo uma influência do mineral no processo de MICCP, como foi observado nos bioensaios ao nível de Erlenmeyer. Com os três microrganismos utilizados a tendência geral foi de uma menor precipitação de carbonato de cálcio na areia de quartzo (Q) e com duas das cepas, *S. pasteurii* e a *C. ammoniagenes*, a tendência foi de uma maior precipitação de carbonato de cálcio na

mistura quartzo 90% - bentonita 10% (Q-B10%). A presença de 10% de bentonita misturada com a areia, parece favorecer a precipitação do cálcio. Estes resultados concordam com os resultados dos bioensaios em Erlenmeyer, que apresentaram uma maior precipitação de cálcio na amostra de bentonita, seguida pela caulinita. Uma hipótese a considerar é a influência do potencial Z e PCZ, que no caso da mistura Q-B 10%, tem PCZ de 7,8, valor menor que o pH do meio líquido que atingiu um pH máximo de 8,3, enquanto que a mistura Q-C 10% tem PCZ de 9,7, maior que o pH do meio líquido circundante. Segundo Camapum de Carvalho *et al.* (2015), de modo geral, as partículas tendem a flocular em meio mais ácido ou próximo do PCZ, como no caso da amostra Q-C 10%, e tendem a se dispersar em meio mais alcalino do que o PCZ, como no caso da amostra Q-B 10%.

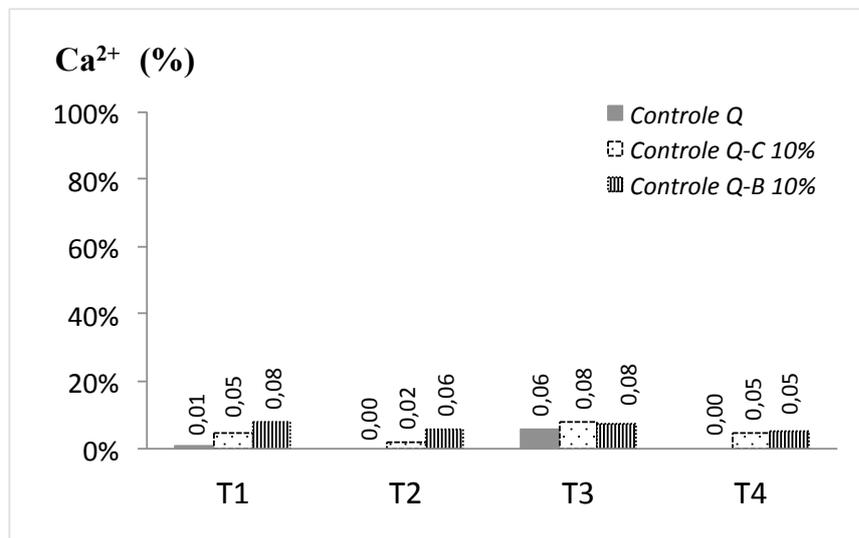


Figura 4-60. Percentagem de cálcio precipitado nas amostras controles, ao final de cada tratamento.

Por análises estatísticas por comparação de médias (teste de Tukey), com um intervalo de confiança do 95%, foi confirmado que nos ensaios com *S. pasteurii* (Figura 4-59 A), em nenhum dos tratamentos, houve diferenças significativa entre as amostra de Q e a mistura Q-C10% (valor P de 0,7, maior que 0,05). Nos ensaios com *B. cohnii* (Figura 4-59 B) as diferenças significativas entre amostras foram observadas a partir do tratamento T2. Nos ensaios com *C. ammoniagenes* (Figura 4-59 C), no tratamento T1 não houve diferenças significativas entre as amostras, porém, a partir do tratamento T2, a amostra de areia (Q) apresentou diferencias com a mistura Q-B10%, mas entre as misturas de solos não foram observadas diferenças. Já no tratamento T3, foram

encontradas diferenças entre as duas misturas de solos, Q-C10% e Q-B10%. Finalmente, no tratamento T4, houve diferenças significativas entre as três amostras. Isto é, a cada novo tratamento fornecido, foi aumentando a diferenças entre as amostras.

Além disso, as maiores diferenças foram observadas segundo o microrganismo utilizado. A reação mais rápida de conversão da ureia e precipitação de carbonato de cálcio ocorreu nos ensaios usando *S. pasteurii* e no segundo lugar com *C. ammoniagenes* e a reação mais lenta de precipitação de carbonato de cálcio foi com *B. cohnii*. Nos experimentos usando a linhagem *S. pasteurii*, observou-se nas primeiras 48 h uma eficiência entre 80% e 95%, enquanto que naqueles com a *C. ammoniagenes* 30% e com a *B. cohnii* apenas 15% de eficiência. A atividade uréase da *S. pasteurii* DSM 323, neste experimento foi calculada entre 20 e 30 mM/h, enquanto que a cepa *C. ammoniagenes* apresentou uma atividade entre 4 e 18 mM/h e a *B. cohnii* mostrou uma atividade entre 4 e 8 mM/h. Na literatura são encontradas atividades maiores e menores na *S. pasteurii*, 2,7 mM/h (Fujita *et al.*, 2000), entre 9 e 130 mM/h (Van Paassen, 2009) e 800 mM/h (Whiffin, 2004).

A Figura 4-61 mostra o comportamento do cálcio em solução e o oxigênio dissolvido, ao final de cada tratamento.

As gráficas sugerem uma relação fraca entre as variáveis cálcio em solução (Ca^{2+}) e oxigênio dissolvido (OD), sendo que em algumas das amostras o maior consumo do cálcio ocorreu nos tratamentos com menores quantidades de oxigênio dissolvido na solução.

Nas amostras biotratadas com *S. pasteurii* (Figura 4-61 A), com o primeiro tratamento (T1) nas amostras de areia (Q) e a mistura Q-C 10%, o cálcio em solução foi em torno de 5000 mg/l e o OD foi de 1,5 a 2 mg/l, já no segundo (T2), terceiro (T3) e último tratamento (T4), diminuiu o cálcio em solução a aproximadamente 1000 mg/l, associado a uma maior eficiência do tratamento, uma maior precipitação de carbonato de cálcio e maior consumo de oxigênio, e nesses tratamentos (T2, T3 e T4), o OD foi menor, aproximadamente a 1 mg/l. Na amostra Q-B10%, a tendência foi semelhante, com maior OD depois do tratamento T1 e uma diminuição do OD nos tratamentos T2, T3 e T4.

Nas amostras biotratadas com *B. cohnii* (Figura 4-61 B) não foi observada uma tendência geral no comportamento cálcio em solução (Ca^{2+}) e oxigênio dissolvido (OD) ao final de cada tratamento. Na areia (Q) e na mistura Q-B10%, o cálcio em solução permanece quase constante e em torno de 15000 mg/l, valor que corresponde a só um 16% de cálcio precipitado e nessas amostras o OD fica acima de 3 mg/l. Por outro lado, a amostra Q-C 10% que apresentou a menor quantidade de cálcio em solução e portanto a maior precipitação de carbonato de cálcio, o OD sempre foi menor de 3 mg/l.

Nas amostras biotratadas com *C. ammoniagenes* (Figura 4-61 C), o comportamento da mistura Q-B10%, foi semelhante ao observado na amostra de Q-B 10% biotratada com *S. pasteurii*, com menor OD nos tratamentos com menor cálcio em solução, ou seja, nos tratamentos T2, T3 e T4. As amostras de areia (Q) e mistura Q-C 10%, que apresentaram maiores quantidades de cálcio em solução em comparação com a mistura Q-B10%, apresentaram também valores maiores de OD.

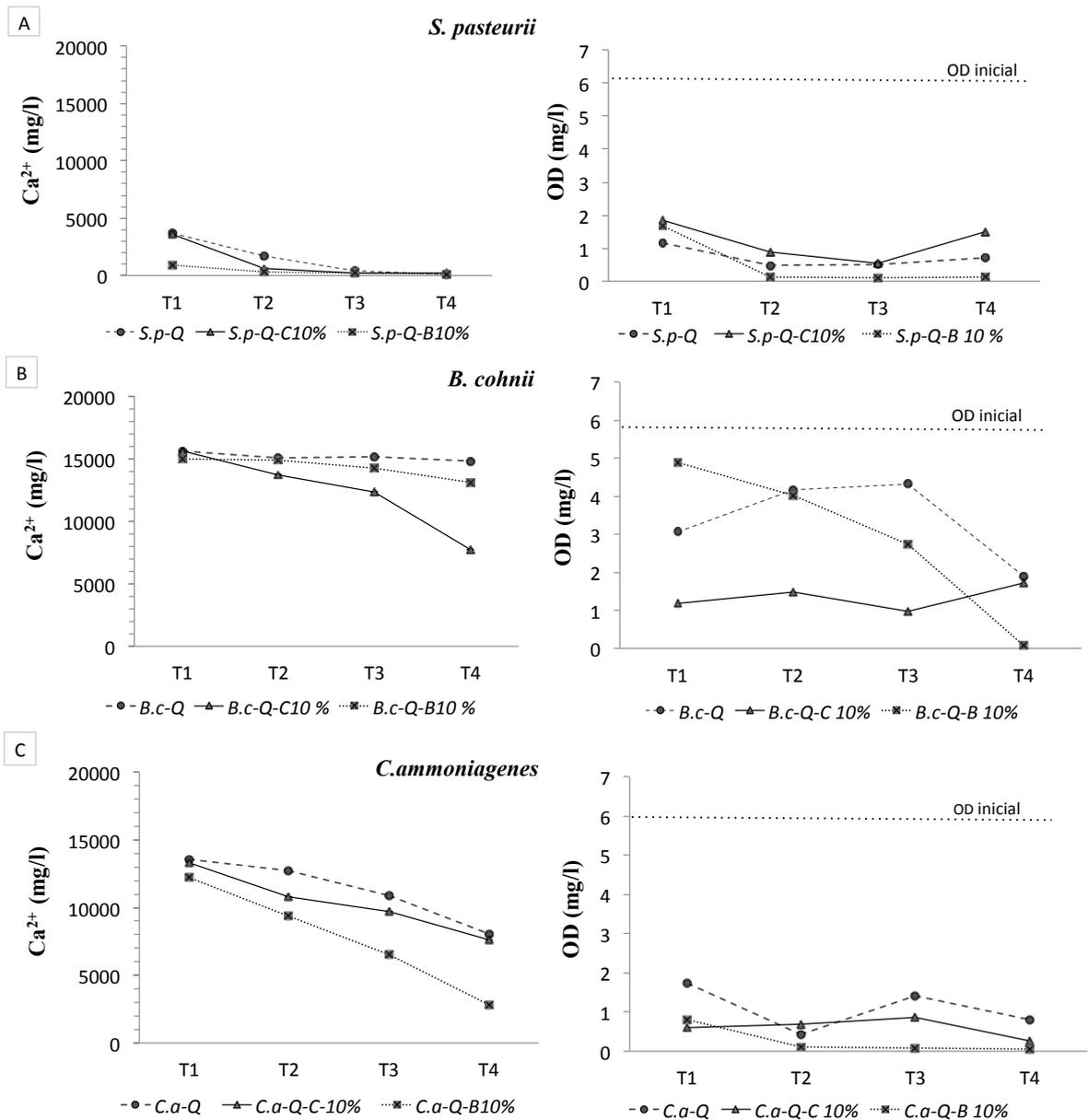


Figura 4-61. Relação cálcio em solução (Ca²⁺) e o oxigênio dissolvido (OD), em cada tratamento das amostras de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10% biotratadas com A) *S. pasteurii*, B) *B. cohnii*, C) *C. ammoniagenes*.

✓ *Comportamento da concentração do amônio (NH₄) em solução*

Durante a MICCP, o amônio (NH₄) é um subproduto da atividade metabólica. A Figura 4-62 mostra o comportamento do amônio gerado nos diferentes tratamentos.

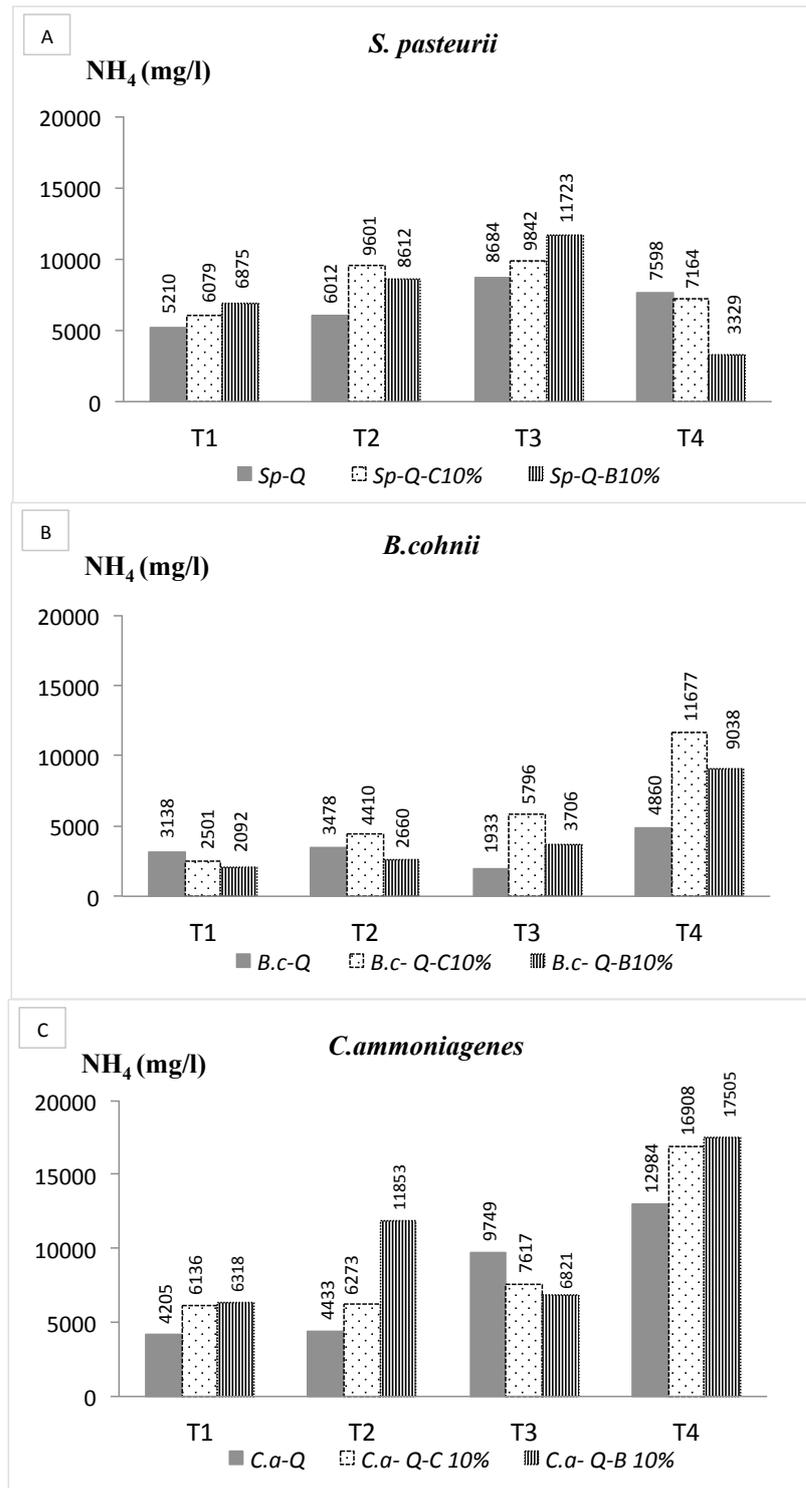


Figura 4-62. O amônio (NH_4) ao final de cada tratamento, amostras de Q, mistura Q-C 10%, Q-B 10% biotratadas com (A) *S.pasteurii*. (B) *B.cohnii*. (C) *C. ammoniagenes*.

No geral, o amônio aumenta a cada tratamento. Nos ensaios com a *S. pasteurii* (Figura 4-62 A) foi observada uma ligeira diminuição na geração do amônio no tratamento T4 e a tendência geral foi de uma menor quantidade de amônio na amostra de Q, exceto no

tratamento T4, onde a amostra de Q apresentou o maior valor de NH_4 em comparação com as outras amostras.

Nas amostras com *B. cohnii* (Figura 4-62 B), o amônio foi aumentando depois de cada novo tratamento, com maior valor de NH_4 em solução na mistura de solos Q-C10%. O amônio gerado na MICCP usando a linhagem *B. cohnii*, apresenta os menores valores de NH_4 em solução.

Os maiores valores do amônio nestas experimentações foi observado no tratamento T4 das amostras tratadas com a *C. ammoniagenes*, (Figura 4-62 C). A tendência nas amostras usando *C. ammoniagenes* foi uma maior quantidade de NH_4 em solução nas amostras de misturas de solos Q-B10%, exceto no tratamento T3.

A Figura 4-63 mostra o comportamento do cálcio precipitado e o amônio gerado em cada tratamento.

O produto da reação da hidrólise da ureia, são 2 mols de amônio (NH_4^+) e o carbonatos CO_3^{2-} (Ver Equação 2-8). A geração de NH_4^+ aumenta o pH local e a reação continua espontaneamente para formar carbonato de cálcio (Mitchell e Ferris, 2005), então, pode-se esperar que a uma maior geração de amônio, e com as condições de alcalinidade necessárias, a precipitação de carbonato de cálcio seja maior.

Na Figura 4-63A, Figura 4-63B e Figura 4-63C, é observado que o amônio gerado durante a MICCP, tem relação direta com o cálcio precipitado.

Nos tratamentos como maior precipitação de cálcio, houve maior geração de amônio. Em todos os ensaios, a menor quantidade de amônio foi gerado nas amostras de areia Q. Nos ensaios com *B. cohnii*, a maior quantidade de NH_4 foi gerado na amostra correspondente à mistura de solos Q-C10%, enquanto, na *S. pasteurii* e *C. ammoniagenes*, a tendência geral foi de uma maior quantidade de amônio em solução nas amostras das misturas de solos Q-C10% e Q-B10%.

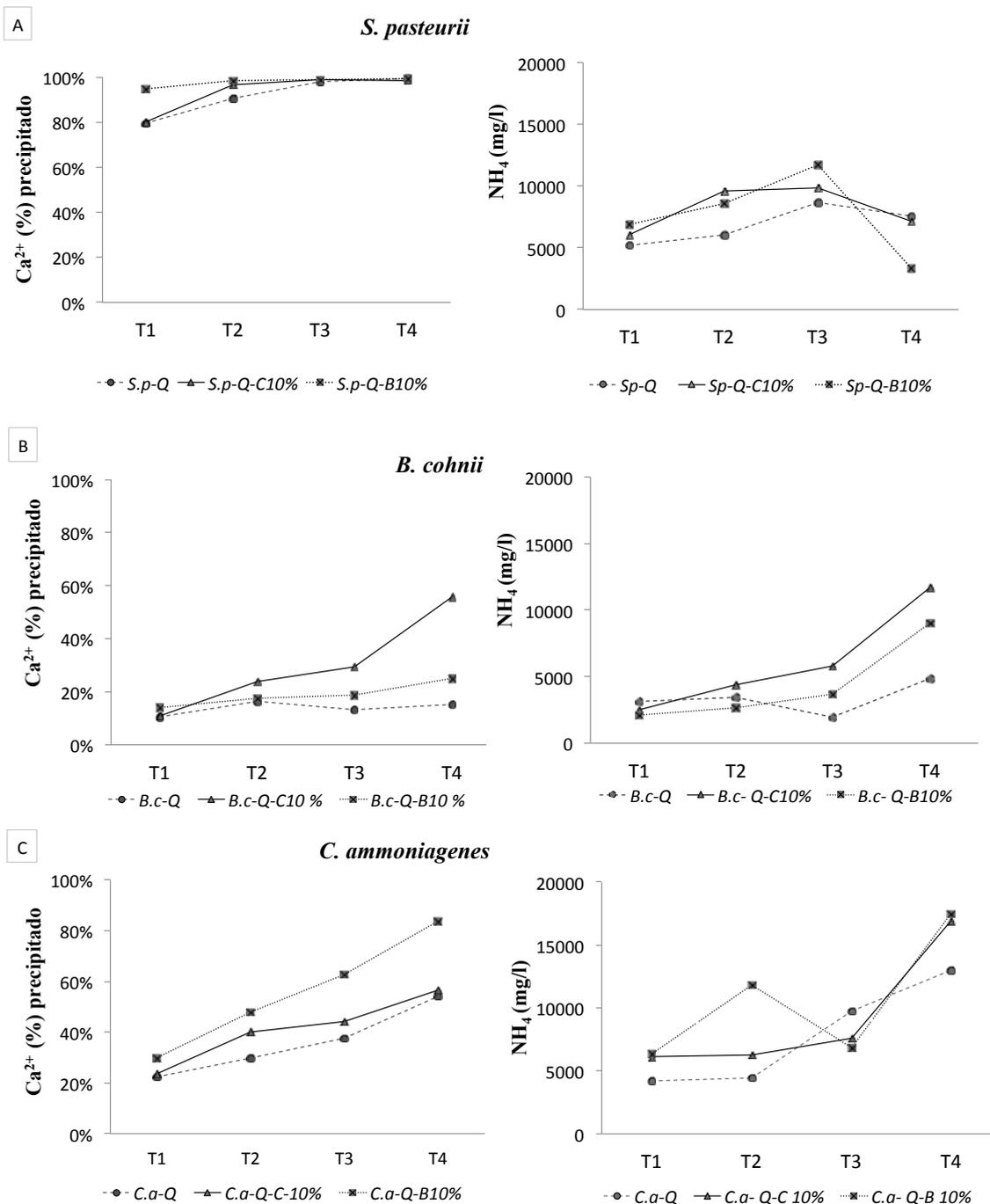


Figura 4-63. Relação amônio gerado (NH₄) e o cálcio precipitado, em cada tratamento com A) *S. pasteurii*, B) *B. cohnii*, C) *C. ammoniagenes*.

4.4.1.2 Estágio 1: verificação da cimentação dos corpos de prova

Ao final do tratamento, as amostras foram lavadas com água destilada. A Figura 4-64 apresenta a amostra de areia de quartzo misturada com bentonita (Q-B10%), em diferentes etapas do tratamento microbiológico.

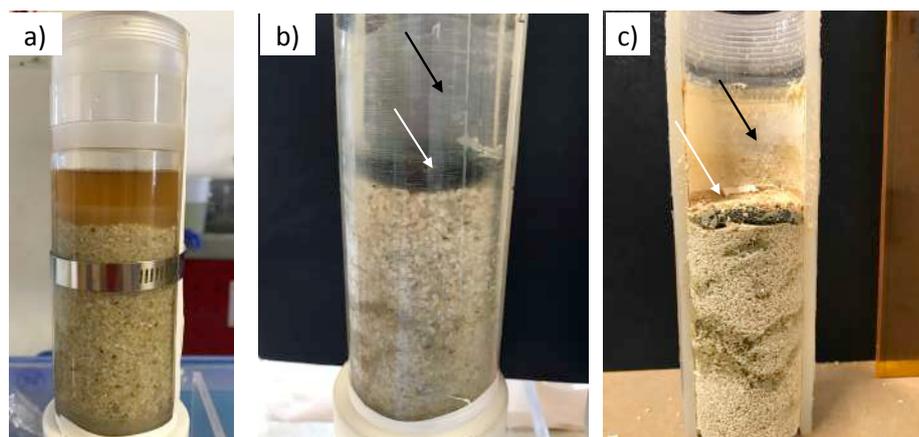


Figura 4-64. Amostra de areia de quartzo-bentonita (Q-B10%). a) amostra *Sp*-Q-B10%, no início do tratamento. b) controle Q-B10% ao final do tratamento. c) amostra *Sp*-Q-B10%, ao final do tratamento, com carbonato de cálcio precipitado nas paredes do molde em acrílico (seta preta) e no topo do filtro superior (seta branca).

Na Figura 4-64 é observada a diferença entre o controle e a amostra biotratada. Nas amostras biotratadas, nas paredes do molde em acrílico transparente, que estava em contato com a solução de cimentação, ao final do tratamento permanece aderido carbonato de cálcio de cor creme, e também na parte superior do filtro foi precipitada uma grande quantidade de carbonato de cálcio, enquanto, nas amostras controles, nenhuma alteração é observada nas paredes nem o filtro. Uma vez que o molde foi aberto, as amostras foram removidas e secas ao ar por 10 dias.

As amostras de areia de quartzo (Q) e a mistura Q-C10%, biotratadas com *S. pasteurii* e seus amostras controles, são apresentadas na Figura 4-65.

As imagens da Figura 4-65 A-B correspondem à amostra de areia de quartzo, mostrando em (A) o corpo de prova biocimentado com *S. pasteurii*, evidência da transformação desde areia fofa a areia muito compacta, semelhante a um arenito, e na imagem (B) o controle da amostra de areia sem apresentar evidências de cimentação, confirmando a ação dos microrganismos e o grande potencial do processo de MICCP para a melhora das propriedades do solo, neste caso numa areia de grão meio.

As imagens da Figura 4-65 C-D correspondem à mistura de solos quartzo-caulim com dosagem 90%-10%, mostrando em (C) o corpo de prova biocimentado com *S. pasteurii*, e em (D) o controle da amostra Q-C10% sem apresentar evidências de cimentação. Estes corpos de prova, tem em média, altura de 10,4 cm, peso específico (γ) de 15,0 KN/m³, e foram utilizados para ensaios de resistência à compressão simples.



Figura 4-65. Imagens das amostras de Q e mistura Q-C10% ao final do tratamento de biocimentação. (A) amostra *Sp-Q* biocimentada transformada numa areia muito compacta, semelhante a um arenito. (B) controle Q sem apresentar cimentação. (C) mistura Q-C 10% biocimentada com *S. pasteurii*. (D) controle Q-C10% sem evidência da precipitação de carbonato de cálcio.

A Figura 4-66 mostra imagens do resultado do tratamento microbiológico com *S. pasteurii* na mistura areia de quartzo-bentonita (Q-B10%) e seu amostra controle.

A imagem (A) da Figura 4-66, corresponde ao corpo de prova da mistura Q-B10% cimentada parcialmente por MICCP. Na imagem é observada uma parte da amostra de solo (partículas finas de bentonita) que ficaram aderidas à parede do molde em acrílico, deixando um espaço no corpo de prova (indicado pela seta preta). Devida à manipulação da amostra biocimentada de Q-B10%, o corpo de prova foi dividido ao meio, indicando uma cimentação frágil nessa área (imagem B).

Na imagem (C) é apresentado o carbonato de cálcio precipitado na parte superior da amostra formando uma camada de até 5 mm de espessura.

A imagem em (D) mostra o controle da mistura Q-B10%, sem apresentar evidências de precipitação de carbonato de cálcio nem cimentação dos grãos. É importante enfatizar que, embora a amostra de Q-B10%, não pudesse ser usada para fazer testes de resistência, a amostra foi parcialmente cimentada (90% do volume da amostra foi cimentado) e o objetivo de melhorar suas propriedades foi alcançado.

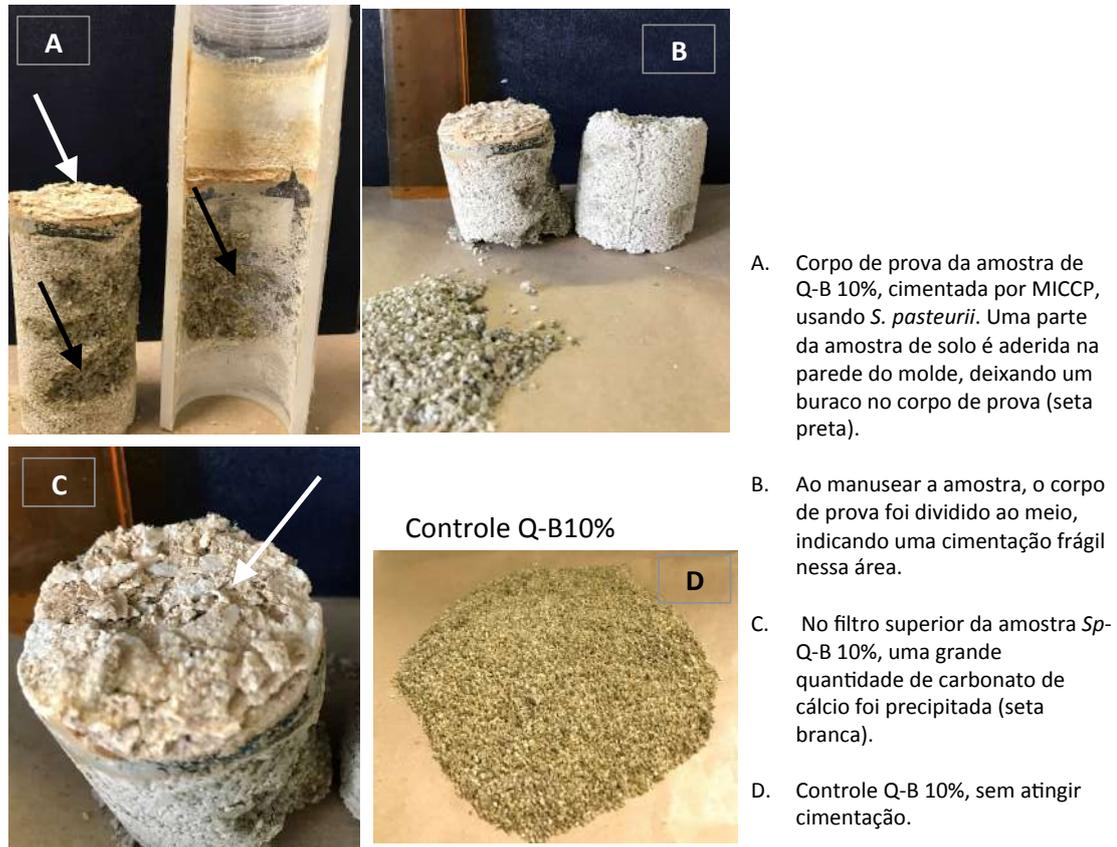


Figura 4-66. Imagens da mistura Q-B10% ao final do ensaio de biocimentação. (A) corpo de prova Q-B10% parcialmente biocimentado com *S. pasteurii*. (B) amostra de Q-B10% partida a metade depois da manipulação. (C) imagem do carbonato de cálcio precipitado na parte superior da amostra Q-B10%, (D) amostra controle Q-B10% em estado fofo.

As amostras de Q, Q-C10% e Q-B10% biotratadas com *B. cohnii*, são apresentadas na Figura 4-67.

Todas as amostras apresentaram evidências da bioprecipitação de carbonato de cálcio, porém, a cimentação das partículas não foi suficiente, pelo que não foi possível obter corpos de prova cilíndricos para os testes de resistência mecânica.

As imagens A, B e D (Figura 4-67), mostram torrões biocimentados das amostras de Q (imagem em A e B) e Q-B10% (imagem em D) de aproximadamente 4 cm de altura (quase a metade da altura total da amostra). A cimentação destas amostras não foi

homogênea, apresentando-se maior cimentação na parte superior e pouca cimentação na parte inferior da amostra.

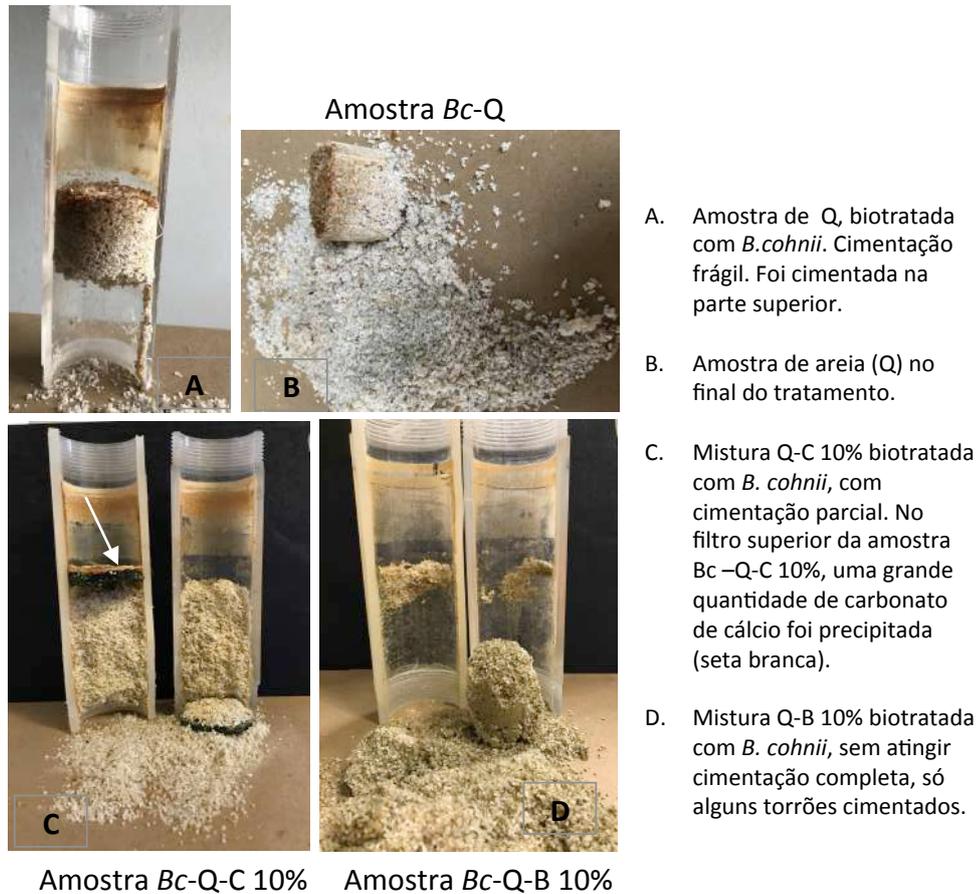


Figura 4-67. Amostras biotratadas com *B. cohnii*, com biocimentação parcial do volume total das amostras. A-B) areia de quartzo (Q). C) mistura Q-C 10%. D) mistura Q-B 10% .

Na amostra Q-C10% (imagem C), as partículas do solo foram cimentadas, mas, o corpo de prova foi dividido ao meio (de cima para baixo) na hora de tentar tirar a amostra. Além disto, foi observada uma cimentação heterogênea, como maior cimentação das partículas mais externas e menor cimentação na área central do núcleo. Do mesmo jeito do que nas amostras tratadas com *S. pasteurii*, foi precipitada uma camada de carbonato de cálcio no filtro superior.

As amostras biotratadas com *C. ammoniagenes* são apresentadas na Figura 4-68. As amostras mostraram evidências de precipitação de carbonato de cálcio e alcançaram uma biocimentação parcial do volume total das amostras.

A amostra de areia (Q) biotratada com *C. ammoniagenes* (Figura 4-68 A), mostrou a menor cimentação, onde só umas poucas partículas foram cimentadas e aderidas às paredes do molde em acrílico.

Por outro lado, na amostra de Q-C10% (imagem B) foi parcialmente biocimentada, foram observados alguns torrões cimentados e uma grande quantidade de partículas cimentadas e aderidas à moldura, mas a cimentação geral não foi o suficiente para fazer um corpo de prova cilíndrico.



Figura 4-68. Amostras biotratadas com *C. ammoniagenes*, com biocimentação parcial do volume total das amostras. A) areia de quartzo (Q). B) mistura Q-C 10%. C-D) mistura Q-B 10%.

A maior cimentação foi observada na amostra Q-B10% (imagem C), porém não foi homogênea, e o corpo de prova foi dividido na parte superior (imagem D), ficando um corpo de prova de pouca altura (aproximadamente 8 cm). Como com todas as outras amostras biotratadas, foi precipitada uma camada de carbonato de cálcio na parte superior do fitro.

Os melhores resultados finais, foram obtidos nas três amostras biotratadas com *S. pasteurii*, sendo que as amostras de areia de quartzo (Q) e a mistura quartzo 90%-caulim 10% (Q-C10%) foram cimentadas em 100% do volume total das amostras e a mistura quartzo 90%-bentonita 10% (Q-B10%) foi biocimentada em 90% volume total da amostra.

Os resultados da precipitação de carbonato de cálcio a partir da medição do cálcio em solução mostraram que nas três amostras foi precipitada uma quantidade semelhante de carbonato de cálcio, sendo ligeiramente maior na amostra de Q-B10%, porém, esta amostra apresentou a cimentação mais fraca ao final do tratamento. Estes resultados sugerem que a quantidade de carbonato de cálcio precipitado, não é condição suficiente para atingir um acréscimo da resistência do solo, e existem outras variáveis críticas na biocimentação dos solos por MICCP. Nestes bioensaios, esta variável poderia ser a formação de uma “ponte eficaz”, concentrada predominantemente no ponto de contato entre os grãos, Mujah *et al.* (2017), que pode ser influenciada pelos processos de adsorção, que a sua vez dependem da natureza da superfície das partículas (ASE), CTC, PCZ, potencial zeta. Neste sentido, vale a pena notar, que a mistura Q-C10% corresponde a um solo carregado positivamente, com ΔpH de 1,7 e a areia (Q) tem baixa carga de superfície, com ΔpH de -0,3, portanto, esperava-se que as bactérias foram aderidas com maior facilidade nesses solos, que na mistura Q-B10%, solo com carga negativa, ΔpH de -1,4 (Apêndice B).

De modo geral, as amostras tratadas com *B. cohnii* e *C. ammoniagenes* tiveram uma menor quantidade de carbonato de cálcio precipitada em relação às tratadas com a linhagem *S. pasteurii*, comportamento que foi evidenciado na cimentação final. Das 6 amostras biotratadas com estas cepas, a mistura Ca-Q-B10%, apresentou a maior quantidade de carbonato de cálcio precipitado, e foi a única amostra biocimentada formando um corpo de prova de 8 cm de altura, mas, durante a manipulação, houve perda da cimentação, a amostra foi dividida em duas partes pelo que não foi possível fazer ensaios de resistência.

4.4.1.3 Estágio 1: caracterização mineralógica dos solos depois do tratamento microbiológico.

A caracterização mineralógica das amostras depois do tratamento microbiológico, foi realizada por FTIR e análises no MEV usando EDX.

✓ Análises por FTIR

As Figura 4-69, Figura 4-70, e Figura 4-71, mostram os resultados das análises FTIR das amostras de: areia de quartzo-Q, mistura Q-C10% e mistura Q-B10%, biotratadas com *S. pasteurii*, *B. cohnii* e *C. ammoniagenes*. As linhas pontilhadas mostram as análises das amostras controles (sem microrganismos).

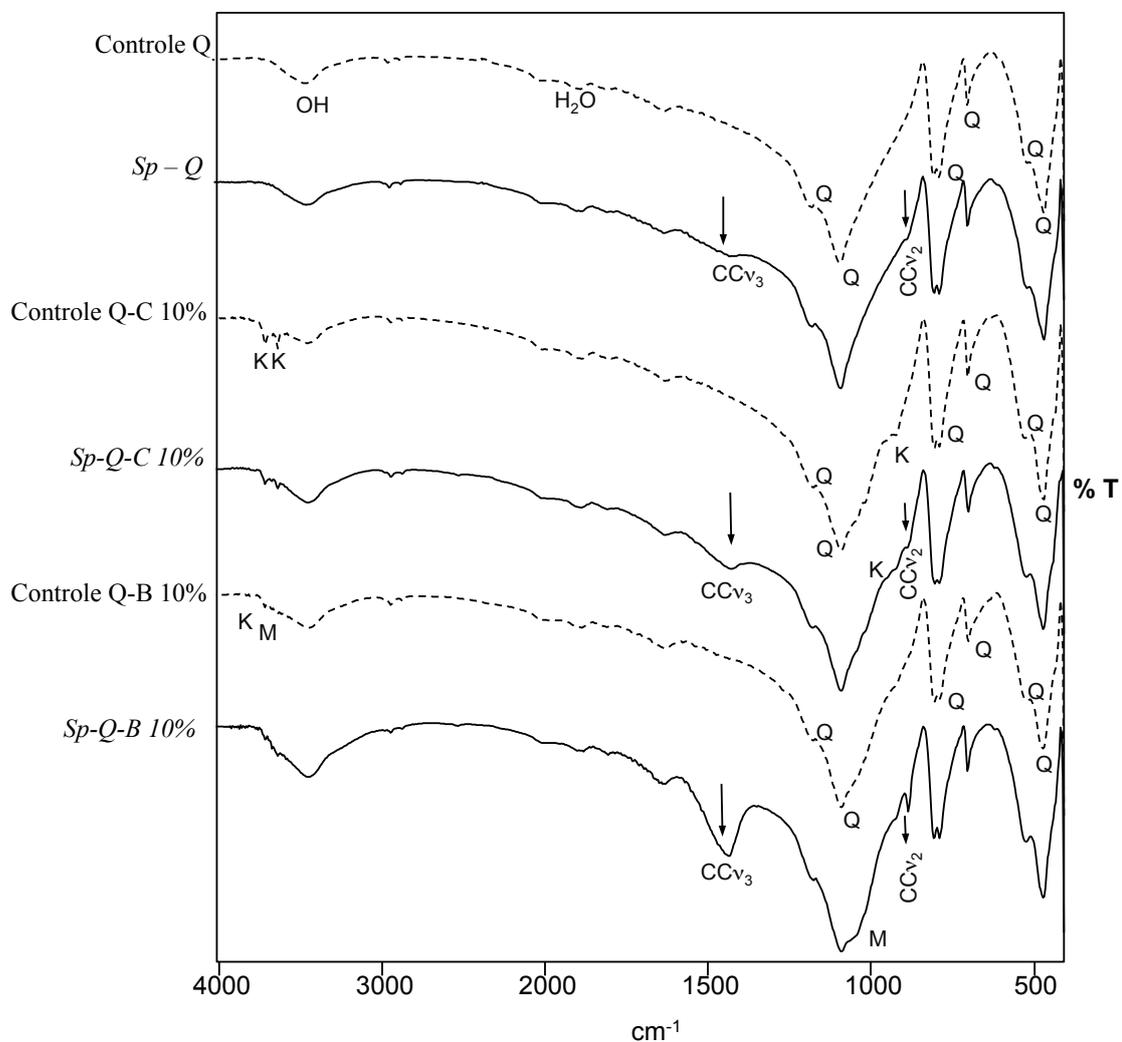


Figura 4-69. FTIR das amostras de solos (Q, Q-C10% e Q-B10%) biotratadas usando *S. pasteurii*. Nota: CC: carbonato de cálcio, Q: quartzo., K: caulinita, M: montmorilonita.

Em todos os espectros das amostras biotratadas com *S. pasteurii* (Figura 4-69), foram observadas bandas de absorção correspondentes a carbonato de cálcio cristalino em $CC\nu_2$, $876/879\text{ cm}^{-1}$ e em $CC\nu_3$, $1420/1425\text{ cm}^{-1}$, que não foram identificadas nos espectros das amostras controles. Estes sinais de carbonato de cálcio (CC) foram apenas sugeridas nas amostras de Q e na mistura Q-C10%, sendo que foram bem definidas na amostra da mistura Q-B10% em 876 cm^{-1} e 1424 cm^{-1} .

A Figura 4-70 e Figura 4-71, mostram os espectros das amostras biotratadas com *B. cohnii* e *C. ammoniagenes*, respectivamente. Em ambas figuras, são observadas bandas de absorção correspondentes a carbonato de cálcio, mas apenas nas misturas de solos Q-B10%, isto é, nas amostras *Bc-Q-B10%* e *Ca-Q-B10%*.

Na amostra de Q-B10% biotratada com *B. cohnii* (Figura 4-70) apenas foi observado o sinal do CC associado ao $CC\nu_3$, em 1480 cm^{-1} , enquanto que na amostra de Q-B10% biotratada com *C. ammoniagenes* (Figura 4-71), foram observadas as duas bandas de absorção: a da $CC\nu_2$ (878 cm^{-1}) e outra banda de maior intensidade que corresponde à $CC\nu_3$ (1425 cm^{-1}).

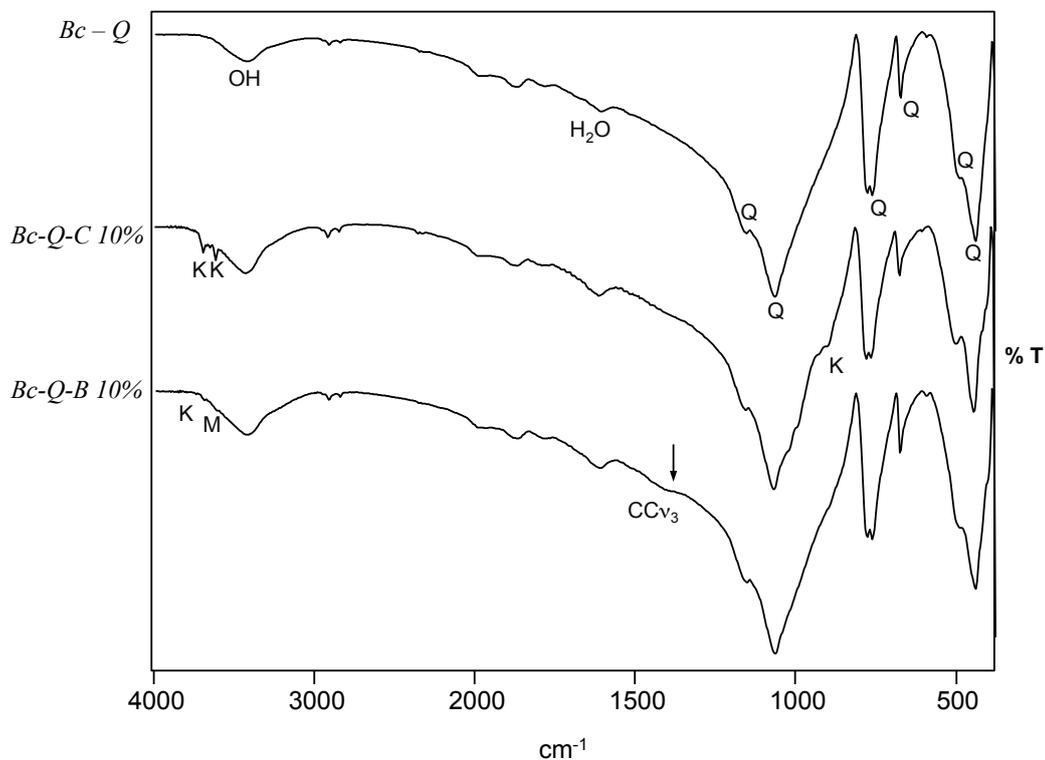


Figura 4-70. FTIR das amostras de solos (Q, Q-C10% e Q-B10%) biotratadas usando *B. cohnii*.
Nota: CC: carbonato de cálcio, Q: quartzo., K: caulinita, M: montmorilonita.

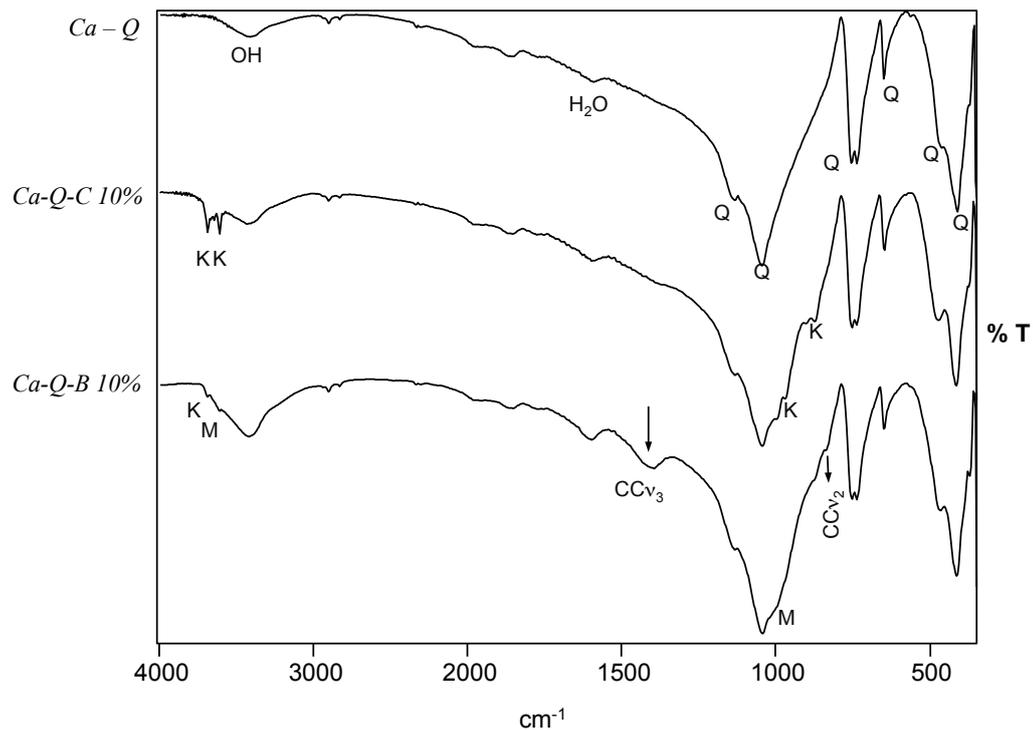


Figura 4-71. FTIR das amostras de solos (Q, Q-C10% e Q-B10%) biotratadas usando *C. ammoniagenes*. Nota: CC: carbonato de cálcio, Q: quartzo., K: caulinita, M:montmorilonita.

Estes resultados confirmaram a precipitação de carbonato de cálcio nas amostras submetidas a tratamento microbiológico. Segundo os espectros e a intensidade dos sinais de carbonato de cálcio, a maior precipitação deste foi dada nas amostras biotratadas com *S. pasteurii*, resultado que mostra correspondência com o comportamento do pH, OD, geração de NH_4 e o cálcio precipitado, analisado do meio líquido drenado das amostras.

Por outra parte, a precipitação do carbonato de cálcio foi aparentemente influenciada pelo tipo de mineral, representado pelas diferentes amostras, sendo que em todos os experimentos, independente do microrganismo utilizado, a maior precipitação ocorreu na mistura de solos quartzo-bentonita (dosagem Q-B10%) e a menor precipitação na amostra de areia de quartzo (Q). Várias hipóteses podem ser consideradas para este comportamento, em relação com a maior ou menor atração do cátion cálcio nos minerais favorecendo a nucleação dos cristais de calcita, a presença de minerais que favorecem a precipitação de carbonato de cálcio e a adesão das bactérias nos diferentes substratos minerais.

A estrutura mesma da montmorilonita favorece a atração dos cátions de cálcio e poderia estar favorecendo (no caso da bentonita) a nucleação dos cristais de carbonato (Kralj e Vdovic, 2000). Esta maior atração do Ca^{2+} na bentonita pode ser dada pela carga negativa nas bordas do mineral (pela dissociação dos hidrogênios (H^+) das hidroxilas (OH^-) a pHs alcalinos, aumentando a capacidade de troca catiônica (Fernández, 1982), que na amostra de bentonita foi de 37,7 meq/100g em comparação com 0,5 e 0,24 meq/100g nas amostras de caulinita e o quartzo respectivamente.

Além disso, a maior área superficial específica (ASE) da montmorilonita, entre 550 e 700 m^2/g , fornece uma área maior para os cátions de cálcio e em geral para que aconteçam reações de superfície que podem influenciar a precipitação de carbonato de cálcio, em comparação com a área superficial da caulinita, com ASE entre 10 e 30 m^2/g , e a menor ASE do quartzo entre 1 e 3,6 m^2/g (Camapum de Carvalho *et al.*, 2015).

Por outra parte, diversos autores encontraram no processo da MICCP, uma tendência para maior precipitação de CaCO_3 sobre substratos cálcicos que por exemplo em substratos de silicatos (Rebata-Landa, 2007; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2012). Comportamento que parece estar relacionado com a adesão das bactérias às superfícies dos minerais, adesão dada pela interação entre cargas eletrostáticas (Scholl *et al.*, 1990) e nesse sentido, é explicada a maior adesão em substratos cálcicos (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2012). Isso explicaria a maior precipitação de carbonato de cálcio nas amostras com bentonita, que tem carbonato de cálcio em sua composição mineralógica, em comparação com as amostras com caulinita e o quartzo.

✓ *Análises no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).*

Para fazer as análises no MEV, foram utilizados torrões biocimentados das amostras que Q e a mistura Q-C10% biotratadas com *S. pasteurii*, com o montagem mostrado na Figura 4-72.

As imagens obtidas revelaram a presença de carbonato de cálcio nas amostras que foram observadas. A Figura 4-73, Figura 4-74 e Figura 4-75, mostram os resultados das análises na amostra de areia de quartzo (Q) biotratada com *S. pasteurii*.



Figura 4-72. Montagem no MEV dos torrões das amostras biocimentadas de Q e Q-C10% com *S. pasteurii*.

Na Figura 4-73 é apresentada uma análise da amostra de areia (*Sp-Q*) em 50 aumentos, e foram observados os grãos de areia cobertos por carbonato de cálcio e também o carbonato de cálcio precipitado formando uma ponte entre as partículas de areia.

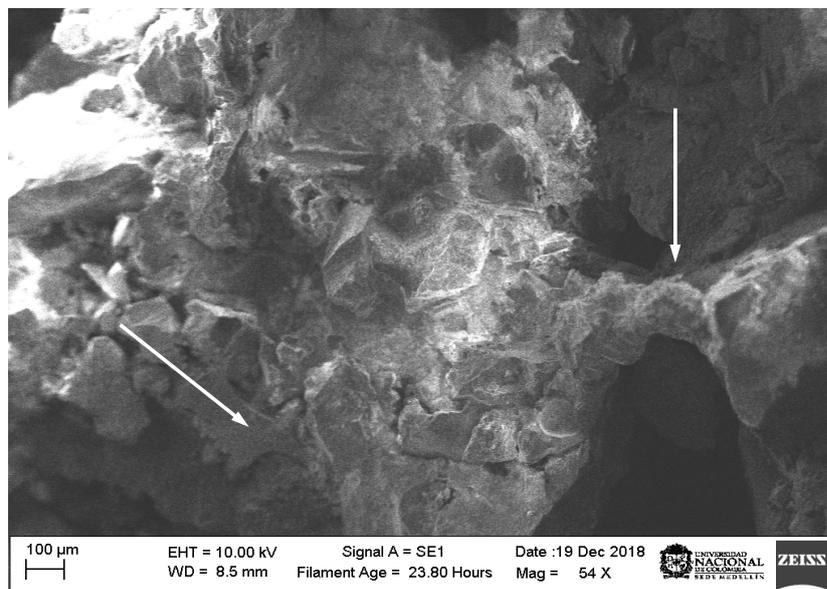


Figura 4-73. Imagem no MEV da amostra de areia de quartzo biotratada com *S. pasteurii*. imagem em 50 X. As setas brancas indicam cristais de carbonato precipitados cobrindo os grãos de areia e formando pontes entre eles

No mapa de elementos da amostra *Sp-Q* (Figura 4-74) foi detectada a presença de silício (Si, de cor azul) e oxigênio (O, de cor verde), correspondente à areia de quartzo. Preenchendo os espaços entre os grãos de quartzo, foi detectado o cálcio (Ca, de cor laranja) e o carbono (C, vermelho), correspondente ao carbonato de cálcio.

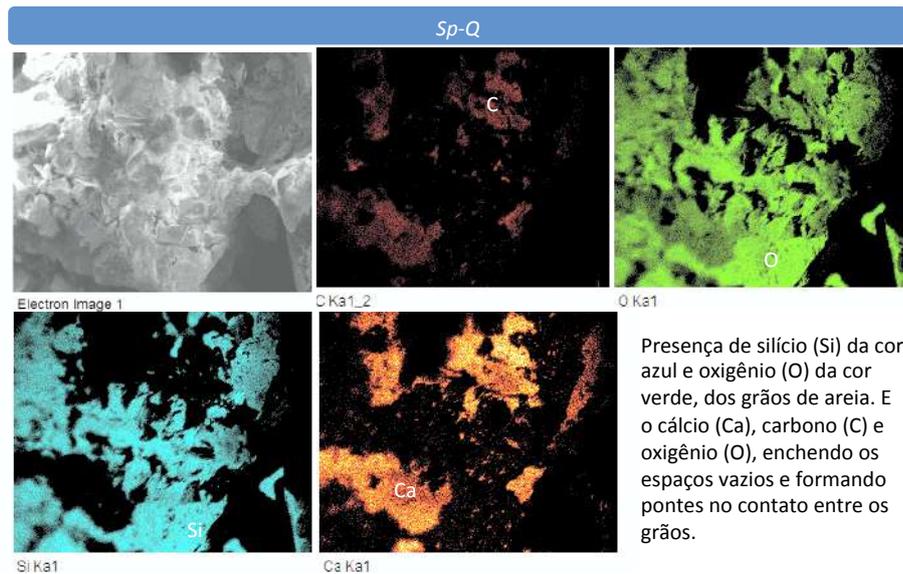


Figura 4-74 Mapa de composição de elementos da amostra *Sp-Q*, contendo: C (carbono), O (oxigênio), Si (silício) e Ca (cálcio).

A Figura 4-75, mostra outra imagem da areia de quartzo (Q) biotratada com *S. pasteurii*, em 500 aumentos, onde é observada uma grande quantidade de cristais de carbonato de cálcio de hábito romboédrico, possivelmente de calcita, cobrindo os grãos de quartzo.

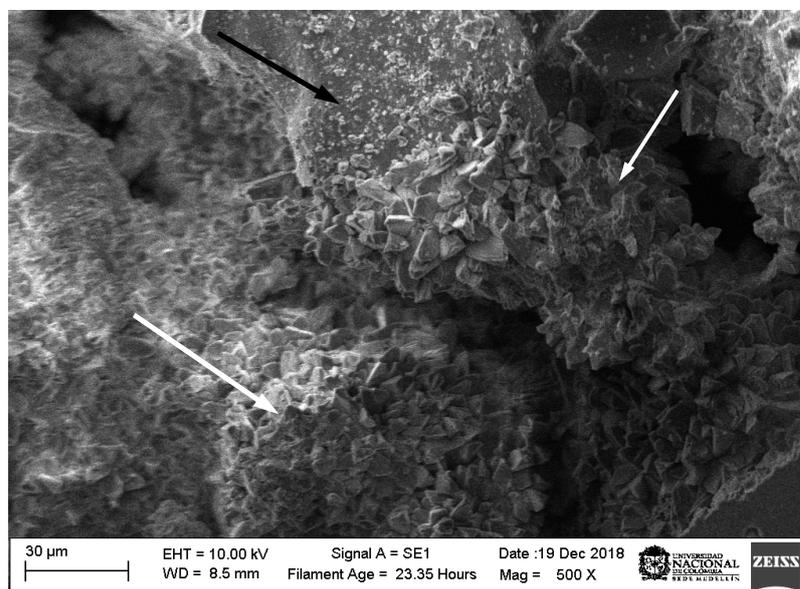
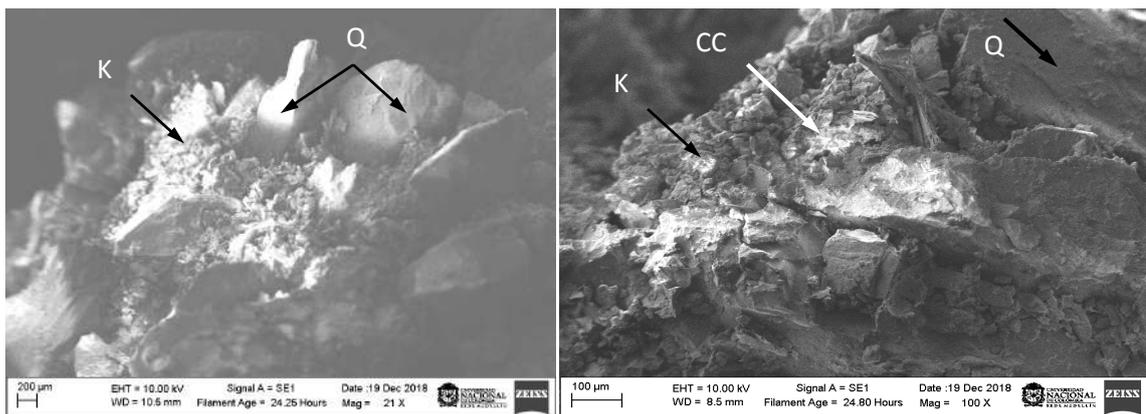


Figura 4-75. Imagem no MEV da amostra de areia de quartzo biotratada com *S. pasteurii*. Imagem a 500X mostrando a partícula de quartzo (seta preta) coberta por cristais de carbonato de cálcio (setas brancas), possivelmente de calcita pelo hábito romboédrico.

Estas imagens confirmam que, como resultado da MICCP usando a linhagem de *S. pasteurii* na amostra de areia de quartzo (Q), foram precipitados cristais de carbonato de

cálcio na matriz de solo, alguns deles cobrindo os grãos e outros no contato entre partículas, formando pontes e agindo como cimento. Nas imagens no MEV, também foram observados espaços vazios entre partículas, que não foram completamente preenchidos pelo carbonato precipitado. Essa distribuição, mais do que a quantidade de carbonato de cálcio precipitado, possivelmente foi o que fez com que a amostra fosse cimentada e atingira um maior valor de resistência à compressão simples.

A Figura 4-76 mostra as imagens de MEV da amostra composta pela mistura areia de quartzo-90%-caulim 10% (Q-C10%), biotratada com a cultura de *S. pasteurii*. A imagem (a) mostra partículas irregulares (quartzo seguramente) e partículas de forma planar (presumivelmente caulinita), além de dos espaços entre elas preenchidos, seguramente pelo carbonato de cálcio, identificado nas análises FTIR. A imagem (b) corresponde à mesma amostra em 100X e mostra a superfície das partículas de areia (setas pretas) cobertas por cristais de carbonato de cálcio (seta branca).



a) Imagem MEV, modo SE, 21X. Mistura 90% areia de quartzo – 10% Caulim, biotratada com *S. pasteurii*. Q. Quartzo. K: caulinita.

b) Imagem MEV, modo SE, 100 X. Mistura 90% areia de quartzo – 10% Caulim, biotratada com *S. pasteurii*. Q. Quartzo. K: caulinita. CC: carbonato de cálcio.

Figura 4-76. Imagens de MEV da amostra de Q-C10% biotratada com a *S. pasteurii*. a) imagem em 21X. b) imagem em 100X, mostrando a superfície das partículas de areia cobertas por cristais de carbonato de cálcio (seta branca).

Na Figura 4-77 observa-se o mapeamento dos elementos da Figura 4-76b), onde pode ser confirmada a presença de grãos de quartzo (Si, O) e caulinita (Al, Si, O) cobertos parcialmente por carbonato de cálcio precipitado pela MICCP, evidente pelos mapas de Ca (laranja) e C (vermelho).

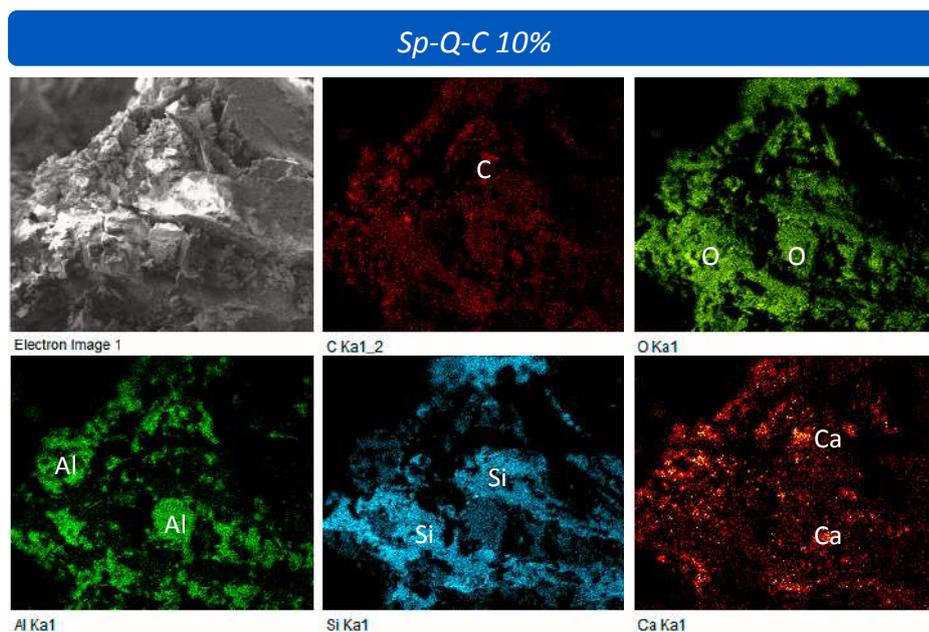


Figura 4-77 Mapa de composição de elementos da amostra *Sp-Q-C10%*, contendo: C (carbono), O (oxigênio), Al (alumínio), Si (silício) e Ca (cálcio).

4.4.1.4 Estágio 1: caracterização física, química e mecânica dos solos depois do tratamento microbiológico.

Neste item são apresentados os resultados dos ensaios das análises granulométricas, resistência à compressão simples, susceptibilidade à erosão e os resultados das análises químicas (cátions trocáveis e a capacidade de troca catiônica).

✓ *Distribuição granulométrica:*

Depois do tratamento microbiológico, foram feitas análises granulométricas por peneirado nas amostras. As curvas granulométricas são apresentadas no Apêndice A. Estes análises correspondem, no caso da amostras de Q e mistura Q-C10% biotratadas com *S. pasteurii*, às amostras de solo depois de falhar os corpos de prova a compressão simples e nas outras amostras (*Sp-Q-B10%* e as amostras biotratadas com *B. cohnii* e *C. ammoniagenes*), correspondem a os solos em estado fofo, sem ter em conta os torrões de solos que foram efetivamente biocimentados. Isto é, estas granulometrias não representam a granulometria real dos solos depois do tratamento, dado que as agregações formadas por o tratamento microbiológico foram destruídas mecanicamente antes de fazer o teste.

No entanto, foram observadas mudanças nas curvas granulométricas das amostras antes e depois do tratamento microbiológico, principalmente um aumento no conteúdo de finos (peneira #200), que corresponde ao carbonato de cálcio precipitado durante o tratamento usando os três microrganismos. A maior diferença entre as curvas foi observada nas amostras *Sp-Q* e *Sp-Q-C10%*, e estas amostras correspondem às amostras que atingiram a maior cimentação entre partículas, moldando corpos de prova cilíndricos.

A Tabela 4-5 mostra a percentagem de finos (passa peneira #200), da amostra inicial (sem tratamento) e das amostras biotratadas depois de destruir as agregações mecanicamente.

Tabela 4-5 (%) de partículas passante pela peneira #200 (0,075 mm)

Amostra	% passa peneira #200		
	Q	Q-C10%	Q-B10%
Amostra sem tratamento	0,10	3,13	3,96
<i>S. pasteurii</i>	1,55	7,88	11,06
<i>B. cohnii</i>	0,20	5,13	9,43
<i>C. ammoniagenes</i>	0,46	5,38	10,31

O aumento de finos, foi maior nas amostras biotratadas com *S. pasteurii*. O aumento no conteúdo de finos foi semelhante entre as amostras biotratadas com *B.cohnii* e *C. ammoniagenes*.

✓ *Conteúdo de bases trocáveis:*

Os resultados da determinação das bases trocáveis em meq/100g de solo, das amostras biotratadas é mostrado na Tabela 4-6, Tabela 4-7 e Tabela 4-8.

Tabela 4-6. Bases trocáveis e capacidade de troca catiônica (CTC) das amostras de areia de quartzo.

Solo	Ca ²⁺ (meq/100g)	Mg ²⁺ (meq/100g)	Na ⁺ (meq/100g)	K ⁺ (meq/100g)	Cátions trocáveis (meq/100g)
Q	0,16	0,03	0,03	0,01	0,24
Controle Q	1	0,02	0,03	0,02	1,07
<i>Sp - Q</i>	34,3	0,02	0,03	0,08	34,4
<i>B.c - Q</i>	1,1	0,06	0,02	0,02	1,2
<i>C.a - Q</i>	13,6	0,02	0,03	0,03	13,7

Tabela 4-7. Bases trocáveis e capacidade de troca catiônica (CTC) das misturas areia de quartzo- caulim, dosagem 90%-10% (Q-C10%).

Solo	Ca ²⁺ (meq/100g)	Mg ²⁺ (meq/100g)	Na ⁺ (meq/100g)	K ⁺ (meq/100g)	Cátions trocáveis (meq/100g)
Q - C 10%	0,11	0,02	0,03	0,01	0,2
Controle Q- C 10%	4,6	0,02	0,08	0,16	4,9
<i>Sp</i> Q- C 10%	22,4	0,02	0,03	0,03	22,5
<i>B.c</i> Q- C 10%	17,5	0,02	0,05	0,12	17,7
<i>C.a</i> Q- C 10%	10,4	0,02	0,02	0,02	10,5

Tabela 4-8. Bases trocáveis e capacidade de troca catiônica (CTC) das misturas areia de quartzo- caulim, dosagem 90%-10% (Q-B10%).

Solo	Ca ²⁺ (meq/100g)	Mg ²⁺ (meq/100g)	Na ⁺ (meq/100g)	K ⁺ (meq/100g)	Cátions trocáveis (meq/100g)
Q- B 10%	0,14	0,06	0,02	0,12	0,34
Controle Q-B 10%	9,9	0,77	0,2	0,6	11,5
<i>Sp</i> Q- B 10%	21,5	0,27	0,03	0,1	21,9
<i>B.c</i> Q- B 10%	10	0,78	0,2	0,49	11,5
<i>C.a</i> Q- B 10%	9,2	0,19	0,03	0,05	9,47

Em todas as amostras de solo (Q, Q-C10%, Q-B10%), houve aumento nos cátions trocáveis, devido aos tratamentos biótico e abiótico. A principal mudança em todas as amostras foi devida ao aumento do cátion cálcio Ca²⁺. Além disso, em algumas amostras da mistura Q-C10% houve aumento do potássio (K⁺) e nas amostras da mistura Q-B10% houve aumento do cátion magnésio (Mg²⁺). O maior aumento do Ca²⁺ e da CTC ocorreu em todas as amostras biotratadas com *S. pasteurii*.

A diferença das amostras tratadas microbiologicamente (tratamento biótico) com as amostras sem tratamento (amostras originais) foi variável, dependendo do tipo de solo. A maior diferença foi observada nas amostras de areia de quartzo, com um aumento de 143 vezes na CTC da *Sp*-Q em relação com a amostra original de Q. Na mistura Q-C10% a diferença foi de 132 vezes na CTC da *Sp*-Q-C10% em relação com a amostra de Q-C10% sem tratamento. A menor diferença foi observada na amostra de Q-B10%, com aumento de 64 vezes na CTC da *Sp*-Q-B10% em relação com a amostra original de Q-B10%.

O mesmo comportamento é observado entre as amostras com tratamento biótico e os controles (tratamentos abióticos). A CTC na amostra *Sp*-Q foi 32 vezes maior do que o

controle Q, a CTC na amostra *Sp-Q-C10%* foi 4 vezes maior que no controle Q-C10% e a CTC na amostra *Sp-Q-B10%* foi apenas 2 vezes maior que na amostra controle Q-B10%.

Estes resultados sugerem que a aplicação dos reagentes nas amostras de solos, causou grandes mudanças nos cátions trocáveis, mas, adicionalmente, o processo microbiológico tem uma pequena contribuição na mudança dos cátions trocáveis, além da aplicação dos reagentes.

Também é observado, que a CTC da amostra Q-B10% (sem tratamento) foi de 0,34 meq/100g, maior que a CTC das amostras de Q e Q-C10% (sem tratamento) que foi de 0,2 meq/100g, o que pode favorecer a atração dos cátions de cálcio e a nucleação dos cristais de carbonato (Kralj e Vdovic, 2000).

✓ *Resistência à compressão simples:*

Ensaio de resistência à compressão simples (σ_{usc}), foram feitos nos corpos de prova das amostras biocimentadas com *S. pasteurii*: *Sp-Q* e *Sp-Q-C10%*. As outras amostras do estágio 1: *Sp-Q-B10%*, as três amostras biotratadas com *B. cohnii* e as três amostras biotratadas com *C. ammoniagenes*, não foram bem cimentados e nenhum corpo de prova foi formado, portanto, eles não puderam ser testados à compressão simples.

A Figura 4-78 mostra os resultados do ensaio de compressão simples da amostra de areia de quartzo biotratada com *S. pasteurii* (*Sp-Q*).

A amostra no início do ensaio tinha uma altura de 10,1 cm, peso específico de 14,1 kN/m³ e atingiu uma porosidade final de 48% (Figura 4-78 A). A resistência à compressão simples (σ_{usc}) da amostra de areia de quartzo foi de 553 kPa e apresentou um comportamento na falha de areia fofa (Terzagui e Peck, 1980), como é observado na curva tensão-deformação (Figura 4-78 C).

A falha da amostra foi na base, como uma desagregação das partículas (Figura 4-78 B), que pode ser por uma cimentação heterogênea da amostra, com uma fraca cimentação na base, ou também, esse tipo de falha é um indicador de falta de paralelismo entre as faces extremas, o que faz com que as tensões não sejam distribuídas adequadamente no corpo da amostra, e são concentradas nas bordas da base, onde a amostra falha. A resistência real da amostra poderia ser muito maior.

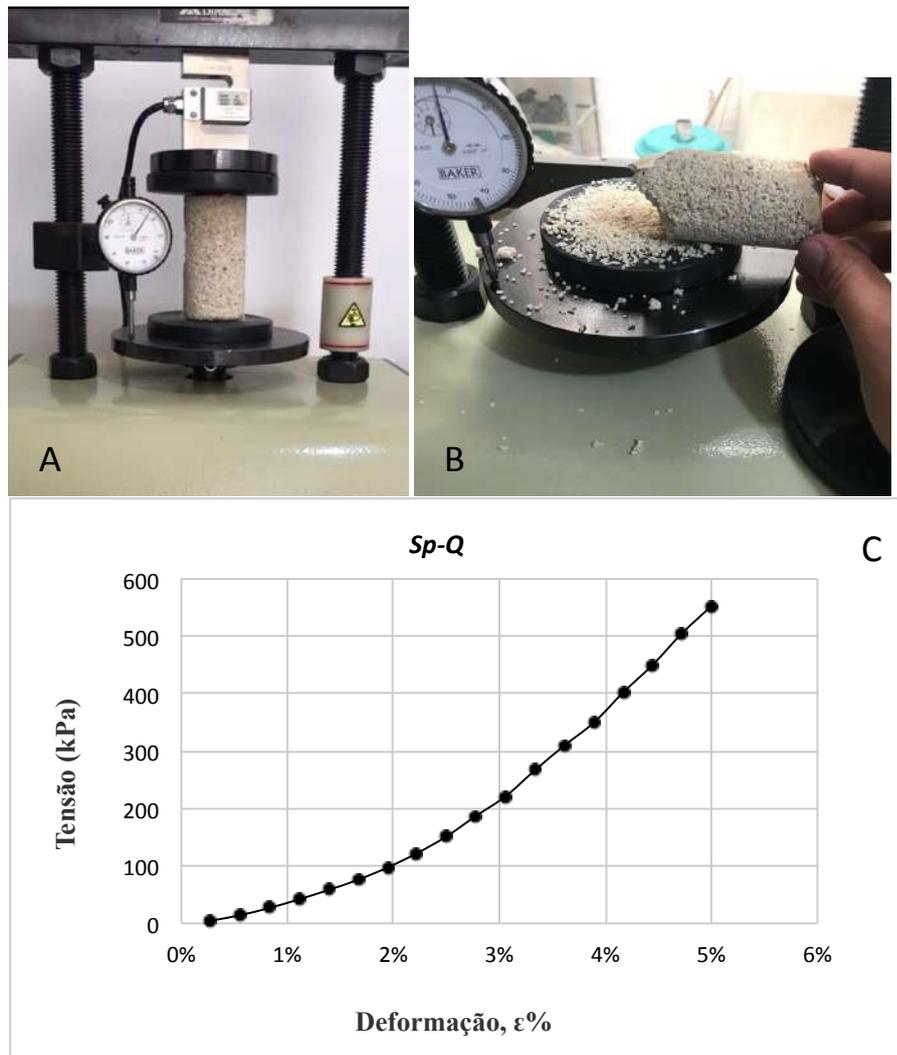


Figura 4-78. Ensaio de resistência à compressão simples, amostra *Sp-Q*. A) amostra antes do ensaio. B) amostra depois do ensaio, modo de falha. C) Curva tensão – deformação.

Como a amostra não se desintegrou totalmente, foi possível moldar novamente e horizontalizar a base da amostra, para determinar sua resistência mediante um segundo ensaio.

O corpo de prova foi deixado com uma altura de 8,2 cm e a resistência à compressão simples (σ_{usc}) foi 934 kPa e apresentou um comportamento na falha característico de uma areia cimentada (Juárez e Rico, 1965; Mitchell, 1993; DeJong *et al.*, 2006). Os resultados deste segundo ensaio da amostra *Sp-Q*, são mostrados na Figura 4-79.

É provável que a resistência dos solos biotratados, fosse devida principalmente à coesão verdadeira (Mitchell, 1993), devida à ligação química entre as partículas desenvolvidas como resultado da cimentação por o carbonato de cálcio precipitado pelo tratamento

microbiológico e por outro lado, possivelmente um aporte na resistência seja devida à sucção dos solos.

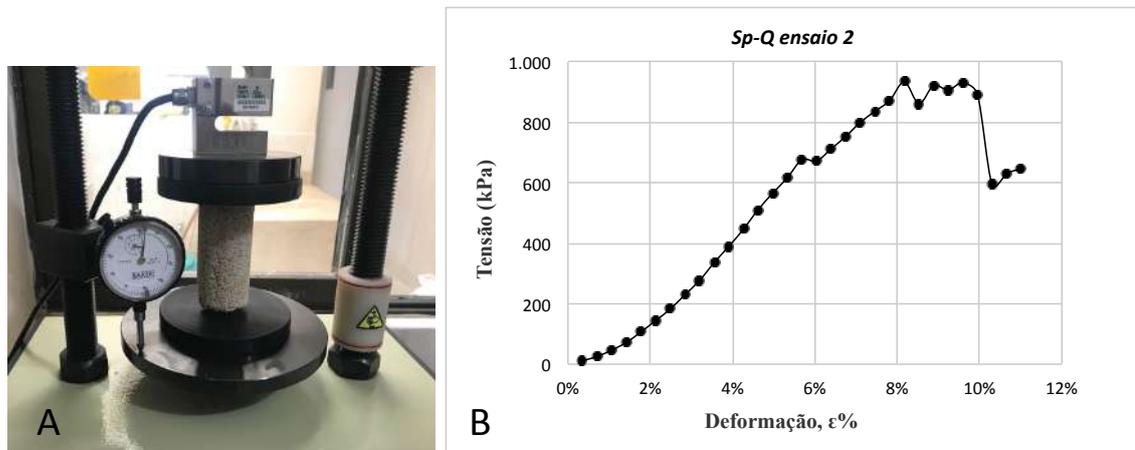


Figura 4-79. Ensaio de resistência à compressão simples, amostra *Sp-Q* (ensaio 2). A) amostra durante o ensaio. B) Curva tensão – deformação.

Segundo as relações encontradas por alguns autores, entre a resistência à compressão simples e o conteúdo de carbonato de cálcio, estes valores de σ_c (500-900 kPa) são associados ao conteúdo de carbonato de cálcio entre 2% e 4% (Mitchell, 1993), ou entre 8% e 9% (Cheng *et al.*, 2013).

Nas amostras biocimentadas por MICCP nesta pesquisa, foi precipitado em cada tratamento 7% de carbonato de cálcio e se a soma dos quatro tratamentos for válida, o total precipitado foi em torno de 30%, porém, uma parte do carbonato foi precipitado no topo da amostra e não dentro da massa do solo, sem contribuir para a resistência.

Por outro lado, a quantidade de carbonato de cálcio por tratamento corresponde a aproximadamente 25 kg de CC/m^3 de solo, e no total, depois dos 4 tratamentos, em teoria a quantidade de carbonato de cálcio total é de aproximadamente 90 kg de CC/m^3 . Este valor é maior que os 60 kg de CC/m^3 de solo, que, segundo Whiffin (2004), é necessário para obter uma melhora significativa na resistência do solo.

A Figura 4-80 apresenta os resultados do ensaio de resistência à compressão simples do corpo de prova da amostra correspondente à mistura Q-C10% biotratada com *S.pasteurii*.

A amostra no início tinha uma altura de 9,6 cm e peso específico de 14,9 kN/m³ e ao final do tratamento atingiu uma porosidade de 44% e sua resistência à compressão simples (σ_{usc}) foi apenas de 96 kPa.

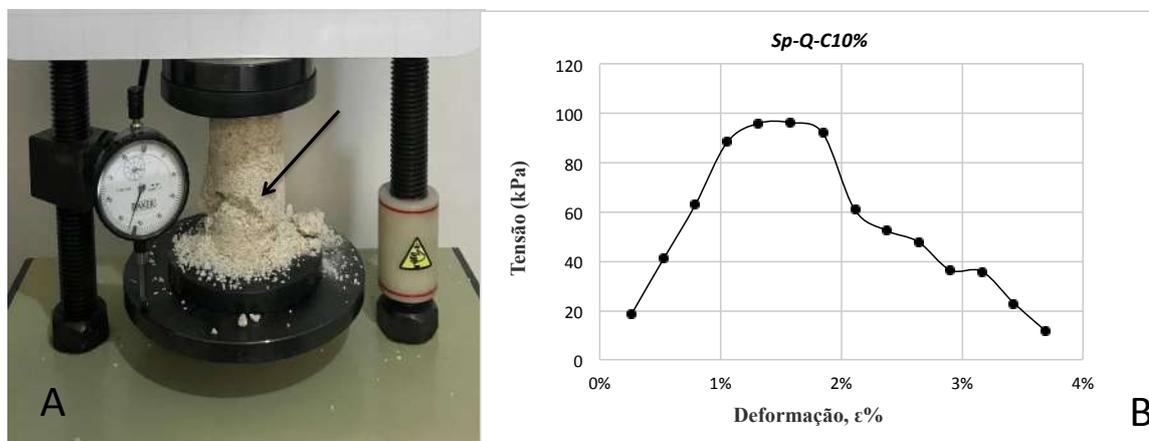


Figura 4-80. Ensaio de resistência à compressão simples, amostra *Sp-Q-C10%*. A) Modo de falha. B) Curva tensão- deformação,

O comportamento tensão –deformação dos solos biotratados com MICCP é o comportamento característico de um solo de grão grosso, cimentado, com falha frágil e repentina (Juárez e Rico, 1965; Mitchell, 1993, Dejong *et al.*, 2006).

Em todas as amostras foi calculado o Módulo secante a 50% da tensão máxima na falha (E_{50}), seus valores são apresentados na Tabela 4-9. Os valores da resistência à compressão simples da areia de quartzo (Q), foram semelhantes aos obtidos para areias sílicas (d_{50} de 0,2 mm) biotratadas com MICCP (com *S. pasteurii*), σ_{usc} máximo de 500 kPa (Rowshanbakht *et al.*, 2016). A Tabela 4-9 mostra alguns parâmetros físicos e mecânicos das amostras de Q e Q-C10%, ao final do tratamento com *S. pasteurii*. e que foram a ensaios de resistência à compressão simples.

Tabela 4-9. Parâmetros físicos e mecânicos das amostras biocimentadas.

Amostra	γ (kN/m ³)	n%	σ_{usc} (kPa)	E_{50} (MPa)	CaCO ₃ precipitado (kg/m ³)
<i>Sp-Q</i> (falha #1)	14,0	48	553	8,1	93
<i>Sp-Q</i> (falha #2)	14,0	48	934	11,1	93
<i>Sp-Q-C 10%</i>	14,9	44	96	5,8	94

Os resultados apresentados na Tabela 4-9 mostram que a amostra *Sp-Q-C10%* atingiu maior peso específico e menor porosidade, associado a uma maior precipitação de

carbonato de cálcio, preenchendo os espaços vazios.

Nas análises da precipitação de cálcio e carbonato de cálcio, indicaram sempre uma maior precipitação na amostra de Q-C10%. Porém, a maior resistência à compressão simples foi atingida na amostra de areia de quartzo (Q) (934 kPa).

Novamente, estes resultados sugerem a importância da distribuição dos cristais de carbonato precipitados na matriz de solo, a fim de obter uma biocimentação eficaz. Isso poderia significar que a resposta mecânica do solo tratado com MICCP pode variar significativamente dependendo do mecanismo de precipitação do CaCO_3 (Mujah *et al.*, 2017), mecanismo que pode estar associado à propriedades eletroquímicas dos solos como CTC, ASE e PCZ.

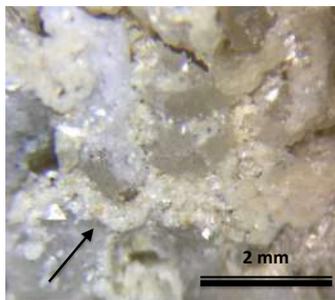
Alguns torrões de amostras biocimentadas, foram observados no estereoscópio a 30 aumentos (Figura 4-81), onde pode ser observado o carbonato de cálcio precipitado, cimentando os grãos de areia.



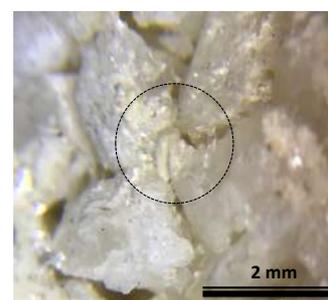
a) Imagem no estereoscópio, 3X. Amostra de areia de quartzo. Grãos de quartzo ($\approx 1,5$ mm) sem tratamento.



b) Imagem no estereoscópio, 3X. Amostra de areia de quartzo biocimentada com *S. pasteurii*. Grãos de quartzo cimentados com minúsculos cristais de carbonato ligados e formando uma camada fina.



c) Imagem no estereoscópio, 3X. Amostra Q-C10% biocimentada com *S. pasteurii*. Grãos de quartzo ($\approx 1,5$ mm) cimentados com carbonato de cálcio de tamanho minúsculo.



d) Imagem no estereoscópio, 3X. Amostra Q-C10% biocimentada com *S. pasteurii*. Grãos de quartzo cimentados com carbonato de cálcio nos pontos de contato.

Figura 4-81. Imagens no estereoscópio, em 3 aumentos. a) amostra de areia de quartzo sem tratamento. b) amostra de areia de quartzo biocimentada com *S. pasteurii*. c-d) amostra da mistura Q-C10% biocimentada com *S. pasteurii*.

✓ *Susceptibilidade a erosão:*

A fim de ter um indicativo da susceptibilidade a erosão dos solos biocimentados, foi executado o ensaio de *Crumb* nos corpos de prova indeformados de aproximadamente 20 mm de comprimento, das amostras *Sp-Q* e *Sp-Q-C10%*.

Depois de 6 horas de permanecer submersas em 200 ml de água destilada, com pH de 6,6 e temperatura de 26°C, as amostras não apresentaram susceptibilidade a erosão e o grau de dispersividade foi grau 1: não dispersivo. O mesmo resultado foi obtido, depois de repetir o teste, com as amostras submersas durante 48 h, em água ligeiramente ácida, com pH de 4,5.

A Figura 4-82 mostra imagens das amostras de Q (imagem A) e Q-C10% (imagem B) biocimentadas com *S. pasteurii*, que foram usadas no ensaio de *Crumb*, assim como a sequencia do ensaio desde o tempo $t=0$ h até o tempo $t=6$ h em água com pH de 6,6 e o tempo $t=48$ h em água ligeiramente ácida. A imagem (C) mostra a referência do Grau 1 de dispersividade do ensaio de *Crumb*, segundo a norma ASTM D6572.

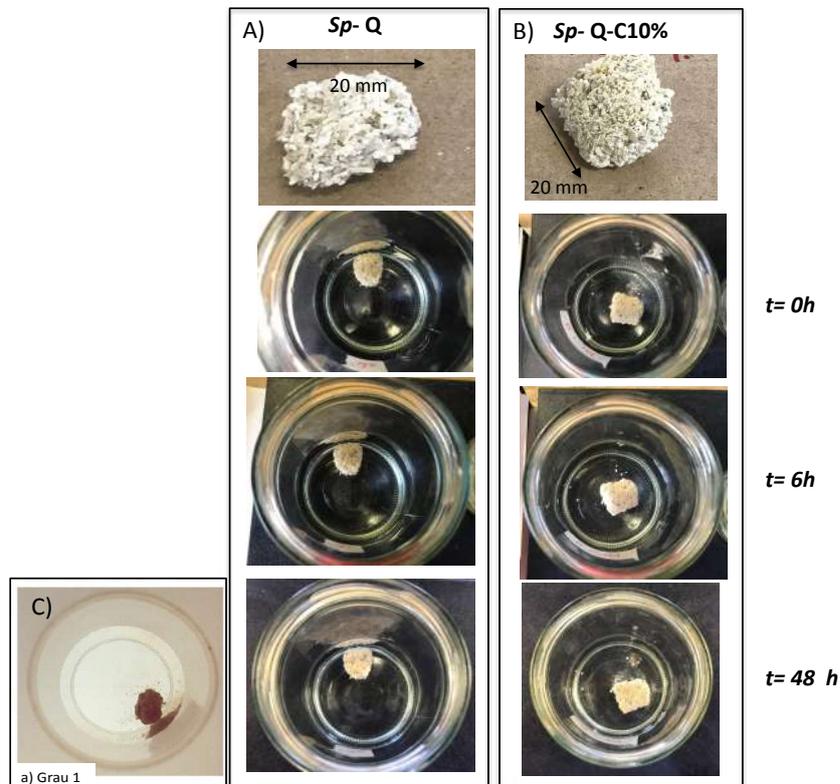


Figura 4-82. Teste de *Crumb* em amostras de solos biocimentadas com MICCP, usando a *S. pasteurii* A) amostra de Q. B) mistura Q-C10%. C) Grau 1 de dispersividade segundo ASTM D6572.

4.4.2 Estágio 2

Os corpos de prova preparados neste estágio foram: mistura quartzo-caulim dosagem 98%-2%, mistura quartzo-bentonita dosagem 98%-2% e areia de quartzo de grão fino (Q_{fino}). A areia de grão fino foi obtida da areia de Yarumal de grão médio, moída mecanicamente.

Todos os ensaios de biocimentação neste estágio foram feitos utilizando a *S. pasteurii* como microrganismo. A *S. pasteurii* foi selecionada, porque apresentou a maior atividade uréase e os melhores resultados na MICCP, evidenciados pela biocimentação dos corpos de prova e melhora na resistência à compressão simples. O resumo das amostras utilizadas no estágio 2 é mostrado na Tabela 4-10.

Tabela 4-10. Solos e microrganismos no segundo estágio dos ensaios de biocimentação em colunas

Nomenclatura	Solos	Microrganismo
<i>S.p-Q-C</i> 2%	Dosagem 98% areia- 2% caulim	<i>S. pasteurii</i>
<i>S.p-Q-B</i> 2%	Dosagem 98% areia- 2% bentonita	<i>S. pasteurii</i>
<i>S.p-Q_{fino}</i>	Areia de quartzo moída, com tamanhos de partículas menores que 0,425 mm (peneira # 40), $d_{60}= 0,25$ mm.	<i>S. pasteurii</i>

A Figura 4-83 mostra a análise granulométrica da areia fina (Q_{fino}), que como resultado da fratura mecânica, tem 81% de areia e 19% de partículas tamanho silte ou argila, classificando como SM no SUCS e tem $d_{60}= 0,25$ mm, em comparação com a areia de grão médio (Q), que só tem 0,1% de partículas finas, classifica como SP e tem $d_{60}= 1,4$ mm.

A Figura 4-84 apresenta o espectro FTIR da areia moída de grão fino (Q_{fino}), com as mesmas bandas de quartzo do espectro da areia de grão médio (Q), evidenciando que durante o processo de fratura mecânica, não houve mudanças na mineralogia da areia de Yarumal e ambas amostras, Q e Q_{fino} , tem a mesma mineralogia.

A preparação dos corpos de prova nos moldes cilíndricos das amostras com as misturas Q-C 2% e Q-B 2%, e o tratamento microbiológico fornecido a estas amostras, foi o mesmo utilizado no estágio 1.

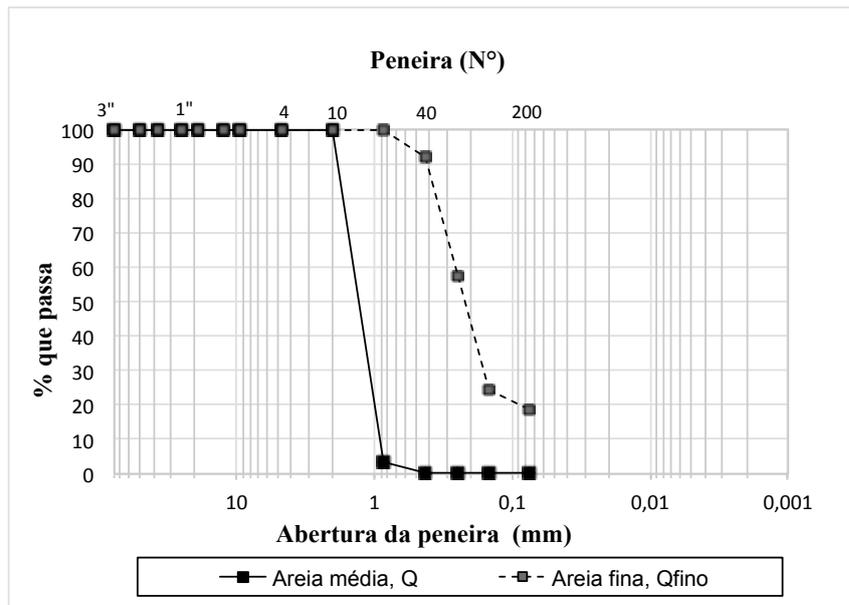


Figura 4-83. Curva granulométrica da areia de grão médio (Q) e da areia de grão fino (Q_{fino}).

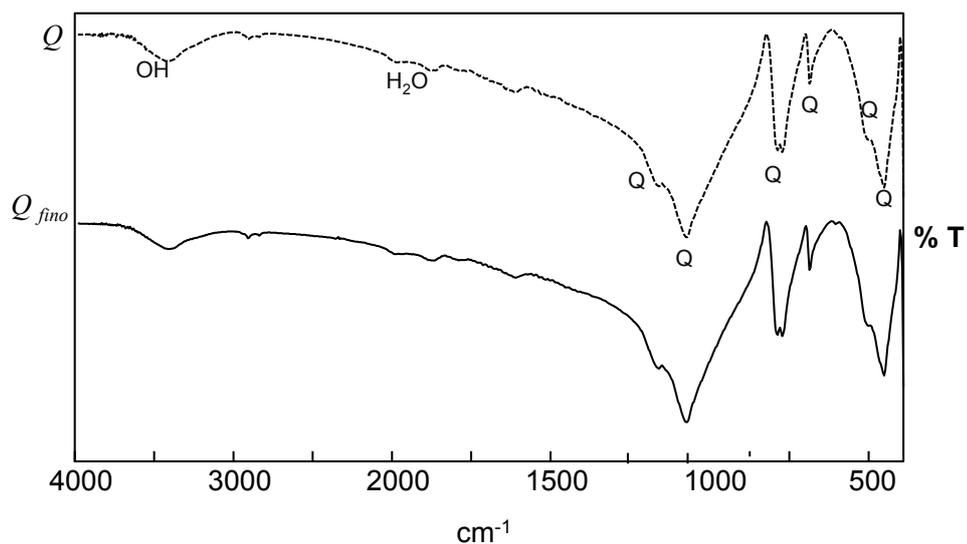


Figura 4-84. Análises FTIR da areia de Yarumal de grão médio (Q) e da mesma areia depois do processo de fratura mecânica (Q_{fino}).

A amostra de areia fina de quartzo (Q_{fino}) foi colocada dentro do molde em acrílico por gravidade, porém, devido ao tamanho das partículas de areia, mais pequenas que na amostra de areia sem peneirar, foi necessário utilizar maior massa de solo para obter o corpo de prova de 50 mm de diâmetro e 120 mm de comprimento. O peso específico seco (γ_d) da areia fina de quartzo (Q_{fino}) foi de aproximadamente $15,0 \text{ kN/m}^3$, maior do que o peso específico das outras duas amostras preparadas com γ_d de aproximadamente $12,0 \text{ kN/m}^3$.

4.4.2.1 Estágio 2: caracterização do meio líquido drenado ao final de cada tratamento

✓ *Comportamento do pH:*

A Figura 4-85 mostra os valores do pH depois de cada tratamento nas amostras do estágio 2 (misturas com dosagem 98%-2% e areia fina de quartzo), e também são apresentados os resultados obtidos nas amostras do estágio 1 (misturas com dosagem 90%-10% e areia de quartzo), para comparar mudanças devidas ao conteúdo de finos (no caso das misturas Q-C e Q-B) e devidas ao tamanho da partícula (no caso da areia de quartzo sem finos).

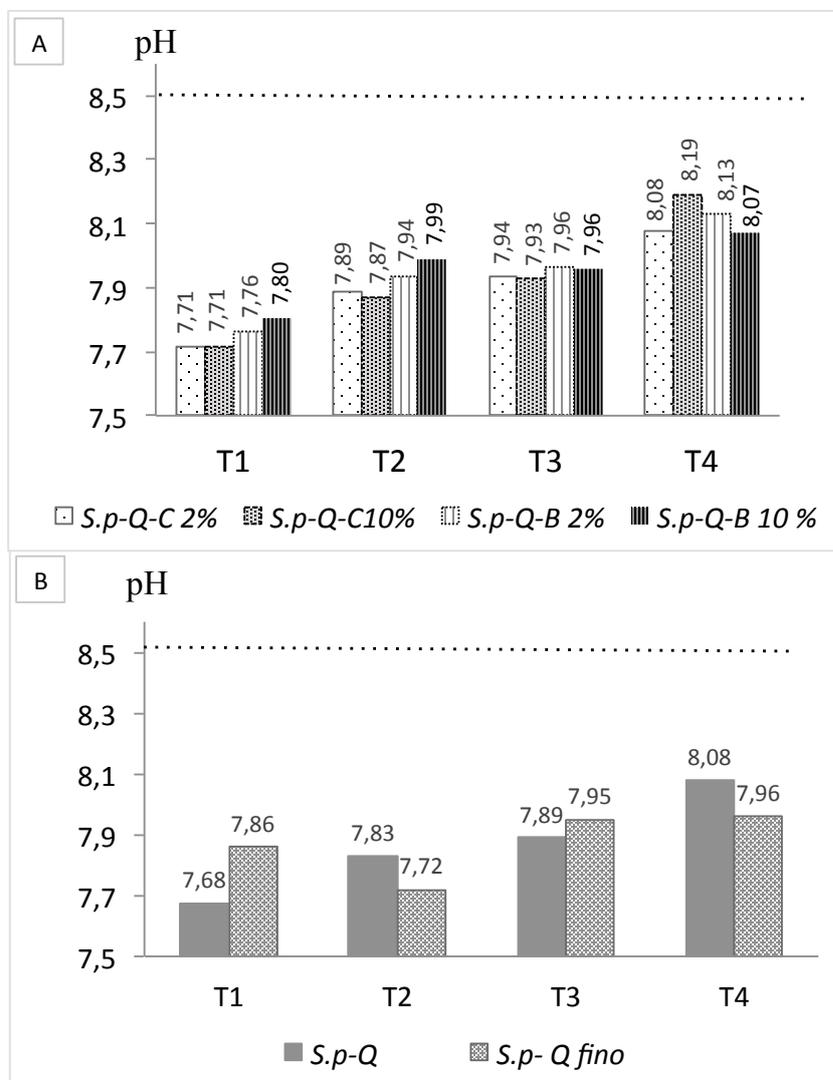


Figura 4-85. Comportamento do pH no efluente. Amostras biotratadas com *S. pasteurii*, comparação estágios 1 e 2. A) diferentes dosagens Q-C e Q-B. B) diferentes tamanhos da areia de quartzo.

O pH inicial do meio líquido nos experimentos do estágio 2 foi elevado em torno de 8,5 e, de forma geral, pode-se descrever que o comportamento do pH do efluente depois de 48 h, nas diferentes amostras, foi semelhante àquele do estágio 1. O pH apresenta uma diminuição em comparação com o pH do início, mas, à medida que um novo tratamento foi aplicado, o pH do efluente ficou mais perto do pH inicial (Figura 4-85). O apresentado poderia sugerir que a cada tratamento as reações da MICCP são mais rápidas e eficientes e o pH sobe mais rápido, nas mesmas 48 h.

Os valores de pH foram diferentes para as misturas de areia-caulinita e areia-bentonita (Figura 4-85 A), sugerindo a influência da mineralogia no comportamento. A mistura Q-B2% teve o maior valor de pH nos tratamentos T1 e T2; no T3 o valor de pH foi semelhante em Q-C2% e Q-B2%, e já no tratamento T4, foi maior o pH na mistura Q-C2%. Com relação ao comportamento do pH segundo o conteúdo de finos ou diferentes dosagem de finos, os valores foram semelhantes nas misturas com 2% e 10% de finos, sendo que apenas foram observadas ligeiras diferenças no tratamento T4, apresentando um maior valor de pH na amostra com 10% de finos na mistura Q-C e com 2% de finos na mistura Q-B.

Já nas amostras de areia de quartzo fino (Figura 4-85 B) foram observadas diferenças no comportamento e nos valores do pH, apesar de ter a mesma mineralogia, sugerindo a influência de outros parâmetros, como o tamanho de partícula e os vazios na matriz do solo.

✓ *Comportamento do oxigênio dissolvido (OD):*

O comportamento do oxigênio dissolvido nas misturas Q-C2% e Q-B2% são apresentadas na Figura 4-86 A, e também são apresentados os resultados obtido nas amostras do estágio 1, misturas com dosagem 90%-10%, para comparar mudanças devidas ao conteúdo de finos.

Nestas figuras são observadas diferenças principalmente entre os conteúdos de finos, por exemplo, no tratamento T1, sendo que as amostras com maior conteúdo de finos, nas dosagens Q-C10% e Q-B10%, tiveram os maiores valores de OD (1,7-1,8 mg/l), em comparação com as amostras com dosagem de 2% de finos (OD: 0,45-0,6 mg/l). Este comportamento pode ser explicado como devido possivelmente à menor disponibilidade de espaço na matriz de solo e menor disponibilidade de oxigênio, quando há maior

quantidade de partículas finas. A partir do segundo tratamento, são observadas diferenças entre as misturas quartzo-caulim e quartzo-bentonita e entre as diferentes dosagens (Q-C2% e Q-C10%, Q-B2% e Q-B10%). No geral, os maiores valores de OD foram observados na mistura quartzo-caulim, com dosagem 90%-10% (Q-C10%), sendo que os menores valores de OD se apresentaram na mistura quartzo-bentonita, com a dosagem 90%-10% (Q-B10%).

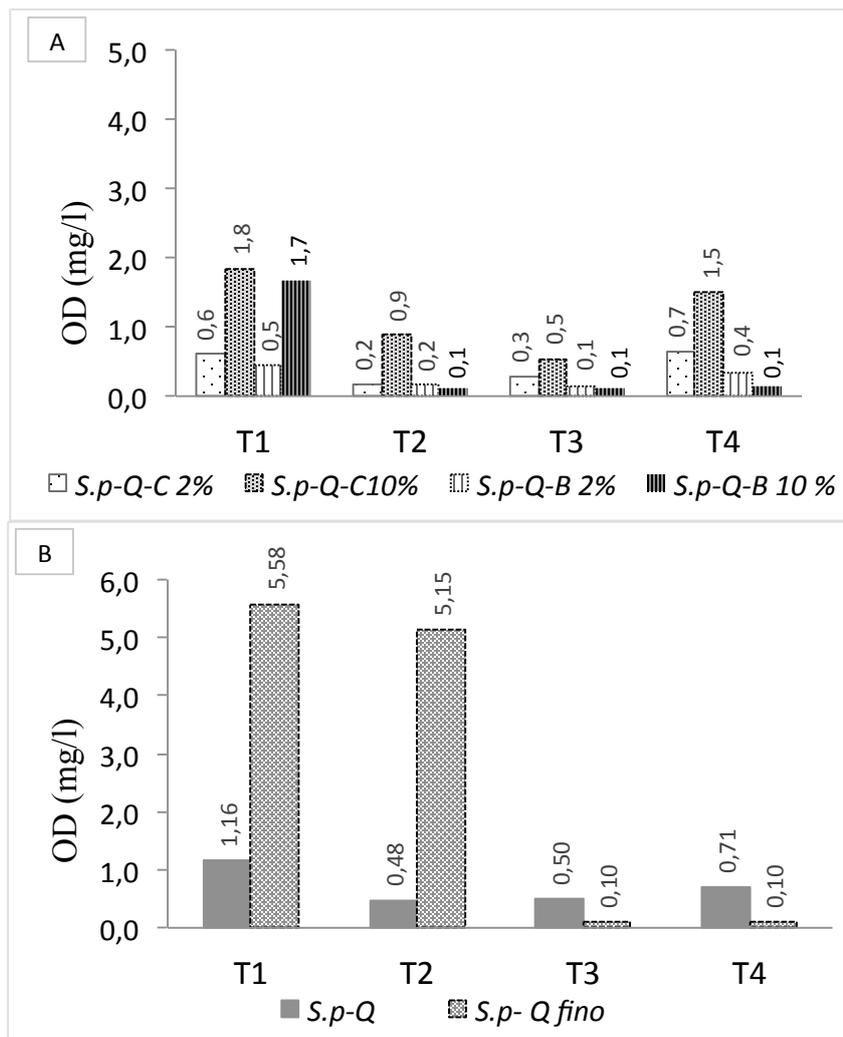


Figura 4-86. Comportamento do OD no efluente. Amostras biotratadas com *S. pasteurii*, comparação estágios 1 e 2. A) diferentes dosagens Q-C e Q-B. B) diferentes tamanhos da areia de quartzo.

Na Figura 4-86 B, foram observadas diferenças significativas entre os valores de OD da areia média (Q) e da areia fina de quartzo (Q_{fino}), mesmo elas tendo a mesma mineralogia. As diferenças foram evidentes principalmente nos tratamentos T1 e T2, com valores de OD na amostra de areia de grão fino (Q_{fino}) muito perto do valor inicial (OD acima de 5mg/l), sugerindo que nestas amostras depois de 48 h, as reações de

hidrólise da ureia e de precipitação de carbonatos, são lentas e ainda não começaram. Novamente este comportamento, confirma a influência do tamanho de partícula na MICCP. A partir do T3, as diferenças são menores entre as amostras de areia. Este comportamento no tratamento T1 e T2, foi observado durante a drenagem das amostras, sendo que na amostra de areia de grão fino foi mais lento e mais difícil drenar o meio líquido.

✓ *Comportamento da concentração de cálcio:*

A Figura 4-87 apresenta os resultados da variação do cálcio em solução, ao final de cada tratamento e a comparação com os resultados das amostras do estágio 1.

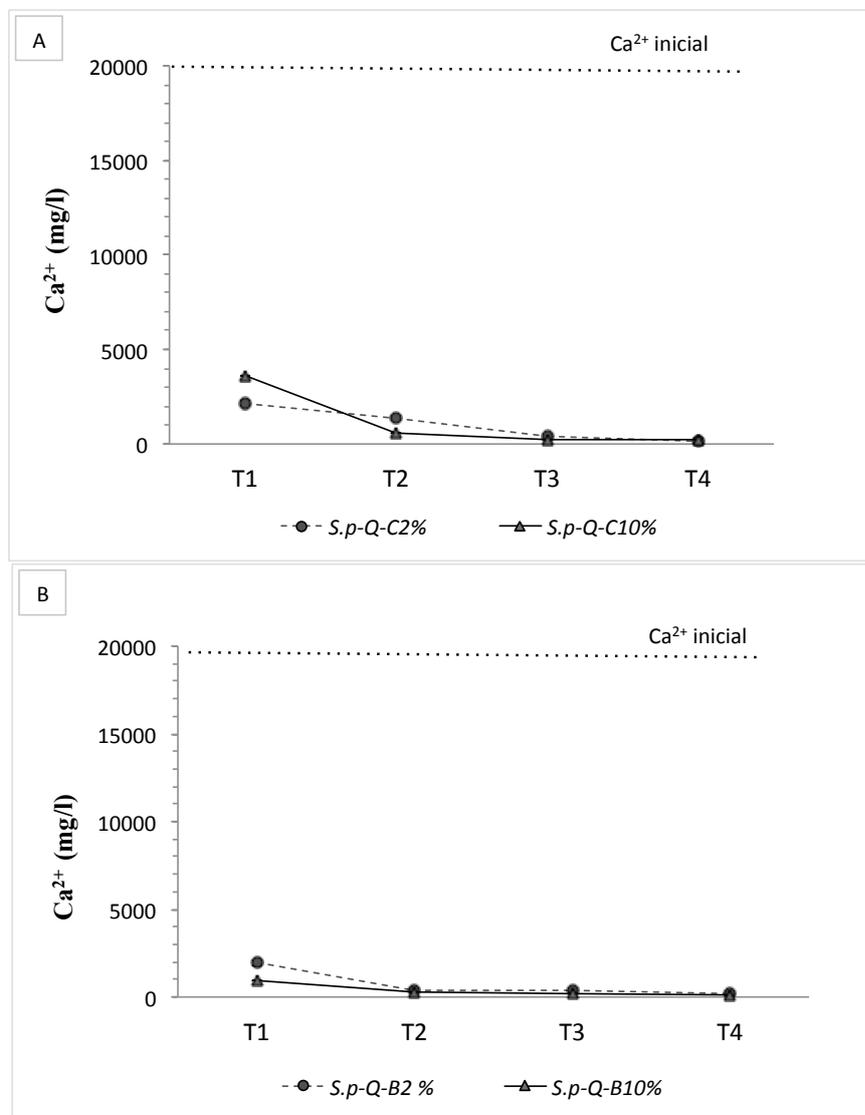


Figura 4-87. Cálcio em solução das amostras biotratadas com *S. pasteurii*, comparação estágios 1 e 2. A) misturas Q-C dosagem 98%-2% e 90%-10%. B) misturas Q-B dosagem 98%-2% e 90%-10%.

Na figura (A), são comparados os resultados das misturas quartzo-caulim com as diferentes dosagens: Q-C2% e Q-C10%, onde foram observadas diferenças no Ca^{2+} em solução nos tratamentos T1 e T2. O cálcio em solução foi de 2000 mg/l (Q-C2%) e 4000 mg/l (Q-C10%) no T1 sendo que foi diminuindo com cada novo tratamento. As misturas Q-B2% e Q-B10% também apresentaram diferenças significativas nos tratamentos T1 e T2 (Figura 4-87 B), com 1000 mg/l (Q-B10%) e 2000 mg/l (Q-B2%), de cálcio disponível no T1. No tratamento T4, não foram observadas diferenças entre as amostras com 2% e 10% de bentonita.

A partir do cálcio em solução foi calculado o carbonato de cálcio precipitado (g) devido a cada tratamento com ureia e cloreto de cálcio nas diferentes amostras (Figura 4-88).

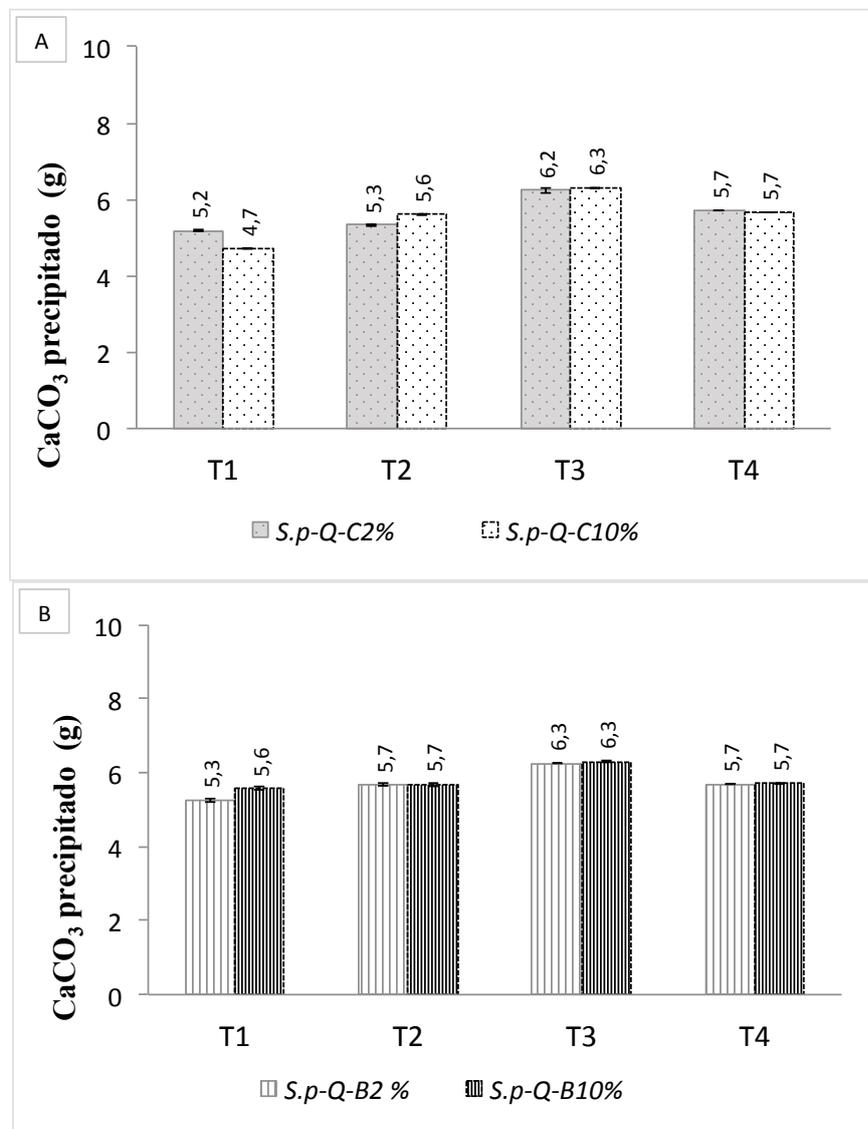


Figura 4-88. Cálcio precipitado (g) no processo de MICCP, nas amostras biotratadas com *S. pasteurii*, comparação estágios 1 e 2. A-) misturas Q-C2% e QC10%. B) misturas Q-B2% e Q-B10%.

Da figura A, foram observadas diferenças significativas na precipitação de carbonato de cálcio nas misturas quartzo-caulim com diferentes dosagens do caulim, Q-C2% e Q-C10%, no tratamento T1, com uma precipitação de 5,2 g e 4,7 g de CaCO_3 , respectivamente. No tratamento T2 também foram observadas diferenças entre as dosagens, porém, menores que no tratamento T1. E nos tratamentos T3 e T4, as diferenças não são mais significativas. Na figura B, foram observadas diferenças significativas para as misturas quartzo-bentonita com diferentes dosagens de bentonita (Q-B2% e Q-B10%), unicamente no T1, com uma precipitação de 5,3 g e 5,6 g de CaCO_3 , respectivamente.

A Figura 4-89 mostra os resultados em termos da eficiência do processo de precipitação.

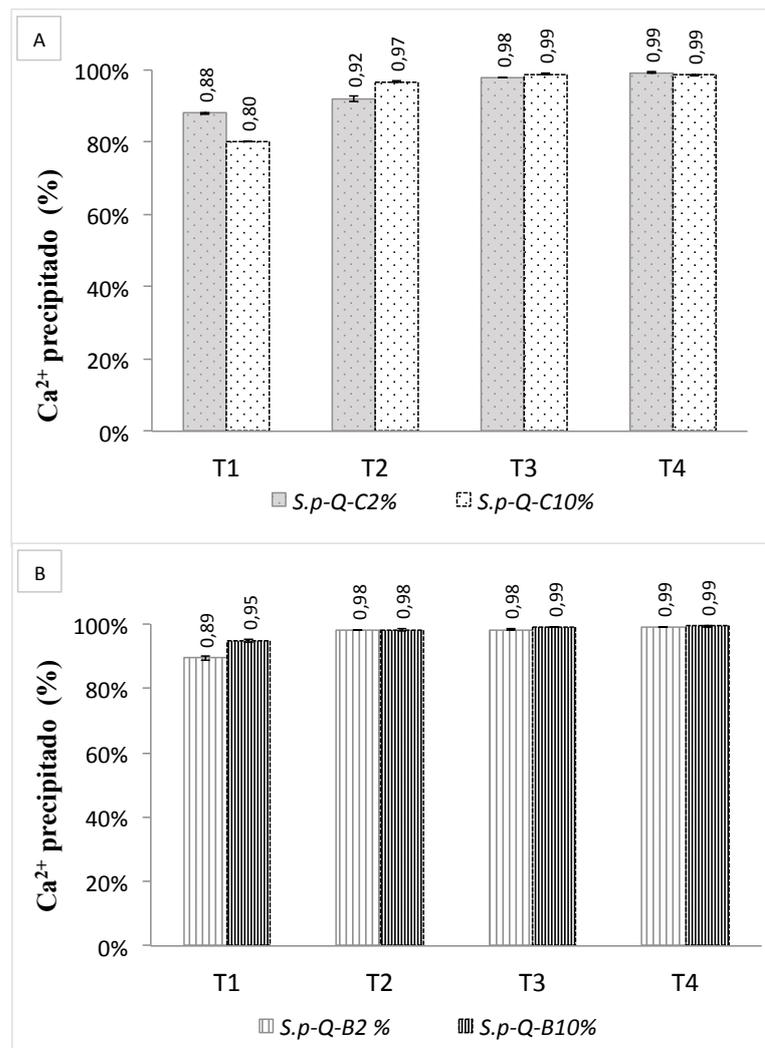


Figura 4-89. Eficiência do processo da MICCP, nas amostras biotratadas com *S. pasteurii*, comparação estágios 1 e 2. A) misturas Q-C2% e Q-C10%. B) misturas Q-B2% e Q-B10%.

Analisando os dados de precipitação de carbonato de cálcio, em termos de eficiência, na Figura 4-89 A, foram observadas diferenças significativas entre o 2% de caulim e o 10% de caulim, no tratamento T1, com eficiências de 88% e 80%, respectivamente. No tratamento T2 também foram observadas diferenças entre as dosagens, com uma eficiência de 92% (Q-C2%) e 97% (Q-C10%). Finalmente, no tratamento T3 foi atingida a máxima eficiência no processo, ~99% em ambas amostras.

Na Figura 4-89B, foram observadas diferenças significativas para as misturas quartzo-bentonita unicamente no tratamento T1, com uma eficiência de 89% para um conteúdo de finos de 2% e uma eficiência de 95%, para um conteúdo de finos de 10%. A partir do T2, foram atingidas altas eficiências em ambas misturas (98%).

No resumo, estes resultados do pH, OD e cálcio em solução do estágio 2 mostram, que nas misturas areia-caulim, a precipitação de carbonato de cálcio é favorecida por uma menor quantidade de caulim nas misturas (Q-C2%). Do lado contrário, nas misturas areia-bentonita, a precipitação de carbonato é favorecida por uma maior quantidade de bentonita nas misturas (Q-B10%), provavelmente relacionado com a maior possibilidade de atração do cálcio e de sites de nucleação na bentonita (Kralj e Vdovic, 2000). Uma hipótese a considerar é a influência do potencial Z e PCZ, que no caso das misturas Q-C 2% e Q-B 10%, têm PCZ de 7 e 7,8 respectivamente, valores menores que o pH do meio líquido que atingiu um pH máximo de 8, enquanto que as misturas Q-C 10% e Q-B 2%, têm PCZ de 9,7 e 8,7 respectivamente, valores maiores que o pH do meio líquido circundante. Neste caso, as partículas das amostras Q-C 10% e Q-B 2% tendem a se flocular e as partículas das amostras Q-C 2% e Q-B 10%, tendem a se dispersar. Isto poderia explicar o comportamento das amostras com diferente conteúdo de finos e a maior precipitação de carbonato de cálcio nas amostras de solo com tendência a se dispersar.

A Figura 4-90 apresenta os resultados da amostra de areia de quartzo de grão fino (Q_{fino}) e sua comparação com a areia de quartzo de grão médio (Q).

Na Figura 4-90, foram observadas diferenças significativas na concentração do cálcio em solução (A), na precipitação do carbonato de cálcio (B), e a eficiência da MICCP (C), entre as amostras de areia de grão médio (Q) e a areia de grão fino (Q_{fino}), principalmente nos tratamentos T1 e T2.

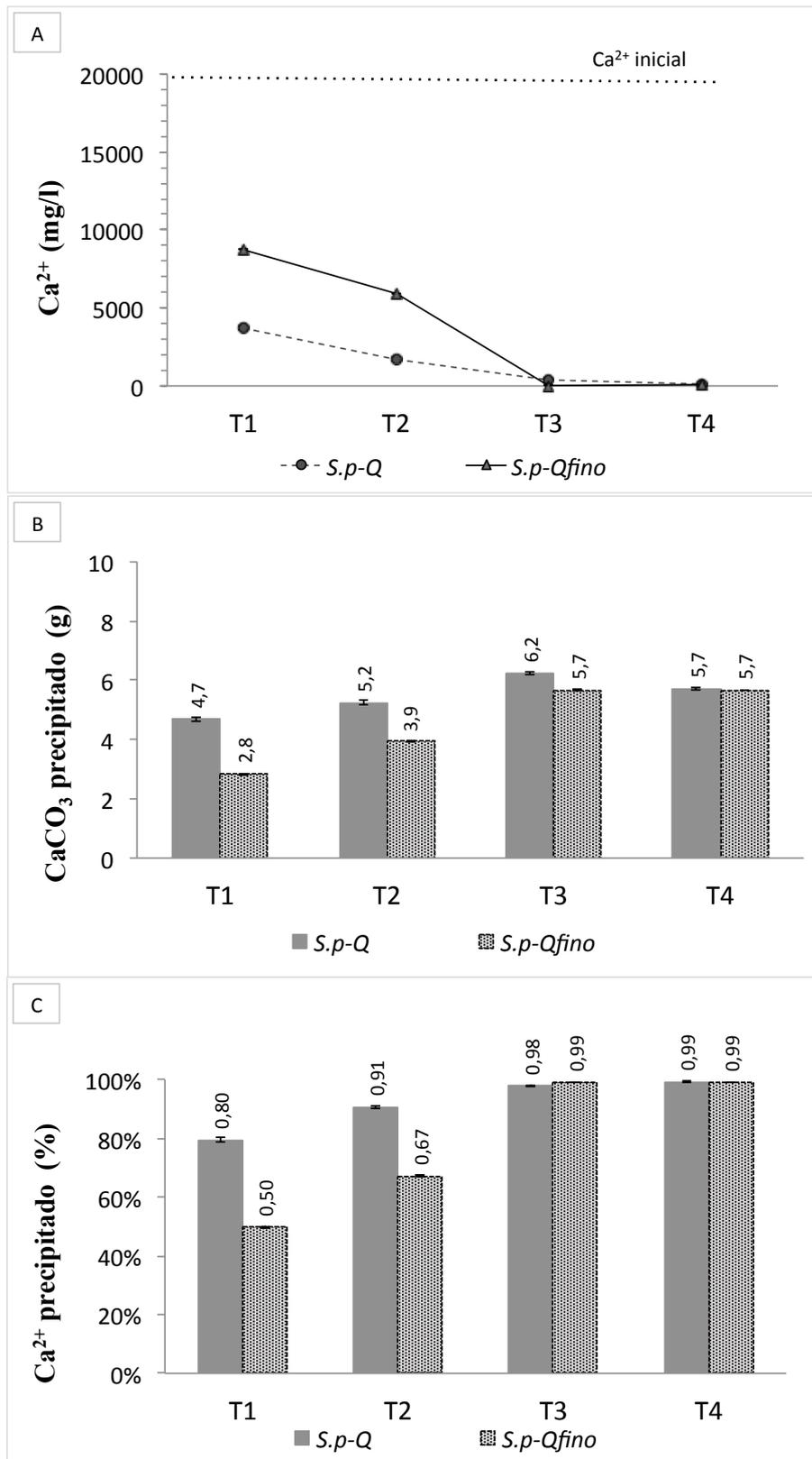


Figura 4-90. Eficiência do processo de MICCP nas amostras de areias de grão médio (Q) e grão fino, (Q_{fino}), biotratadas com *S. pasteurii*. A) cálcio disponível em solução. B) carbonato de cálcio precipitado (g). C) carbonato de cálcio precipitado (%).

Na amostra de areia fina (Q_{fino}), apenas foi precipitado 50% do carbonato de cálcio no tratamento T1, em comparação com a areia mais grossa (Q), que precipitou 80%. Depois, no tratamento T2, a areia de grão médio atingiu 91% de eficiência, enquanto que na areia de grão fino, apenas precipitou 67% do carbonato de cálcio. Esses comportamentos eram esperados, dado o comportamento e valores do oxigênio dissolvido (OD), apresentados na Figura 4-86. Do mesmo jeito que nas misturas Q-C e Q-B, a partir do tratamento T3 em ambas amostras de areia foi precipitado quase 100% do cálcio fornecido, nas 48 h.

No processo com as duas areias de diferentes tamanhos de partículas, houve maior eficiência com a areia de grão médio com relação à areia fina. Neste caso, duas variáveis são conjugadas, mas cada uma delas com o efeito oposto: a presença de partículas com grãos menores e maior área superficial (Q_{fino}), oferecem maior quantidade de pontos de contato entre as partículas e, portanto, como resultado uma maior cimentação (Ismail *et al.*, 2002), por outro lado, a limitação do espaço devida ao menor tamanho das partículas da areia fina (Q_{fino}), pode limitar a atividade bacteriana e a precipitação de carbonato de cálcio (Rebata-Landa, 2007) na matriz de solo.

Neste bioensaio, parece ter sido a limitação do espaço, o fator determinante para a baixa eficiência da MICCP na areia de grão fino (Q_{fino}), com relação à areia de grão médio (Q). Isto foi observado durante o teste, devido à dificuldade de drenar a solução de cimentação (ureia e cálcio), devido à baixa permeabilidade da amostra.

4.4.2.2 Estágio 2: verificação da cimentação dos corpos de prova

Ao final do tratamento, as amostras foram secas ao ar por 10 dias e obtidos os corpos de prova biocimentados por MICCP das amostras Q-C2% e Q-B2% biotratadas com *S. pasteurii*, no estágio 2 (Figura 4-91).

A Figura 4-91 mostra imagens dos corpos de prova das misturas com 2% de finos Q-C2% (imagem A) e Q-B2% (imagem C) biocimentadas por um tratamento de MICCP com *S. pasteurii*. Também são apresentadas as amostras controles (imagens B e D), sem evidência da precipitação de carbonato de cálcio, mostrando mais uma vez, a mediação dos microrganismos na carbonatogênese.



Figura 4-91. Imagens das amostras ao final do ensaio de biocimentação. (A) amostra *Sp-Q-C2%*. (B) controle Q-C2%. (C) amostra *Sp-Q-B2%*. (D) controle Q-B2%.

As amostras biotratadas foram utilizadas para ensaios de resistência à compressão simples e susceptibilidade à erosão. A partir destes resultados, foi observado que na mistura areia - 2% de bentonita (Q-B 2%), a quantidade de carbonato de cálcio precipitado, foi suficiente para atingir uma cimentação total da amostra, o que não aconteceu com a mistura areia- 10% bentonita (Q-B 10%), onde a cimentação foi fraca e não foi possível fazer o ensaio de resistência, mesmo quando, de acordo com as medições de cálcio em solução, na amostra com dosagem Q-B10%, foi maior a precipitação de carbonato de cálcio. Isto pode estar relacionado à formação de um plano de fraqueza na amostra (Q-B10%), devido à concentração de bentonita na área onde a amostra rompeu durante a manipulação, ao tentar removê-la do molde em acrílico.

A Figura 4-92 mostra o resultado do ensaio de biocimentação na amostra de areia de quartzo de grão fino (Q_{fino}). A amostra de grão fino, Q_{fino} , foi removida do molde em acrílico e formou o corpo de prova (imagem A), mas a biocimentação foi fraca, ou tinha uma coesão aparente devida à umidade que o mantinha íntegro, mas durante a

manipulação, a cimentação foi perdida ou o efeito da sucção/capilaridade não suportou e a amostra desintegrou-se, como é mostrado na imagem (B).

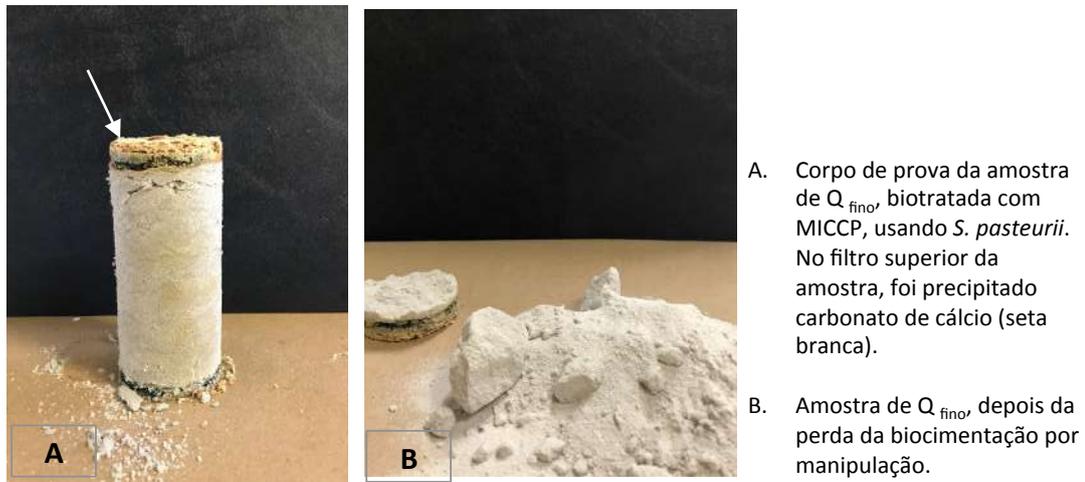


Figura 4-92. Imagens da amostra Q_{fino} ao final do ensaio de biocimentação. (A) corpo de prova Q_{fino} . (B) Amostra biotratada de Q_{fino} , depois de rompida a resistência por manipulação da amostra.

Estes resultados confirmam a influência do tamanho de partícula, da porosidade e da densidade do solo na MICCP.

A Figura 4-93, apresenta imagens das duas amostras de areia de Yarumal, mineralogicamente composta de quartzo, ao final do tratamento microbiológico com *S. pasteurii*. Na imagem (A) o corpo de prova da amostra de areia de grão médio, com $d_{60} = 1400 \mu\text{m}$ e na imagem (B) a amostra de areia de grão fino, com $d_{60} = 250 \mu\text{m}$.

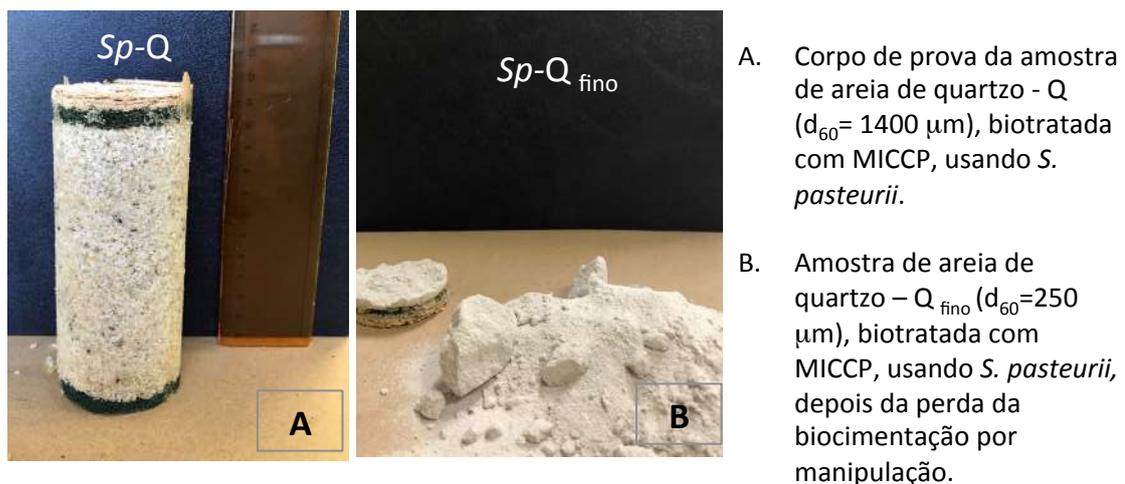


Figura 4-93. Comparação da biocimentação por MICCP em solos de diferente tamanho de partícula e mineralogia semelhante. A) areia grão meio, Q. B) areia grão fino, Q_{fino} .

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Mortensen *et al.* (2011), que avaliaram a influência do tamanho de partícula na MICCP utilizando duas areias de Otawa, mas, com diferente granulometria (areia grossa e areia fina). A maior resistência medida, em termos da velocidade de onda de cisalhamento, foi dada na amostra de areia grossa ($d_{50}=700\ \mu\text{m}$) em relação com a amostra de areia fina ($d_{50}=220\ \mu\text{m}$).

Ao comparar estes resultados com os obtidos por Rebata-Landa (2007), os resultados são contraditórios. Rebata-Landa encontrou em sua pesquisa (utilizando cantos de vidro), uma maior precipitação de carbonato em tamanhos de partículas em torno de $100\ \mu\text{m}$ e, especificamente, foi maior a precipitação de carbonato de cálcio nas partículas finas, com $d_{50}=250\ \mu\text{m}$, o que corresponderia à areia de grão fino (Q_{fino}), que nas partículas grossas, com $d_{50}=1000\ \mu\text{m}$, que corresponderia à areia de grão médio (Q).

No entanto, não só o tamanho da partícula pode ter influência na precipitação de carbonatos, também a distribuição de poros pode ser outro fator relevante, que depende da distribuição granulométrica, e no caso dos experimentos de Rebata-Landa (2007), as amostras são uniformes, com um tamanho único de cantos de vidro, e portanto um tamanho único de poros, enquanto que as amostras de Q e Q_{fino} , apresentam diferentes tamanhos de partículas (Figura 4-83), e portanto diferente distribuição de poros.

Um fator a ser levado em conta nas análises, foi que em todas as amostras biotratadas houve uma grande precipitação de carbonato de cálcio no filtro superior, formando uma camada de até 3-5 mm de espessura. Isso pode significar que, embora quase 100% do cálcio fornecido tenha sido precipitado, obtendo eficiências de 100%, no processo da MICCP uma grande quantidade do carbonato não precipitou entre os grãos de quartzo, sendo que foi utilizado para gerar a mencionada crosta presente no filtro do topo da amostra.

4.4.2.3 Estágio 2: caracterização mineralógica dos solos depois do tratamento microbiológico

A caracterização mineralógica das amostras de Q-C2% e Q-B2%, depois do tratamento microbiológico, foi realizada por FTIR e análises no MEV usando EDX, sob torrões dos solos biocimentados.

✓ Análises por FTIR

A Figura 4-94, mostra os espectros FTIR da amostra de areia de quartzo sem tratamento (Q) e controle (com meio VP-ureia-cloreto de cálcio), em linhas pontilhadas e os espectros das areias biotratadas com *S. pasteurii*, *Sp-Q* e *Sp-Q_{fino}*, em líneas contínuas.

Em todas as amostras foram observadas as bandas de absorção do quartzo (Q) em 460 cm^{-1} , 511 cm^{-1} , 693 cm^{-1} , a banda dupla em $779\text{ e }797\text{ cm}^{-1}$, 1082 cm^{-1} e 1167 cm^{-1} , mas, unicamente nas amostras biotratadas *Sp-Q* e *Sp-Q_{fino}*, foi observada a banda de absorção correspondente a carbonato de cálcio em CCv_3 , 1420 cm^{-1} , com um sinal de baixa intensidade nas duas amostras. A banda de absorção correspondente a carbonato de cálcio em CCv_2 em 879 cm^{-1} não foi identificada nos espectros das areias biotratadas, sendo que apenas um leve indício do sinal foi observado, mas não a banda de absorção.

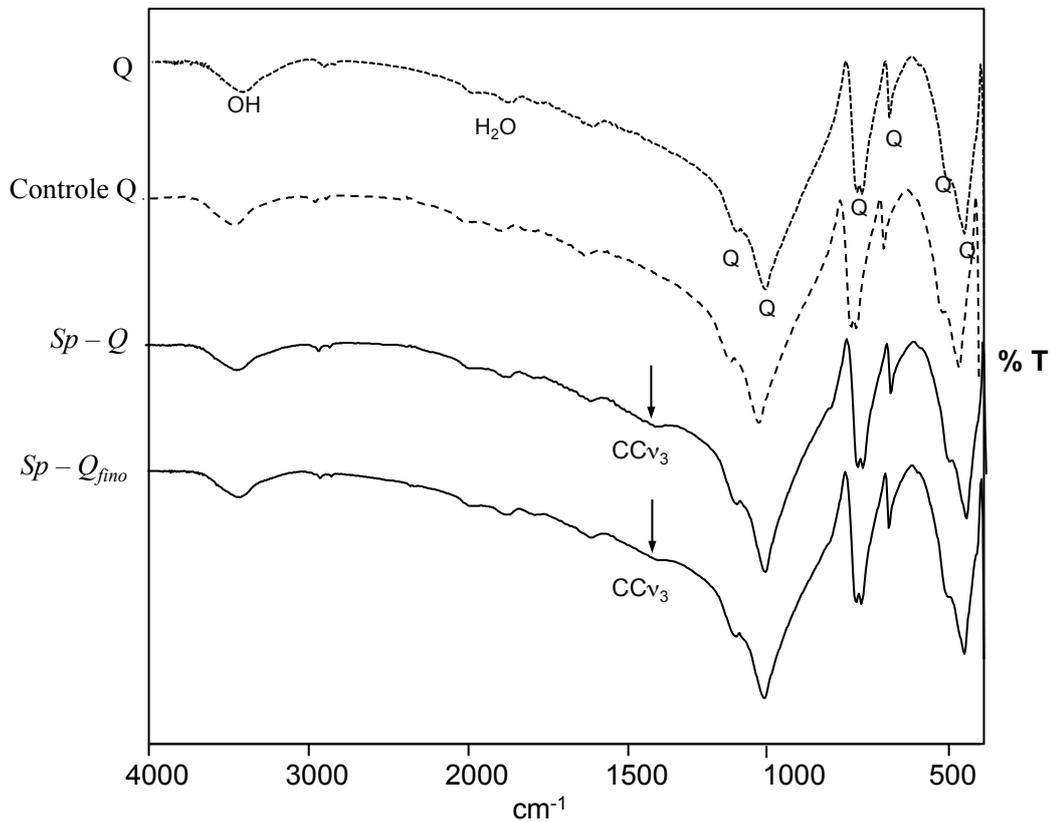


Figura 4-94. FTIR da amostra de areia de quartzo peneirada Q_{fino} , biotratada com *S. pasteurii*, e comparação com a amostra *Sp-Q* do estágio 1, e a amostra sem tratamento e amostra controle. Nota: CC: carbonato de cálcio, Q: quartzo.

A Figura 4-95 mostra os espectros das misturas quartzo-caulim e quartzo-bentonita, com dosagem 98%-2% (Q-C2% e Q-B2%), biotratadas com *S. pasteurii* e a comparação com as misturas do estágio 1, com dosagem 90%-10% (Q-C10% e Q-B10%).

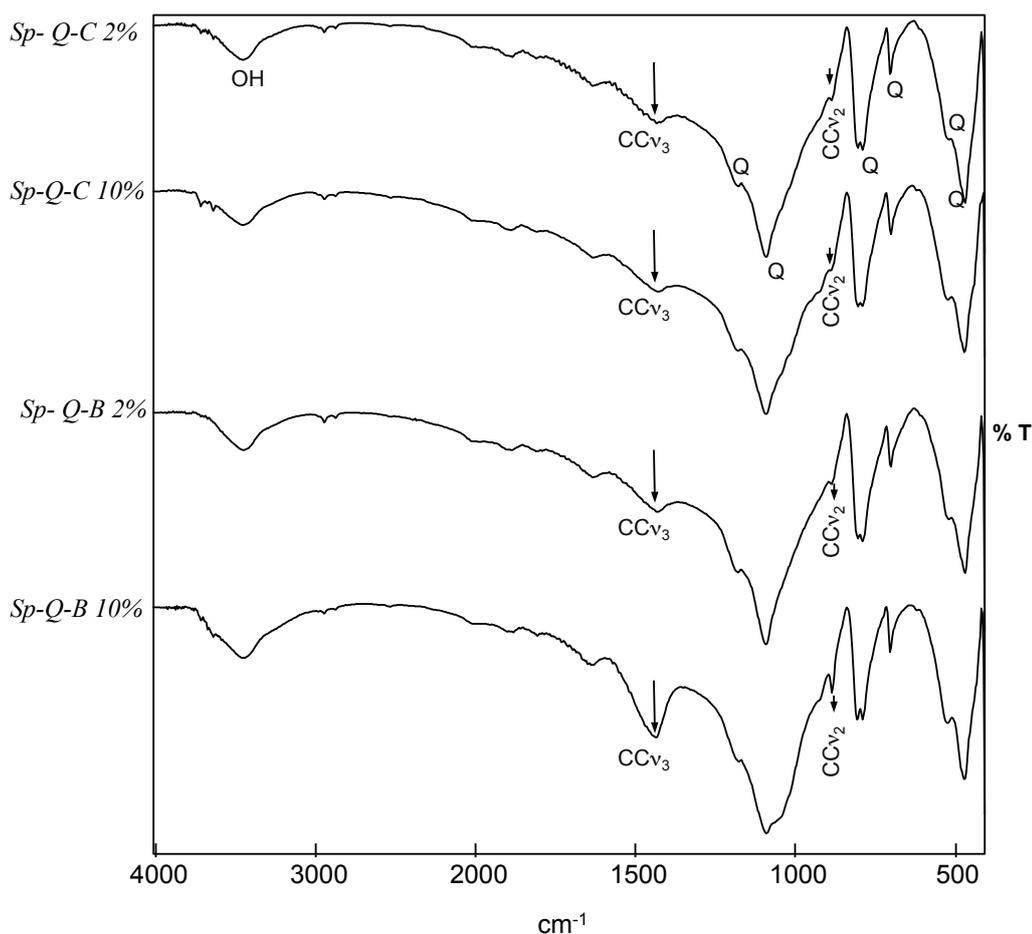


Figura 4-95. FTIR das misturas Q-C2% e Q-B2% biotratadas com *S. pasteurii* e comparação com as misturas Q-C10% e Q-B10%, do estágio 1. Nota: CC: carbonato de cálcio, Q: quartzo.

Nos espectros de ambas misturas com dosagem 98%-2% (Q-C2% e Q-B2%) foram identificadas as bandas de absorção associadas a carbonato de cálcio em CCv_3 , $1420/1425\text{ cm}^{-1}$ respectivamente, com uma banda larga, de intensidade média. A banda de CCv_2 foi identificada em 878 cm^{-1} na mistura Q-C2%, como um leve indício do sinal, enquanto que na mistura Q-B2% foi observada a banda de absorção com maior intensidade, porém ainda pequena.

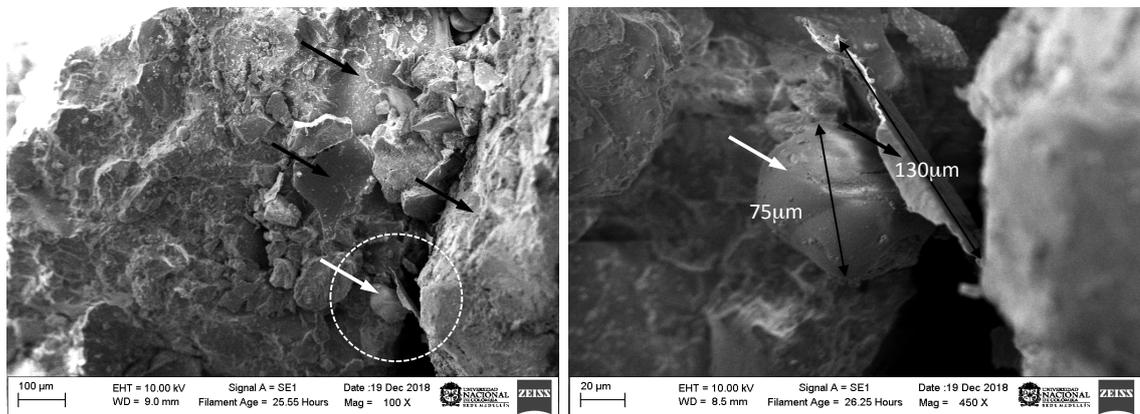
Estes resultados confirmaram a precipitação de carbonato de cálcio em todas as amostras submetidas a tratamento microbiológico.

✓ *Análises no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).*

As análises no MEV foram feitas sobre as amostras das misturas quartzo-caulim e quartzo-bentonita com dosagens 98%-2% (Q-C2% e Q-B2%), sendo que nas imagens obtidas foi possível evidenciar a presença de carbonato de cálcio nestas amostras.

As Figura 4-96, Figura 4-97 e Figura 4-98 mostram imagens obtidas no MEV, análises por EDX e os mapas de composição de elementos da amostra quartzo-caulim com dosagem 98%-2% (Q-C2%).

A Figura 4-96 (A) corresponde a uma imagem da amostra Q-C2% onde são observados grãos de areia de quartzo (seta preta) e no espaço entre eles material acumulado ligando os grãos. Foram observadas estruturas de forma plana, possivelmente da caulinita, de 130-200 μm de comprimento e uma estrutura de forma esférica (seta branca), possivelmente o carbonato de cálcio, com 75 μm de diâmetro (Figura 4-96 B).



a) Imagem MEV, modo SE, 100X. Mistura 98% areia de quartzo – 2% Caulim, biotratada com *S. pasteurii*

b) Imagem MEV, modo SE, 450 X. Mistura 98% areia de quartzo – 2% Caulim, biotratada com *S. pasteurii*

Figura 4-96. Imagens oriundas do MEV, modo SE, mistura quartzo-caulim 98%-2%. A) mistura *Sp-Q-C2%* em 100X: são observados grãos de quartzo (setas pretas) e entre os grãos, material acumulado ligando as partículas. B) imagem em 450X, da área no círculo branco da imagem em A, mostrando uma estrutura de forma esférica, possivelmente de CC (seta branca) e uma estrutura de forma plana, possivelmente associada à caulinita.

Análises por EDX, da área central da Figura 4-96A, são apresentadas na Figura 4-97. Estas análises confirmaram a presença da caulinita, pelos elementos detectados Al, Si, K, O, na estrutura de forma plana (ponto E1) e a presença de carbonato de cálcio cobrindo os grãos de quartzo, no ponto E3 (Si, O, Ca, C). A estrutura de forma esférica, nas análises EDX do ponto E2 corresponde a carbonato de cálcio (C, Ca e O), misturado com caulinita (Al, Si).

O mapa de elementos químicos, apresentado na Figura 4-98, confirma a composição do grão de hábito esférico como carbonato de cálcio (Ca, C e O), possivelmente vaterita. O mapa de elementos confirma a caulinita (seta branca) e os grãos de quartzo (Q), com o Si e o O.

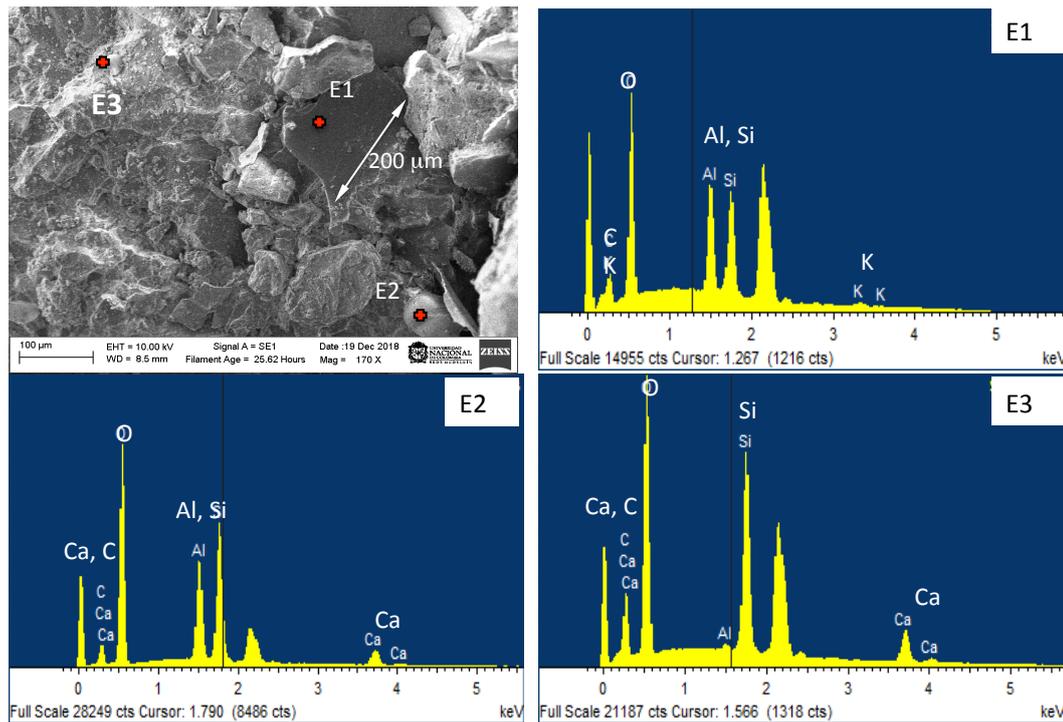


Figura 4-97. Análise EDX da amostra *Sp-Q-C2%*. Espectros da composição química dos pontos E1, E2 e E3, mostrando a existência de caulinita pelos elementos Si, Al, C, K e O, no ponto E1, o carbonato de cálcio misturado com caulinita no ponto E2 (Ca, C, O, Al, Si) e o carbonato de cálcio cobrindo o quartzo no ponto E3 (C, C, O, Si).

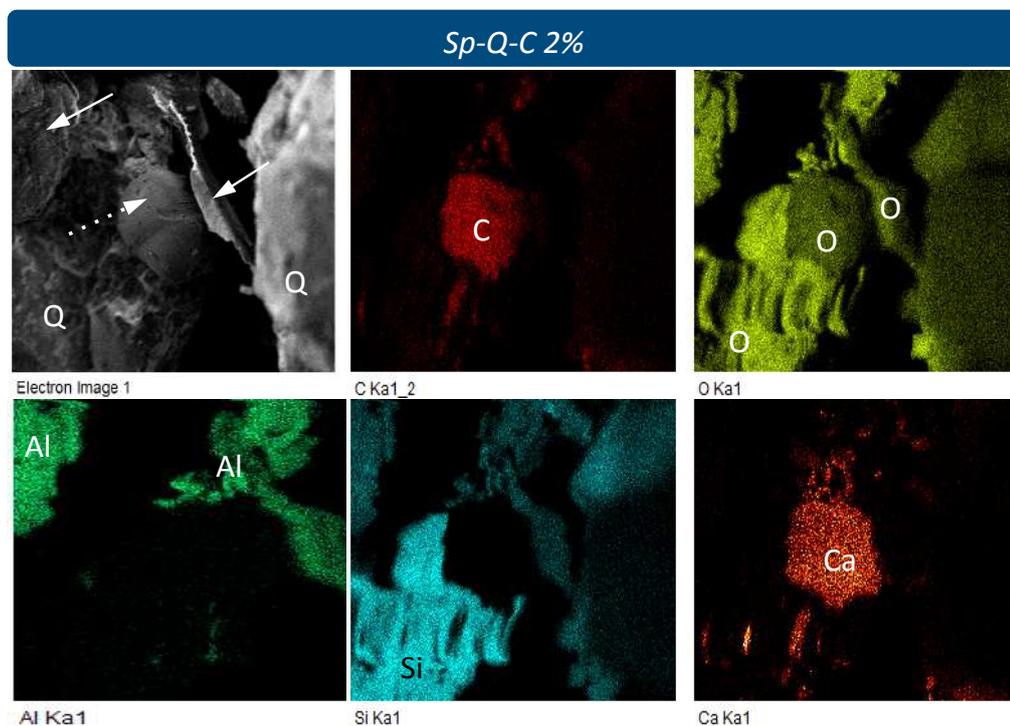
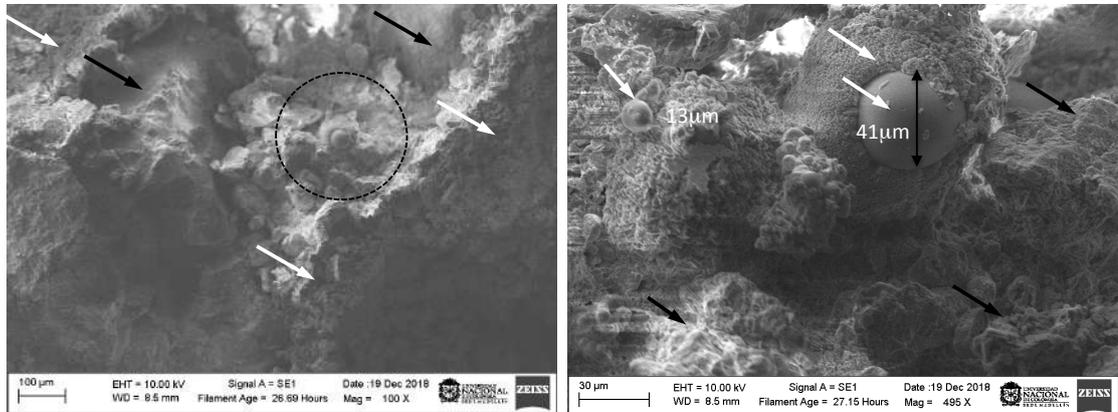


Figura 4-98. Mapa de composição de elementos da amostra *Sp-Q-C2%*, contendo: C (carbono), O (oxigênio), Alumínio (Al), Si (silício) e Ca (cálcio), associados a carbonato de cálcio (seta branca de linha pontilhada), caulinita (seta branca de linha contínua) e o quartzo (Q).

As Figura 4-99, Figura 4-100 e Figura 4-101 mostram imagem no MEV, análises por EDX e os mapas de composição de elementos da amostra quartzo-bentonita, com dosagem 98%-2% (Q-B2%).



a) Imagem MEV, modo SE, 100 X. Mistura 98% areia de quartzo – 2% Bentonita, biotratada com *S. pasteurii*

b) Imagem MEV, modo SE, 495 X. Mistura 98% areia de quartzo – 2% Bentonita, biotratada com *S. pasteurii*

Figura 4-99. Imagens no MEV, modo SE, quartzo-bentonita 98%-25%. A) mistura *Sp*-Q-B2% em 100X: são observados grãos de quartzo (setas pretas) cobertos e ligados por carbonato de cálcio (setas brancas). B) imagem em 495X, da área no círculo preto da imagem em A, mostrando formas esféricas de CC (setas brancas) com diâmetros entre 13 e 41 μm .

A Figura 4-99 (A) corresponde a uma imagem da amostra Q-B2%, onde são observados grãos de areia de quartzo (setas pretas) cobertos pelo carbonato de cálcio (setas brancas), onde o espaço entre os grãos foi observado com material acumulado, ligando os grãos, além de alguns grãos de hábito esférico. A imagem (B) corresponde ao zoom da área central, entre os grãos de quartzo, onde foram observadas formas esféricas de carbonato de cálcio (setas brancas), com diâmetros entre 13 e 41 μm .

Por sua vez, as formas esféricas são revestidas por CC, como é confirmado nas análises EDX, nos espectros dos pontos E1 e E3 (Figura 4-100), evidenciadas pelos sinais de C, Ca e O, e em menor intensidade de Al e Si. A área do ponto E2, corresponde à mistura de um argilomineral (bentonita), pela presença de Al, Si, K, O, e o carbonato de cálcio (Ca, C, O).

O mapa de elementos (Figura 4-101), confirma que toda a área entre os grãos é composta de carbonato de cálcio (C de cor vermelha, Ca de cor laranja e O de cor amarela). Também foi detectado sódio (Na), magnésio (Mg) e ferro (Fe) associados à bentonita.

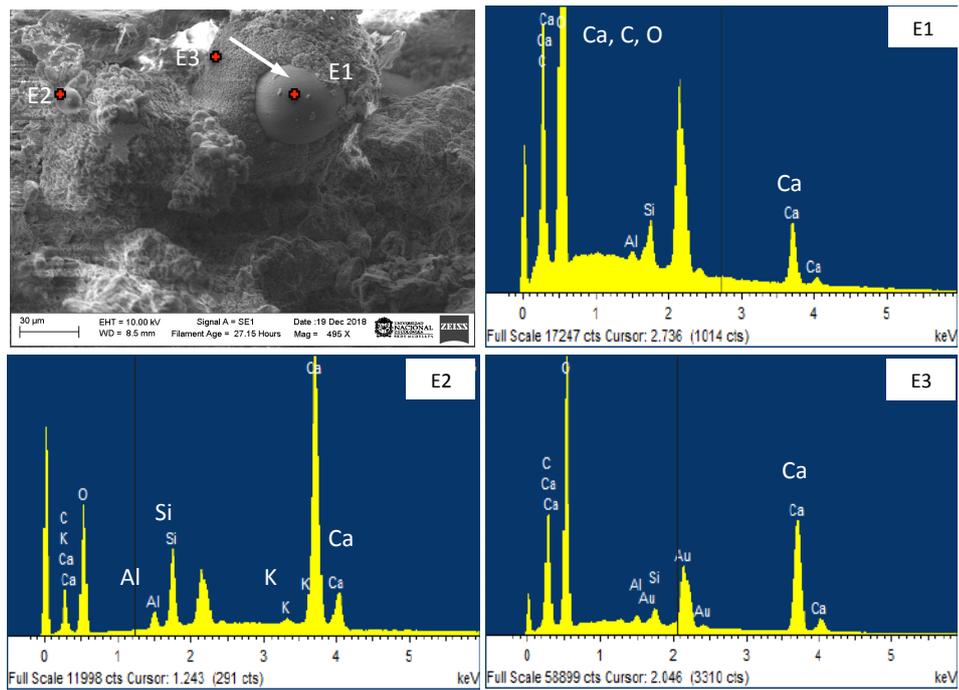


Figura 4-100 Análise EDX da amostra *Sp-Q-B2%*. Espectros da composição química dos pontos E1, E2 e E3, mostrando a existência de argilominerais pelos elementos Si, Al, O e K, no ponto E2, e carbonato de cálcio nos pontos E1 e E3 (Ca, C, O).

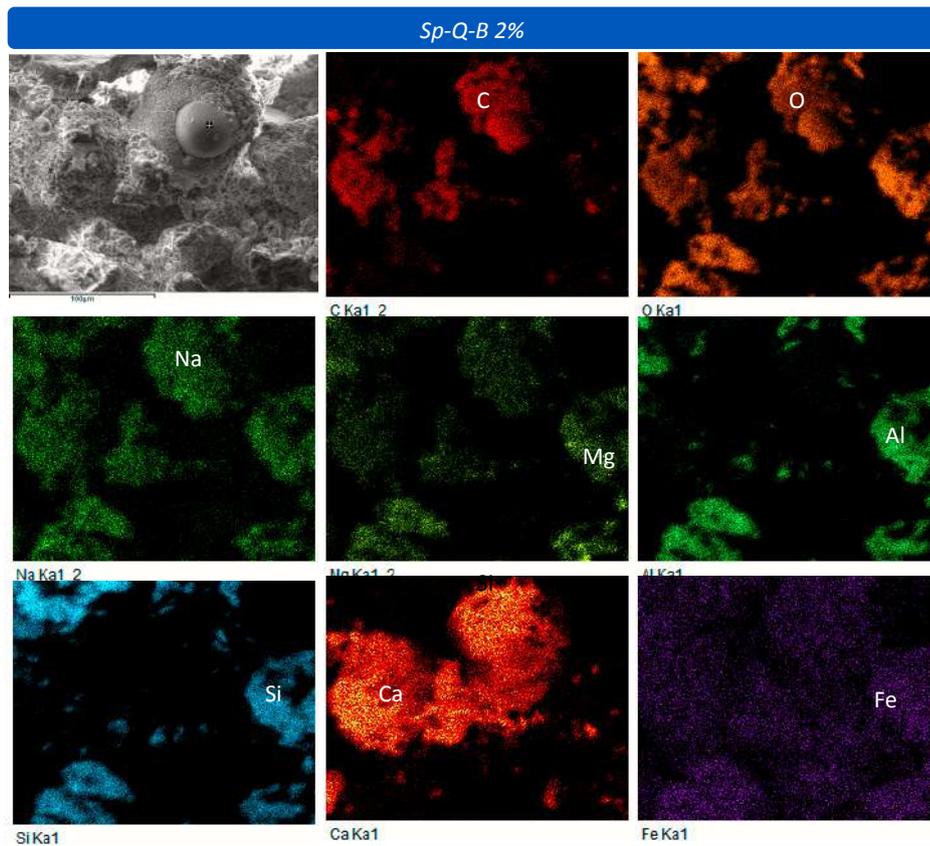


Figura 4-101. Mapa de composição de elementos da amostra *Sp-Q-B2%*, contendo: C (carbono), O (oxigênio), Alumínio (Al), Si (silício), Ca (cálcio), sódio (Na), magnésio (Mg) e ferro (Fe).

4.4.2.4 Estágio 2: caracterização física, química e mecânica dos solos depois do tratamento microbiológico

✓ *Distribuição granulométrica:*

Como foi expressado no Estágio 1, as análises granulométricas feitas nas amostras biotratadas, não representam a granulometria real dos solos depois do tratamento, dado que as agregações formadas por o tratamento microbiológico foram destruídas mecanicamente antes de fazer a análise granulométrica. As amostras utilizadas correspondem aos corpos de prova falhados à compressão simples. As curvas granulométricas das misturas quartzo-caulim e quartzo bentonita, com dosagem 98%-2%, são apresentadas na Figura 4-102.

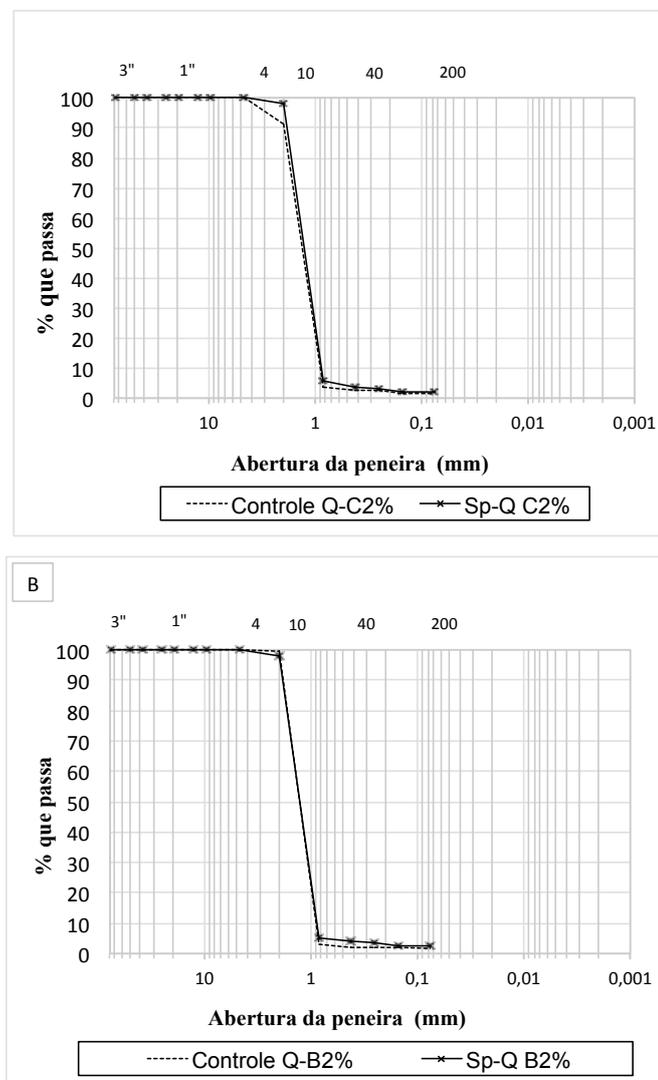


Figura 4-102. Análise granulométrica das amostras biotratadas com *S. pasteurii* e controles. A) mistura quartzo-caulim dosagem 98%-2% (Q-C2%). B) mistura quartzo-bentonita dosagem 98%-2% (Q-B2%).

Na Figura 4-103, é apresentada a análise granulométrica das amostras biotratadas e as amostras sem tratamento da areia de quartzo de grão fino (Q_{fino}) e é comparada com a granulometria da areia de quartzo de grão mais grosso, Q.

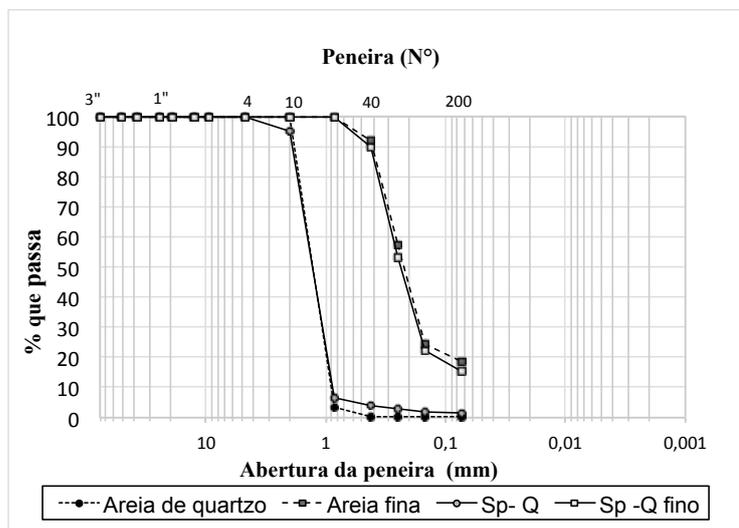


Figura 4-103. Análise granulométrica amostras de areia de quartzo: Q e Q_{fino} , biotratadas com *S. pasteurii* e comparação com amostras sem tratamento.

As análises granulométricas das amostras, mostram um ligeiro aumento na percentagem de partículas finas, passando a peneira #200, nas amostras biotratadas com relação aos controles, porém, os resultados não são representativos porque as amostras não são representativas.

✓ *Conteúdo de bases trocáveis:*

Os resultados da determinação das bases trocáveis em meq/100g do solo, das amostras biotratadas é mostrado na Tabela 4-11.

Tabela 4-11. Bases trocáveis e capacidade de troca catiônica (CTC) das amostras do estágio 2.

Solo	Ca ²⁺ (meq/100g)	Mg ²⁺ (meq/100g)	Na ⁺ (meq/100g)	K ⁺ (meq/100g)	Cátions trocáveis (meq/100g)
Q - C 2%	0,5	0,02	0,02	0,01	0,55
Controle Q - C 2%	3,6	0,03	0,03	0,07	3,73
<i>Sp Q</i> - C 2%	24,2	0,02	0,02	0,03	24,3
Q - B 2%	0,15	0,03	0,02	0,05	0,25
Controle Q-B 2%	1,8	0,07	0,03	0,04	1,94
<i>Sp Q</i> - B 2%	23,2	0,06	0,04	0,05	23,4
Q_{fino}	0,75	0,09	0,02	0,03	0,89
<i>Sp Q</i> Q_{fino}	16,8	0,02	0,04	0,07	16,9

Em todas as amostras houve aumento nos cátions trocáveis, devido aos tratamentos biótico e abiótico, mas, as maiores mudanças foram nas amostras biotratadas. A principal mudança em todas as amostras foi devida ao aumento do cátion cálcio Ca^{2+} .

O aumento do Ca^{2+} nos controles, com relação à amostra original, foi de 7 vezes na mistura Q-C2% e 12 vezes na mistura Q-B2%, enquanto que, o aumento do Ca^{2+} nas amostras biotratadas com relação à amostra original, foi de 48 vezes na mistura Q-C2% e 154 vezes na mistura Q-B2%. O aumento do Ca^{2+} na amostra de Q_{fino} foi de 22 vezes, com relação à amostra sem tratamento. No geral, o comportamento foi semelhante no estágio 1, onde, as maiores mudanças no teor de cátions trocáveis e a capacidade de troca catiônica, foram apresentadas nas misturas com bentonita.

✓ *Resistência à compressão simples:*

Ensaio de resistência à compressão simples (σ_{usc}), foram feitos nos corpos de prova das amostras *Sp-Q-C2%* e *Sp-Q-B2%*. Ambas amostras, apresentaram propriedades físicas semelhantes, com peso específico de $13,8 \text{ kN/m}^3$ e porosidade final de 48%.

A resistência à compressão simples (σ_{usc}) foi de 174 kPa para a mistura quartzo-caulim com dosagem 98%-2% (Q-C2%) (Figura 4-104), e a curva tensão-deformação mostra um comportamento de areias cimentadas (Juárez e Rico, 1965).

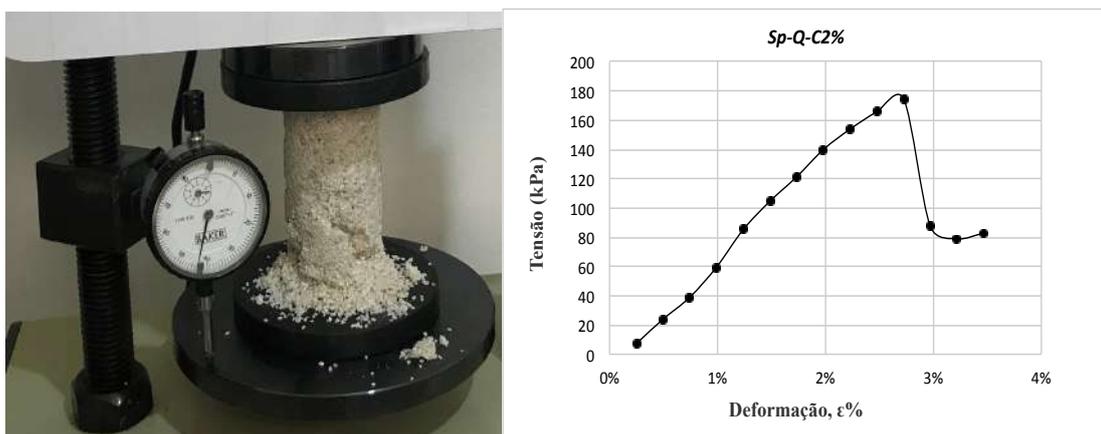


Figura 4-104. Curva tensão – deformação, do ensaio de resistência à compressão simples, amostra *Sp-Q-C2%*.

A resistência à compressão simples (σ_{usc}) foi de 106 kPa para a mistura quartzo-bentonita com dosagem 98%-2% (Q-B2%) (Figura 4-105).

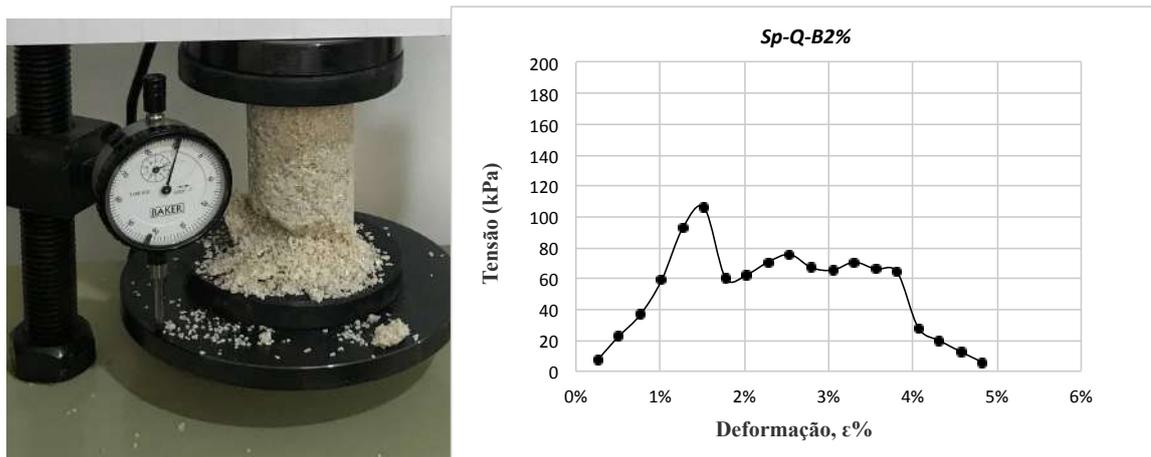


Figura 4-105. Curva tensão – deformação, do ensaio de resistência à compressão simples, amostra *Sp-Q-B2%*.

Como nas amostras do estágio 1, o comportamento tensão –deformação das misturas quartzo-caulim e quartzo-bentonita com dosagem 98%-2%, foi comportamento com falha frágil e repentina, na metade inferior das amostras.

A Tabela 4-12 mostra o resumo dos parâmetros físicos e mecânicos das amostras que foram efetivamente biocimentadas por MICCP e determinada sua resistência à compressão simples, nos estágios 1 e 2.

Tabela 4-12. Parâmetros físicos e mecânicos das amostras biocimentadas nos estágios 1 e 2.

Amostra	γ_d (kN/m ³)	n%	σ_{usc} (kPa)	E_{50} (MPa)	CaCO ₃ precipitado (kg/m ³)
<i>Sp- Q</i> (falha #1)	14,0	48	553	8,1	93
<i>Sp- Q</i> (falha #2)	14,0	48	934	11,1	93
<i>Sp- Q-C2%</i>	13,8	48	175	7,5	95
<i>Sp- Q-C10%</i>	14,9	44	96	5,8	94
<i>Sp-Q-B2%</i>	13,8	48	106	7,4	98

Estes resultados parecem sugerir uma tendência em relação a uma maior resistência nas amostras com menor quantidade de finos.

A maior resistência à compressão simples, foi apresentada na amostra de 100% areia, Q, sem conteúdo de finos. Nas misturas quartzo-caulim, a maior resistência foi na mistura com menor dosagem de finos, 2% de caulim. Nas misturas quartzo-bentonita, a maior

resistência foi na mistura com menor conteúdo de finos, 2% de bentonita. Por outra parte, comparando as misturas com igual conteúdo de finos e diferentes minerais, houve maior resistências nas misturas com caulim que nas misturas com bentonita.

A resistência das amostras de areia, sem coesão e não confinadas, é devida principalmente à precipitação de carbonato de cálcio no contato entre partículas agindo como cimento. A precipitação de carbonato, além da mineralogia dos solos, também parece ter sido influenciada pelas características químicas relacionadas com os processos de adsorção, como o PCZ e o pH do meio líquido, que em algumas amostras, Q-C 2% e Q-B 10%, favorece a dispersão das partículas e em outras amostras, Q-C 10% e Q-B 2%, favorece a agregação das partículas.

Por outra parte, devido ao estado não saturado das amostras durante o ensaio de resistência à compressão simples, é possível ter uma pequena influência da sucção na resistência, porém, o predomínio de partículas de quartzo (90% e 92%), com $d_{60} = 1,4$ mm, faz que o aporte da sucção matricial seja menor a 1 kPa (Zapata *et al.*, 2000).

✓ *Susceptibilidade a erosão:*

Depois de serem mantidas por 6 horas submersas em 200 ml de água destilada, com pH de 6,6 e temperatura de 26°C, as amostras não apresentaram susceptibilidade a erosão e o grau de dispersividade foi grau 1: não dispersivo. O mesmo resultado foi obtido, depois de repetir o teste, com as amostras submersas durante 48 h, em água ligeiramente ácida, com pH de 4,5.

A Figura 4-106 mostra imagens das amostras de Q-C2% (imagem A) e Q-B2% (imagem B) biocimentadas com *S. pasteurii*, que foram usadas no ensaio de *Crumb*, e a sequência do ensaio desde o tempo $t=0$ h até o tempo $t=6$ h em água com pH= 6,6 e o tempo $t=48$ h em água ligeiramente ácida. A imagem (C) mostra a referência do Grau 1 de dispersividade do ensaio de *Crumb*, segundo a norma ASTM D6572.

Por se tratar de amostras quase que com quartzo puro (2% de caulim e 2% de bentonita), nos torrões de solos utilizados no ensaio de *Crumb*, pode se observar a ação cimentícia do tratamento microbiológico por MICCP.

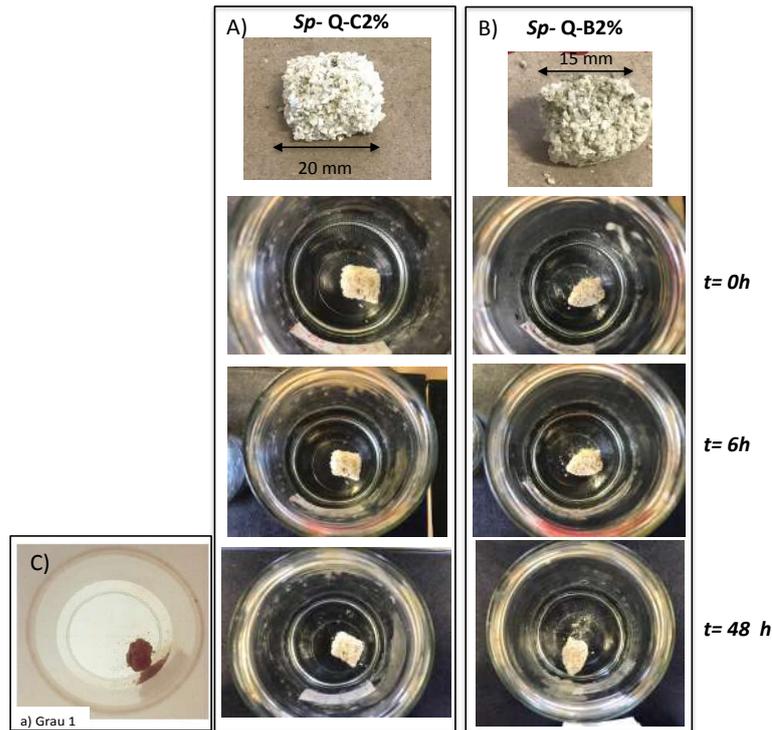


Figura 4-106. Teste de *Crumb* em amostras de solos biocimentadas com MICCP, usando a *S. pasteurii* A) amostra de Q-C2%. B) mistura Q-B2%. C) Grau 1 de dispersividade segundo ASTM D6572.

4.4.3 Resistência ao cisalhamento.

A resistência ao cisalhamento de amostras biocimentadas por MICCP, foi medida mediante um ensaio triaxial isotropicamente adensado, não drenado, usando-se uma amostra de areia de quartzo Q, cimentada usando a cepa *S. pasteurii*. A Figura 4-107 mostra a montagem da amostra de areia biocimentada para o ensaio triaxial.

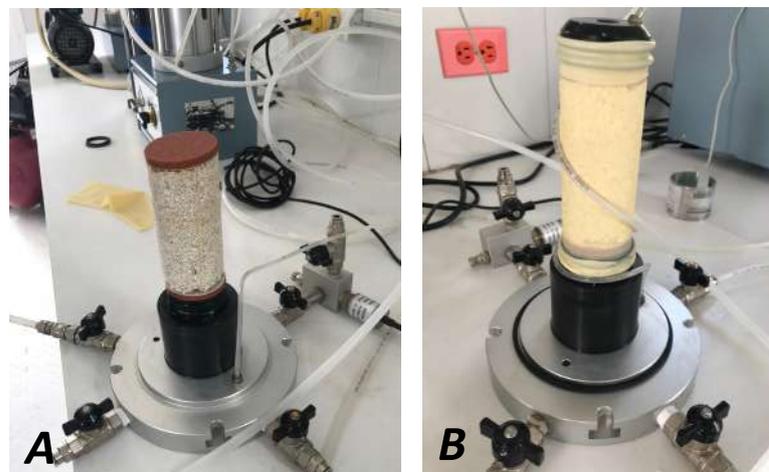


Figura 4-107. Montagem da amostra de areia de quartzo para ensaio triaxial. A) corpo de prova na base da câmara triaxial. B) amostra de areia coberta com a membrana.

A Figura 4-108 mostra o comportamento tensão-deformação da amostra de areia (corpo de prova #1), sob uma tensão confinante de 50 kPa.

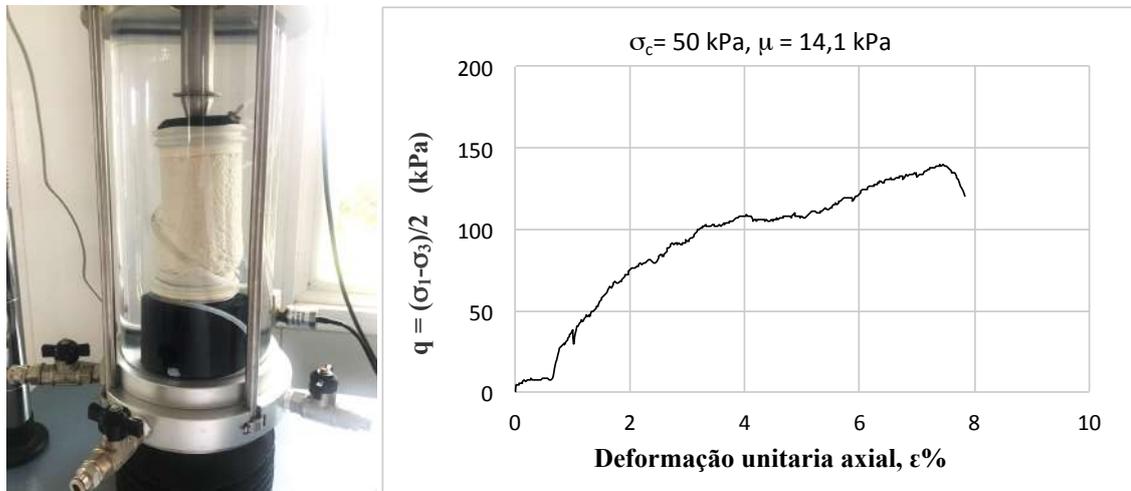


Figura 4-108. Resistência ao cisalhamento não drenada da amostra de areia de quartzo biocimentada por MICCP com *S. pasteurii*. Corpo de prova # 1. Na imagem é mostrada o modo de falha da amostra, para uma tensão confinante de 50 kPa.

Na imagem é observado que a amostra apresentou o plano de falha a 45° na metade inferior do corpo de prova e a tensão desviadora média foi de 138 kPa e a poro pressão na falha foi de 14,1 kPa.

A Figura 4-109 mostra o comportamento tensão-deformação da amostra de areia (corpo de prova #2), sob uma tensão confinante de 100 kPa. A amostra teve uma tensão desviadora média de 190 kPa e a poro pressão na falha foi de 6,3 kPa.

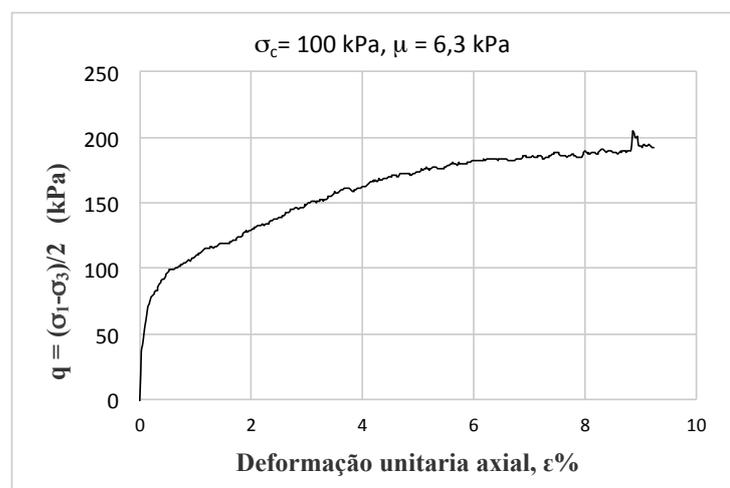


Figura 4-109. Resistência ao cisalhamento não drenada da amostra de areia de quartzo biocimentada por MICCP com *S. pasteurii*. Corpo de prova # 2, para uma tensão confinante de 100 kPa.

A Figura 4-110 mostra o modo de falha do corpo de prova #2 (imagem A). Na hora de fazer o desmonte da amostra, não foi observado o plano de falha por cisalhamento e a amostra apresentou trincas na metade superior (imagem B).

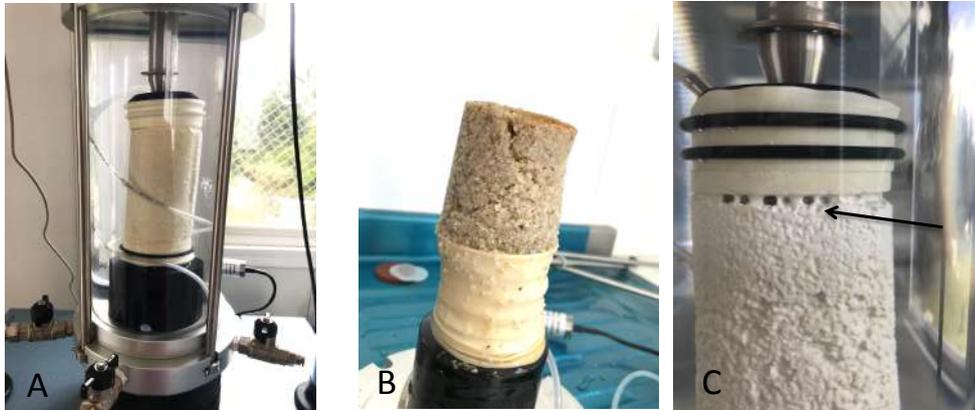


Figura 4-110. Modo de falha do corpo de prova # 2. A) falha do corpo de prova-deslocamento metade superior da amostra. B) trincas na metade superior da amostra. C) vazios no contato superior da amostra com a pedra porosa (seta preta).

E possível que o modo de falha do corpo de prova #2, tem sido influenciado por o mau contato da amostra com a pedra porosa superior (seta preta na imagem C) e pelos vazios gerados nessa área.

A Figura 4-111 A, mostra o comportamento tensão – deformação do corpo de prova #3, com uma tensão confinante de 200 kPa e característico de uma areia cimentada (Juárez e Rico, 1965). Nesta amostra o modo de falha foi frágil, com uma tensão desviadora média de 154 kPa, e apresentou uma resistência residual de 112 kPa e a poro pressão na falha foi de 88,4 kPa.

As imagens B-C, mostram a falha do corpo de prova #3, apresentando um engrossamento na metade inferior, enquanto, na metade superior não apresentou falha. Este comportamento mostra que não houve homogeneidade na cimentação da amostra, pela não homogeneidade da distribuição do carbonato de cálcio na massa do solo. Terzis *et al.* (2016), afirmaram que essas não homogeneidades locais, poderia levar a uma má interpretação dos resultados e, portanto, os resultados devem ser analisados tendo em conta a distribuição interna do carbonato de cálcio.

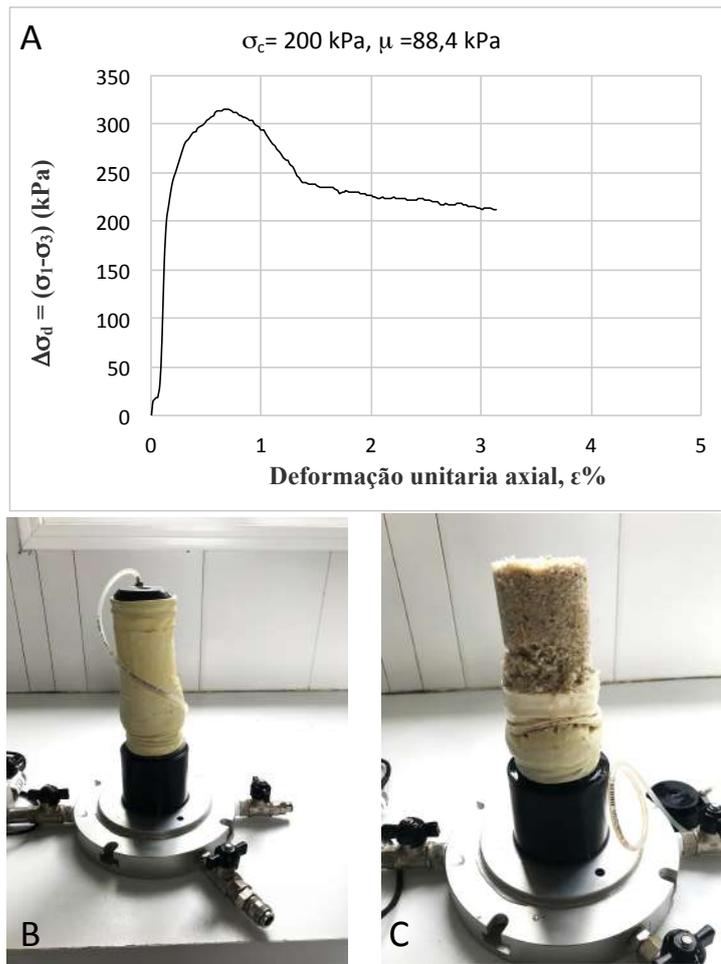


Figura 4-111 Resistência ao cisalhamento não drenada da amostra de areia de quartzo biocimentada por MICCP com *S. pasteurii*. Corpo de prova # 3. A-B) modo de falha da amostra. B) gráfica tensão-deformação, para uma tensão confinante de 200 kPa.

Com os dados dos corpos de prova #1 com tensão confinante de 50 kPa, #2 com tensão confinante de 100 kPa, e #3 com tensão confinante de 200 kPa, foram construídos os círculos de Mohr e determinada as envoltórias de rupturas, em termos das tensões totais e tensões efetivas (Figura 4-112). A envoltória da cor vermelha corresponde à envoltória de ruptura de tensões efetivas, levando em conta os corpos de prova #1 e #2, isto é, para as menores tensões confinantes. A envoltória da cor azul corresponde à envoltória de ruptura de tensões efetivas, levando em conta os corpos de prova #1 e #3 e descartando o corpo de prova #2, que apresentou o mau contato da amostra com a pedra porosa superior.

As areias sem coesão, saturadas, como no caso da amostra de areia (Q) biotratada, têm um intercepto de coesão zero, mas se a areia tem agente de cimentação entre as partículas, a envoltória de ruptura pode ter um intercepto de coesão.

Na Figura 4-112 é observado um intercepto de coesão de aproximadamente 40 kPa, no caso da envoltória de ruptura em termos das tensões efetivas, para os corpos de prova #1 e #3 (linha azul), e representa o efeito cimentante do carbonato de cálcio precipitado. Enquanto que, a envoltória de ruptura para os corpos de prova #1 e #2 (linha vermelha), apresenta um comportamento quase totalmente friccional, com intercepto de coesão perto de zero.

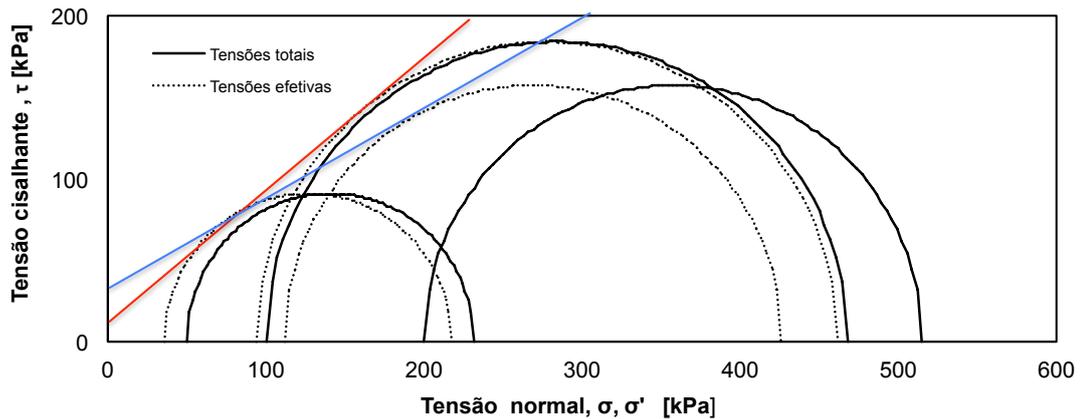


Figura 4-112. Círculos de Mohr e envoltórias de ruptura do solo (Q), em tensões totais e tensões efetivas. A envoltória da cor vermelha corresponde aos corpos de prova #1 e #2. A envoltória da cor azul corresponde aos corpos de prova #1 e #3.

Observando o comportamento tensão-deformação a diferentes tensões de confinamento, o corpo de prova #2 apresenta um comportamento característico de solos não cimentados, possivelmente associado à quebra prematura do cimento durante o estágio de saturação da amostra por contrapressões.

Finalmente, com estes resultados foram determinados os parâmetros de resistência ao cisalhamento não drenado, da amostra de areia de quartzo biocimentada (Tabela 4-13).

Tabela 4-13. Resumo dos parâmetros de resistência ao cisalhamento não drenados, amostra Sp-Q

Amostra	γ_d (kN/m ³)	e_o	ϕ'	c' (kPa)	Conteúdo CaCO ₃ (g/g)
Sp - Q	13,8	0,87	27	40	5,2

Estes resultados mostram a melhoria na resistência de uma amostra de areia de grão médio, com $d_{60}=1400 \mu\text{m}$, que foi cimentada utilizando o processo microbiológico da MICCP, por hidrólise da ureia. Mesmo quando não há resultados do ensaio com a amostra sem tratamento, poderia ser afirmado, que o aumento na resistência, foi devido

principalmente ao aumento na coesão do solo, coesão (40 kPa) que é aportada pelos cristais de carbonato de cálcio, que foram precipitados nos pontos de contato entre os grãos de areia. Esta coesão é a coesão verdadeira (Mitchell, 1993) devida à ligação química entre as partículas. A amostra original, corresponde a uma amostra de areia uniforme, sem plasticidade, sem conteúdo de finos, e portanto, sem coesão. Alguns autores relatam um ligeiro aumento no ângulo de atrito efetivo devido à MICCP.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

5.1 Conclusões

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de estudos sobre diversos processos geoquímicos bio-mediados permitiram avanços na utilização destes na engenharia geotécnica, aplicados à melhoria das propriedades e comportamento dos solos. Testes de laboratório e campo e algumas aplicações em projetos de engenharia, tem demonstrado que a biogeotecnologia e especificamente a *Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation* –MICCP é uma alternativa que pode ser ambientalmente sustentável e economicamente competitiva com as tecnologias existentes e que está “*ad-portas*” a ser aceita e reconhecida pelo usuário final, consultores em geotecnia e construtores, como uma técnica de estabilizar solos.

Esta pesquisa foi desenvolvida aplicando o método científico, procurando aprofundar no conhecimento do processo de precipitação de carbonatos mediado por microrganismos, visando sua aplicação em solos de diversas composições mineralógicas, para diferentes aplicações geotécnicas. A grande maioria das pesquisas desenvolvidas, limitaram o estudo a solos de composição silícia (areias de quartzo) e alguns dos trabalhos anteriores sobre este tema, que utilizaram outros tipos de solos, utilizaram métodos experimentais mais empíricos, sem o estabelecimento prévio de um protocolo baseado em questões fundamentais.

Cabe ressaltar como foi difícil realizar esta pesquisa sem a colaboração de profissionais de outras áreas do conhecimento, o que permite estabelecer como primeira conclusão deste estudo, a obrigatoriedade do trabalho conjunto entre a engenharia e outras áreas da ciência relacionadas à microbiologia, para percorrer com sucesso o caminho do conhecimento para a aplicação prática.

O principal mérito desta investigação consiste em ter sido feita a partir de um processo científico de compreensão das relações entre os microrganismos e o ambiente em que eles seriam aplicados, para finalmente conseguir estabelecer uma ligação entre a biogeotecnologia e a mecânica dos solos no âmbito da geotecnia.

Tendo em conta o acima exposto, descreve-se a seguir os resultados e conclusões mais relevantes, partindo dos resultados ao nível de Erlenmeyers que foram os que permitiram a compressão do processo da MICCP e terminando com os resultados dos ensaios em corpos de prova, que permitiram verificar o funcionamento da aplicação biotecnológica na mecânica dos solos.

Do estágio preliminar de triagem, foi possível determinar que os microrganismos uréase positiva e uréase negativa testados, foram capazes de precipitar carbonato de cálcio, por um processo de biomineralização, em um tempo de 15 dias, embora, as quantidades bioprecipitadas, foram diferentes dependendo se o microrganismo fosse uréase positiva ou negativa. Os microrganismos utilizados foram microrganismos comerciais, porém, são microrganismos isolados de solos (exceto a *B. pumilus*), o que abre as portas para a exploração e o uso da microbiota nativa das áreas onde seja requerida a aplicação do tratamento microbiológico. Trabalhos em solos tropicais como o desenvolvido por Valencia (2009), demonstraram que as bactérias nativas do solo, tem o potencial para a bioprecipitação de carbonato de cálcio.

Para as condições dos bioensaios de triagem utilizadas, os microrganismos uréase positiva tiveram uma melhor resposta para a bioprecipitação de carbonatos de cálcio que os microrganismos uréase negativa, principalmente pelas maiores quantidades de CaCO_3 precipitadas em menor tempo. O resultado, não exclui o uso de microrganismos uréase negativa, que podem ser usados, apenas indica que, devido à sua reação mais lenta, os tempos de aplicação do tratamento serão maiores. Mas os resultados confirmam que para a aplicação da MICCP em solos, o metabolismo da hidrólise da ureia é um mecanismo adequado e muito eficiente.

A conclusão da eficiência da MICCP por hidrólise da ureia é baseada nas quantidades de carbonato de cálcio precipitadas, que no caso das cepas da *S. pasteurii* variou entre 70% e 80% do total a precipitar pela estequiometria da reação, e nas bactérias *B. cohnii* e *C. ammoniagenes* houve uma eficiência na bioprecipitação entre 30% e 40%, neste estágio.

Por outro lado, a eficiência da MICCP com cepas uréase positiva, foi baseada no tempo da reação. As variáveis pH e o cálcio foram conclusivas para entender o processo e demonstraram que nas cepas uréase positiva, a degradação da ureia é imediata e o início da precipitação de carbonato de cálcio ocorre nas primeiras horas (2h) e termina às 24 a 72 horas, ou no dia 6 no caso onde ocorreu maior retardamento, dependendo da atividade uréase do microrganismo. Isso poderia ser explorado em casos de tratamentos do solo que exigem soluções de estabilização rápidas.

A compreensão do comportamento do pH no meio líquido durante o processo é muito importante, devida a sua relação com a precipitação de carbonato de cálcio. Em todos os bioensaios, o pH diminui rapidamente nas primeiras fases, e esta diminuição foi associada com o início da precipitação do carbonato de cálcio. De fato, alguns autores concordam que o maior consumo do cálcio fornecido, ocorre durante a diminuição do pH. Posteriormente o pH aumenta e a precipitação de carbonato continua, até que finalmente o cálcio é esgotado (e possivelmente também a ureia) e o pH é estabilizado.

Uma constatação importante nesta pesquisa, foi a da existência de um pH crítico em todos os bioensaios, um valor de pH em torno de 8, que aparentemente foi a condição que disparou a maior precipitação de carbonato de cálcio. Esta condição foi reportada por Stocks-Fischer *et al*, (2009), como a maior atividade da enzima uréase da *S. pasteurii*, porém, nesta pesquisa, esta condição foi observada em todos os microrganismos uréase positiva.

Esses comportamentos e a relação entre as variáveis pH e OD, com a precipitação de carbonato de cálcio, foram encontrados em uma interação puramente microrganismo-meio líquido. Posteriormente, foram verificadas em uma interação microrganismo-meio líquido-mineral, neste caso com quartzo, mas com pequenas diferenças, mostrando que o efeito do mineral, embora menor é perceptível, especialmente nas quantidades de carbonato de cálcio precipitadas.

No segundo estágio dos bioensaios, usando minerais diferentes do quartzo, como a caulinita e a montmorilonita, que têm maior atividade eletroquímica e estrutura mais complexa, os resultados desta pesquisa, mostraram uma diferença incontestável entre os diferentes substratos minerais, em relação à influência da mineralogia dos solos nos processos de MICCP.

Estes resultados são especialmente relevantes, levando em conta que neste tipo de experimento, onde os minerais foram colocados em suspensão conjuntamente com o meio de cultura e os microrganismos, foi eliminado grandemente a influência da porosidade do solo, que sempre tinha sido base para explicar as diferenças nos processos de biocimentação de solos com diferentes minerais. E, por outro lado, foi além das simples experimentações em folhas de vidro (*slides*), que têm sido usados até agora, para analisar a influência da mineralogia na MICCP.

Os bioensaios com diferentes substratos minerais, apresentaram diferenças nos tempos de diminuição e aumento do pH e os valores atingidos, mas diferenças, não tão apreciáveis, nos valores do cálcio em solução e no oxigênio dissolvido.

Uma variável importante nestes bioensaios, foi o cálcio em solução, que permitiu conhecer a taxa da precipitação do carbonato de cálcio nos diferentes substratos minerais. As principais diferenças no esgotamento do cálcio, nos três substratos minerais, foram observadas às 24 horas. Na bentonita foi removido 71% do cálcio enquanto que no caulim e na areia, foram semelhantes e entorno de 62% de cálcio removido. Passadas 72 h do início do experimento, as diferenças entre os minerais não foram apreciáveis. Isto indica que no início do processo de MICCP, a influência do substrato mineral é relevante nas velocidades das reações químicas, porém, o resultado final no tempo são indistintos, já que o cálcio fornecido foi precipitado (~100%) na forma de carbonato de cálcio, nos três minerais às 72 h.

Nas amostras controles, foram observadas ligeiras diminuições do pH e do cálcio em solução no início dos ensaios, mas estes permaneceram quase constantes durante os 15 dias do experimento. Em todas as variáveis, houve uma grande diferença entre os controles e os ensaios usando microrganismos, onde a reação de precipitação foi catalisada. Por outro lado, nas análises por FTIR nos controles, não foi identificada a presença de carbonato de cálcio, confirmando a mediação dos microrganismos na precipitação do carbonato de cálcio.

Neste estágio da pesquisa, as diferenças no processo de bioprecipitação de carbonato de cálcio e portanto, a principal influência dos substratos minerais na MICCP, foi observada em três aspectos: no polimorfo do carbonato de cálcio precipitado, na quantidade de carbonato precipitada e na textura ou forma de precipitar o carbonato em relação com as partículas, na matriz das diferentes amostras.

A presença de carbonato de cálcio, o polimorfo e a quantidade relativa precipitada nas amostras, depois do tratamento microbiológico, foi verificada nas análises por FTIR e os resultados sempre mostraram uma relação direta com os resultados do pH observados, em relação à maior ou menor quantidade precipitada de carbonato com a taxa de diminuição e aumento do pH.

O polimorfo precipitado apresentou diferenças dependendo dos microrganismos usados e também do substrato mineral. Nas amostras usando a areia de quartzo e caulim, foi precipitada vaterita, o polimorfo menos estável do carbonato de cálcio, misturado com a fase amorfa (ACC). Destaca-se que nos ensaios com microrganismos que apresentaram a maior taxa de precipitação do carbonato, *S. pasteurii* e *B. cohnii* e além da vaterita e ACC, foi bioprecipitada calcita, a fase mais estável do carbonato de cálcio, unicamente com o microrganismo que apresentou uma reação de precipitação mais lenta, *C. ammoniagenes*. A precipitação de calcita nos bioensaios com *C. ammoniagenes*, poderia ser devida à baixa atividade ureolítica, que por sua vez está relacionada com uma baixa supersaturação (Van Paassen, 2009). Ao contrário, pela alta taxa de hidrólise da ureia na *S. pasteurii*, pode ter sido favorecida a precipitação de fases metaestáveis, ACC amorfo e vaterita (Kralj *et al.* em 1990 citado por Al-Thawadi, 2008). O polimorfo bioprecipitado nos ensaios com areia e o caulim como substrato mineral, esteve influenciada pelo microrganismo, porém, nas amostras com bentonita precipitou calcita com todos os microrganismos utilizados. Uma hipótese para este comportamento, encontra-se relacionada com a presença na amostra de bentonita original, de carbonato de cálcio (ACC), composto que propicia a precipitação de calcita. Já a presença de minerais ricos em silício como o quartzo que compõe as amostras de areia e caulim, propicia a formação da vaterita (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2012).

Em relação com a quantidade de carbonato de cálcio precipitado nos diferentes substratos minerais, as análises estatísticas confirmaram, com uma confiabilidade de 95%, diferenças significativas entre a amostra de bentonita e as amostras de areia de quartzo e o caulim, enquanto entre as amostras de areia e caulim, não há diferenças estatisticamente significativas entre elas. A maior precipitação de carbonato de cálcio foi na amostra de bentonita, com uma precipitação média do 22%, enquanto, na areia de quartzo e no caulim houve uma precipitação em média do 14%, o que significa que na bentonita foi precipitado 1,6 vezes o carbonato de cálcio precipitado no quartzo e no

caulim. A estrutura da montmorilonita presente na bentonita, especificamente sua maior área superficial específica (ASE) e a carga negativa, poderia estar favorecendo a atração dos cátions de cálcio e a nucleação dos cristais de carbonato (Kralj e Vdovic, 2000). Além disso, a presença de carbonato de cálcio na bentonita aparentemente favoreceu a maior precipitação de CaCO_3 em relação com o substrato de composição silícica como no quartzo, como foi percebido nas experimentações em folhas de vidro (*slides*) de Rebata-Landa, 2007 e Rodriguez-Navarro *et al.*, 2012.

A precipitação de carbonato de cálcio nas amostras biotratadas com MICCP, foi observada macroscopicamente e em imagens no MEV. Macroscopicamente, na areia de quartzo como precipitado fino de cor creme e na formação de torrões de areia aglomerada de 2 a 3 cm de diâmetro equivalente, e na bentonita, na forma de precipitados de cor creme, como grãos de hábito lamelar, e mostrando uma aparente textura mosqueada de carbonato de cálcio na matriz de bentonita. Também na bentonita, o tratamento diminuiu a retração na amostra gerando menor aparição de trincas por secagem, o que contribui para a estabilização do solo fino. Nas amostras de caulim, não foram observadas evidências de precipitação ou cimentação, após o processo de tratamento biológico. Nas imagens no MEV, na areia de quartzo, o carbonato de cálcio foi precipitado cobrindo os grãos, mas, principalmente nos pontos de contato entre os grãos, agindo como pontes de cimentação. Esta observação é muito importante, porque a biocimentação do solo e o aumento na resistência, dependem, além da quantidade de carbonato precipitado, da distribuição do carbonato bioprecipitado nos pontos de contato entre as partículas, como foi observado nos corpos de prova de solos biocimentados nesta pesquisa. No caulim, o carbonato de cálcio foi encontrado finamente inter-crescido com a caulinita, em alguns áreas, preenchendo os espaços vazios, mas não foram identificadas formas cristalinas evidentes.

Como síntese geral conclui-se que com os resultados obtidos no âmbito desta pesquisa, foi verificada a influência do substrato mineral na precipitação de carbonato de cálcio e, além disso, foram identificados os principais aspectos onde esta influência se destaca, aspectos que devem ser levados em conta para a aplicação da MICCP como método de estabilização do solo, dependendo dos objetivos desejados em cada projeto particular.

Uma vez que o como? e o porquê? do processo de MICCP, foram compreendidos, repetidas as limitações do próprio alcance da pesquisa, os resultados do último estágio onde se analisou o comportamento mecânico dos materiais submetidos ao tratamento biológico, permitiram fazer a ligação entre o desenvolvimento da biotecnologia com sua aplicação na mecânica de solos. O segundo grande mérito desta pesquisa, foi ter conseguido uma melhoria efetiva dos solos selecionados, usando o protocolo estabelecido a partir dos resultados dos bioensaios em Erlenmeyer.

Nesta pesquisa, foi possível biocimentar diferentes tipos de solos usando a MICCP. De forma geral, foram observadas diferentes tendências na precipitação do cálcio, segundo o tipo de amostra, sugerindo uma influência do mineral no processo de MICCP, como foi observado nos bioensaios ao nível de Erlenmeyer. Porém, as diferenças não foram observadas entre todas as amostras, foram observadas principalmente entre a amostra de quartzo-bentonita na dosagem (90%-10%) e com as outras amostras, areia de quartzo, mistura areia – caulim na dosagem (90%-10%) e misturas areia de quartzo-finos (caulim ou bentonita) na dosagem (98%-2%).

Nos ensaios de biocimentação, também foi observada a influência do microrganismo e mais uma vez, os melhores resultados foram obtidos nas amostras biotratadas com *S. pasteurii*, com uma eficiência em média de 88%, enquanto que naqueles com a *C. ammoniagenes* a eficiência foi de 30% e com a *B. cohnii* apenas de 15%.

Dos resultados de pH, OD, cálcio em solução, a menor precipitação de carbonato de cálcio foi na areia de quartzo (Q) e a maior precipitação de carbonato de cálcio foi na mistura quartzo -bentonita dosagem 90%-10%. Como foi observado nos bioensaios em Erlenmeyer, a presença de carbonato de cálcio na amostra de bentonita parece promover a maior precipitação de carbonato de cálcio e a presença de sílicio na amostra de quartzo a inibe. Também foi observado, que a presença de 10% de bentonita misturada com a areia, conseguiu mudar o comportamento do solo e favorecer a precipitação do carbonato de cálcio. Destaca-se no entanto, que o resultado final da biocimentação nos corpos de prova, foram influenciados por outras variáveis, como foi vislumbrado no início da pesquisa, variáveis físicas como a densidade, porosidade e o tamanho das partículas e mesmo a sucção nos corpos de prova submetidos ao ensaio de compressão simples.

Usando o tratamento de MICCP, com *S. pasteurii* e com o protocolo estabelecido, foram biocimentadas eficazmente as amostras de areia de quartzo de grão médio (Q), as misturas quartzo-caulim dosagem 98%-2% e 90%-10% e a mistura quartzo-bentonita dosagem 98%-2%. A mistura quartzo-bentonita dosagem 90%-10% foi biocimentada em 90% do volume total da amostra. Isto pode estar relacionado à formação de um plano de fraqueza na amostra Q-B10%, devido à concentração de bentonita na área onde a amostra falhou durante a manipulação, ao tentar removê-la do molde em acrílico. Outra hipótese para explicar este comportamento, vai no sentido que a quantidade de carbonato de cálcio precipitado, não é condição suficiente para atingir um acréscimo da resistência do solo, e existem outros fatores críticos na biocimentação dos solos por MICCP, portanto, a resposta mecânica do solo tratado com MICCP pode variar significativamente dependendo do mecanismo de precipitação do CaCO_3 (Mujah et al., 2017). Também é importante a relação entre o pH do meio líquido e o PCZ dos solos, que determina a dispersão ou agregação do solos, e parece ter uma relação com o carbonato de cálcio precipitado.

Nesta pesquisa, em primeiro lugar, a verificação física da melhora das propriedades dos solos, foi feita qualitativamente, pela obtenção de corpos de prova cilíndricos em estado compacto, depois da aplicação do tratamento com MICCP, enquanto que nas amostras controles, as partículas de solos continuaram sem cimentar e a amostras continuaram em estado fofo. Por meio das análises por FTIR e análises no MEV/EDX, verificou-se a precipitação de carbonato de cálcio nas amostras biotratadas. Também foram observadas mudanças na granulometria, na CTC e no pH das amostras de solos e foi verificada a estabilidade do biocimento na avaliação da susceptibilidade a erosão da amostra submersa em água ligeiramente ácida, com pH de 4,5.

Além disso, os corpos de prova biocimentados foram submetidos ao ensaio de resistência à compressão simples, para se ter uma quantificação da melhoria da resistência do solo. O comportamento tensão – deformação dos solos biotratados com MICCP foi o comportamento característico de um solo de grão grosso, cimentado, com ruptura frágil e repentina e foram obtidos valores máximos de resistência à compressão simples de 934 kPa e o módulo secante a 50% da tensão máxima de ruptura de 11,1 MPa, na areia de quartzo (Q). Os valores mínimos foram obtidos na mistura areia de quartzo-caulim dosagem (90%-10%), com resistência à compressão simples de 96 kPa e

o módulo secante a 50% da tensão máxima na fratura de 5,8 MPa. Cabe salientar que devido ao fato dos corpos de prova terem se submetido a esse ensaio em condições não saturada, os valores destes parâmetro devem pelo menos em parte estarem sendo influenciados pela sucção atuante no solo.

Dos resultados dos testes de compressão triaxial adensados não drenados da amostra de areia de quartzo biotratada com MICCP, foi obtida a envoltória de ruptura e parâmetros de resistência ao cisalhamento do solo em termos de tensões efetivas: ângulo de atrito de 27° e coesão de 40 kPa.

Todo este conjunto de resultados, confirma a biocimentação do solo obtida por meio do tratamento microbiológico (MICCP) e a melhoria nas propriedades do solo. A melhoria da resistência foi devida provavelmente à geração da coesão oriunda das cimentações dos grãos de areia por carbonato de cálcio precipitadas pelo tratamento microbiológico (Mitchell, 1993).

Como síntese conclusiva, a precipitação de carbonatos de cálcio induzida por microrganismos (MICCP), têm grande potencial para ser usada na melhoria das propriedades dos solos e nesta pesquisa foram identificados os principais aspectos do processo que são influenciados pela mineralogia dos solos. A MICCP como foi vista nesta pesquisa, pode ser usada em diversas aplicações geotécnicas tais como fundações, pavimentos, estabilização de encostas e contenções e o conhecimento dos aspectos analisados e outros reportados na literatura, fornecem os elementos para orientar o projeto de tratamento microbiológico particular à solução de cada problema.

5.2 Sugestões para pesquisas futuras

Com base nas observações e resultados obtidos durante esta pesquisa, são abertas uma lista de sugestões para trabalhos futuros:

- Recomenda-se estudos mais detalhados sobre o mecanismo de precipitação do CaCO_3 na matriz do solo, toda vez que for vislumbrada sua influência no comportamento hidromecânico do solo, assim como na quantificação do carbonato de cálcio precipitado. Neste sentido é importante considerar a influência das características químicas como o potencial zeta e o PCZ. Por outro lado, recomenda-se aprofundar no

conhecimento e controle dos fatores determinantes para favorecer a precipitação de cristais de calcita nos diferentes solos, sob a precipitação de vaterita.

- No âmbito da mecânica dos solos, recomenda-se: i) avaliar o efeito da cimentação dos solos com MICCP, nas principais propriedades físico-mecânicas, a fim de definir o comportamento tensão-deformação dos solos biotratados. ii) estabelecer protocolos para a realização de ensaios de resistência, acordes com as características das amostras biocimentadas e as características do carbonato de cálcio precipitado. iii) avaliar o processo de MICCP, aplicando técnicas não destrutivas como a velocidade de onda de cisalhamento.

- Outro aspecto relevante a ser analisado é o método de aplicação do tratamento no solo de modo a melhorar a sua efetividade na solução de cada problema. Destaca-se que foi observada nesta pesquisa, a importância do método de aplicação do tratamento na massa do solo, pois o cálcio uma vez fornecido foi precipitado em carbonato de cálcio, em todos os solos e com todos os microrganismos, porém, a grande dificuldade foi alcançar uma precipitação homogênea de modo a aumentar a efetividade do tratamento, diminuindo a precipitação de carbonato na superfície das amostras, ou seja, nos pontos de lançamento.

- Analisar a efetividade do tratamento microbiológico na solução de problemas de erosão e na impermeabilização de superfícies.

- Avaliar técnica de aplicação controlada da MICCP, por exemplo, por meio de injeção (o biogrouting) destinada à melhoria de áreas selecionadas dentro do solo.

- Definir o método adequado para utilizar a MICCP na melhoria de areias para pavimentação.

- Nesta pesquisa foi feita uma tentativa tímida de estudar a estabilidade dos cristais, porém são necessários estudos mais completos para estabelecer esta propriedade do biocimento e as condições de solubilidade do carbonato de cálcio, em condições ambientais, como no caso particular de chuvas ácidas ou ruptura de redes de esgoto que provocam muitas vezes o derramamento de soluções ácidas.

- Toda ferramenta biotecnológica deve ser responsável em relação à sociedade e ao meio ambiente, por isso, na aplicação da MICCP, é necessário avaliar o risco ambiental

que podem gerar as mudanças em algumas propriedades químicas do solo, como o pH e a geração do amônio. Em relação a esta última preocupação, faz-se necessário ter uma política definida para o tratamento deste subproduto quando gerado no processo de biocimentação. Destaca-se que as mudanças no pH dos solos devidas ao tratamento por MICCP, podem ser ou não significativas. Nesta pesquisa foi observado que as mudanças de pH em solos alcalinos, compostos por minerais como o quartzo e a montmorilonita, com pH maiores que 8, não foram significativas (Apêndice B), porém, o comportamento do pH em solos ácidos como o caulim, foram significativas, com o pH variando de extremadamente ácido a fortemente alcalino devido ao tratamento por MICCP. Neste caso, as considerações necessárias devem ser feitas, dependendo das implicações da variação na acidez do solo.

- Além do estudo da precipitação do carbonato de cálcio, é interessante aprofundar as pesquisas sobre a biomineralização de óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio, que no caso dos solos tropicais agem como cimento aumentando a resistência dos solos.

- Finalmente, mas não menos importante, é a avaliação econômica da aplicação da MICCP. Embora existam estudos prévios, é interessante fazer este exercício para ter ferramentas que aproximam o desenvolvimento da MICCP à sua aplicação na prática profissional no âmbito da engenharia geotécnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achal, V. e Pan, X. (2014). Influence of Calcium Sources on Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation by *Bacillus* sp. CR2. *Appl Biochem Biotechnol.*, 173:307–317.
- Achal, V. e Kawasaki, S. (2016) Biogrout: A Novel Binding Material for Soil Improvement and Concrete Repair. *Front. Microbiol.*, 7:314.
- Addadi, A., Raz, S. e Weiner, S. (2003). STaking Advantage of Disorder: Amorphous Calcium Carbonate and Its Roles in Biomineralization. *Adv. Mater.*, 15 (12): 959-970.
- Almajed A., Khodadadi H., Kavazanjian E. Jr. e Hamdan N. (2019), Enzyme induced biocementated sand with high strength at low carbonate content. *Scientific Reports*: 9 (1135).
- Al Qabany, A., Soga, K. e Santamarina, C. (2012) Factors Affecting Efficiency of Microbially Induced Calcite Precipitation. *J. Geotech. Geoenviron. Eng.*, 138 (8):992-1001.
- Al Qabany, A. e Soga, K. (2013). Effect of chemical treatment used in MICP on engineering properties of cemented soils. *Géotechnique*, 63, 331.
- Al-Thawadi, S. (2008). High Strength In-Situ Biocementation of Soil by Calcite Precipitating Locally Isolated Ureolytic Bacteria. PhD thesis. Murdoch University, Western Australia.
- Al-Thawadi, S. (2011). Ureolytic Bacteria and Calcium Carbonate Formation as a Mechanism of Strength Enhancement of Sand. *Journal of Advanced Science and Engineering Research*, 1: 98-114.
- Anbu, P., Kang C-H., Shin Y-J. e So J-S. (2016). Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *Springer Plus* 5:250.
- Andersen, F.A. e Brecevic, Lj. (1991). Infrared Spectra of Amorphous and Crystalline Calcium Carbonate. *Acta Chem. Scand*, 45:1018-1024.
- Bang, S. S., Galinat, J. K., e Ramakrishnan, V. (2001). Calcite precipitation induced by polyurethane- immobilized *Bacillus pasteurii*. *Enzyme Microb Tech*, 28(4–5), 404–409.
- Baskar, S., Baskar, R., Mauclair, L. e McKenzie, J. A. (2006). Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: Possible origin for stalactites in Sahastradhara caves, Dehradun, India. *Current Science*, 90(1):58-64.
- Barabesi, C., Galizzi, A., Mastromei, G., Rossi, M., Tamburini, E. e Perito, B. (2007). *Bacillus subtilis* gene cluster involved in calcium carbonate biomineralization. *J Bacteriol*, 189(1):228–235.

- Camapum de Carvalho, J., Martines, M., Mortini, D., Fázio, J., da Motta, N. O. e Apolinário, R. (2006). Processos erosivos. Livro: Processos Erosivos no Centro-Oeste Brasileiro. Ed: FINATEC, Brasília, cap 2, 39-91.
- Camapum de Carvalho, J., de Farias Neves, G., Lemos, S., dos Anjos Mascarenha, M. e Chagas da Silva, F. (2015). Solos não saturados no contexto geotécnico. São Paulo : Associação Brasileira de Mecânica dos Solos e Engenharia Geotécnica (ABMS), cap 3.
- Carmona, J., Venda Oliveira, P. e Lemos, L. (2016). Biostabilization of a Sandy Soil Using Enzymatic Calcium Carbonate Precipitation. *Procedia Engineering*, 143: 1301-1308.
- Celada A.T e Martín A. (2002). Control de la precipitación del carbonato de calcio en sistemas de enfriamiento por sustancias húmicas. *Ingeniería hidráulica en México*, 12 (3): 65-78.
- Castanier, S., Le Metayer-Levrel, G. e Perthuisot, J.P. (1999). Ca-carbonates precipitation and limestone genesis—the microbiogeologist point of view. *Sediment Geol*, 126: 9–23.
- Chaparro, S., Becerra, L., Martínez, J.J e Rojas, H.A.-Sarmiento (2018). Soil bacteria that precipitate calcium carbonate: mechanism and applications of the process. *Acta Agron.*, 67 (2): 277-288.
- Cheng, L., and R. Cord-Ruwisch. (2012). In situ soil cementation with ureolytic bacteria by surface percolation. *Ecological Engineering*, 42:64–72.
- Cheng, L., Cord-Ruwisch, R. e Shahin, M. A. (2013). Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation at various degrees of saturation. *Can. Geotech. J.* 50: 81–90.
- Cheng, L., Shahin, M.A., Cord-Ruwisch, R., Addis, M., Hartanto, T. e Elms, C. (2014). Soil stabilization by microbial induced calcium carbonate precipitation: investigation of some important physical and environmental aspects. In: 7th International Congress on Environmental Geotechnics, Australia.
- Chu, J., Stabnikov, V. e Ivanov, V. (2012). Microbially induced calcium carbonate precipitation on surface or in the bulk of soil. *Geomicrobiol. J.* 29: 544–549.
- Chu, J., Ivanov, V., He, J., Maeimi, M. e Wu., S. (2015). Use of Biogeotechnologies for soil improvement. *Ground Improvement Case Histories*. Elsevier: cap 19: 571-589.
- Daskalakis, M. I., Rigas, F., Bakolas, A., Magoulas, A., Kotoulas, G., Katsikis, I. e Mavridou, A. (2015). Vaterite bio-precipitation induced by *Bacillus pumilus* isolated from a solutional cave in Paiania, Athens, Greece. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99: 73-84.

- DeJong, J.T., Fritzges, M.B. e Nüsslein, K. (2006). Microbial induced cementation to control sand response to undrained shear. *ASCE J. Geotech. Geoenviron. Eng.*, 132 (11): 1381–1392.
- DeJong, J. T., Mortensen, B. M., Martinez, B. C. e Nelson, D. C. (2010). Bio-mediated soil improvement. *Ecol. Eng.*, 36 (2): 197-210.
- DeJong, J.T., Soga, K., Kavazanjian, E., Burns, S., Van Paassen, L.A., Al Qabany, A., Aydilek, A., Bang, S.S., Burbank, M., Caslake, L.F., Chen, C.Y., Cheng, X., Chu, J., Ciurli, S., Esnault-Filet, A., Fauriel, S., Hamdan, N., Hata, T., Inagaki, Y., Jefferis, S., Kuo, M., Laloui, L., Larrahondo, J., Manning, D.A.C., Martinez, B., Montoya, B.M., Nelson, D.C., Palomino, A., Renforth, P., Santamarina, J.C., Seagren, E.A., Tanyu, B., Tsesarsky, M. e Weaver, T. (2013). Biogeochemical processes and geotechnical applications: progress, opportunities and challenges. *Géotechnique*, 63:4: 287-301.
- DeJong, J. T., Proto, C., Kuo, M. e Gómez, M. (2014). Bacteria, Bio-films, and Invertebrates...the Next Generation of Geotechnical Engineers? *Geo-Congress 2014, Technical Papers*, ASCE: 3959-3968.
- De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N., e Verstraete, W. (2008). Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement Concrete Res.*, 38(7), 1005–1014.
- De Muynck, W., De Belie, N. e Verstraete, W. (2010). Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecological Engineering*, 36: 118-136.
- Dhami, N. K., Reddy, M. S., e Mukherjee, A. (2013). Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in Microbiology*, 4, 314.
- Dhami, N. K., Reddy, M. S., e Mukherjee, A. (2013b). *Bacillus megaterium* mediated mineralization of calcium carbonate as biogenic surface treatment of green building materials. *World J Microb Biot*, 29(12), 2397–2406.
- Dhami, N. K., Reddy, M. S., e Mukherjee, A. (2014). Synergistic role of bacterial urease and carbonic anhydrase in carbonate mineralization. *Appl Biochem Biotech*, 172(5): 2552–2561.
- Dick J., De Windt W., De Graef B., Saveyn H., Van der Meeren P., De Belie N. e Verstraete W. (2006). Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation*, 17:357–367.
- Dixon, J.B. e Weed, S. B. (1989). *Minerals in Soil Environments*. 2nd Edition. Published by: Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA.
- Doran, P. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Edi. Acribia S.A.
- Fernandez, C. (1982). *Mejoramiento y estabilización de suelos*. Edit Limusa, Guanajuato, México.

- Fujita, Y., Redden, D., Ingram, J. C., Cortez, M. M., Ferris, F. G. e Smith, R.W. (2004). Strontium incorporation into calcite generated by bacterial ureolysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68 (15): 3261–3270.
- García, M.A, Márquez, M.A. e Moreno, C.X. (2016). Characterization of bacterial diversity associated with calcareous deposits and drip-waters, and isolation of calcifying bacteria from two Colombian mines. *Microbiological Research*, 182: 21-30.
- Gat, D., Tsesarsky, M., Wahanon, A. e Ronen, Z. (2014). Ureolysis and MICCP with model and native bacteria: implications for treatment strategies. *Proceeding of Geo-Congress 2014, Technical Papers*: 1713-1720.
- Gómez, C.M. (2013). Avaliação geotécnica de um perfil de solo tratado biotecnologicamente para fins de pavimentação. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Civil e Ambiental. Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- Hammes, F. e Verstraete, W. (2002). Key roles and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Environmental Science e Bio/Technology*, 1: 3-7.
- Hammes, F., Seka, A., Van Hege, K., Van de Wiele, T., Vanderdeelen, J., D Siciliano, S. e Verstraete, W. (2003). Calcium removal from industrial wastewater by biocatalytic CaCO₃ precipitation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78:670-677.
- Hamilton, W.A. (2003) Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis. *Biofouling*, 19(1): 65–76.
- Harkes, M. P., Van Paassen, L.A., Booster, J. L., Whiffin, V. S., e Van Loosdrecht, M. C. M. (2010). Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement. *Ecol. Eng.*, 36:112–117.
- Holtz, R.D., Kovacs, W.D., 1981. *An Introduction to Geotechnical Engineering*. Prentice-Hall, Inc, Englewood Cliffs, New Jersey, 733.
- Ismail, M. A., Joer, H. A., Randolph, M. F. e Meritt, A. (2002). Cementation of porous materials using calcite. *Geotechnique* 52, No. 5, 313–324.
- Ivanov, V. e Chu, J. (2008). Applications of microorganism to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. *Rev. Environ, Sci Biotechnol*, 7: 139-153.
- Jonkers, H. (2007). Self healing concrete: a biological approach. *Self Healing Materials: An alternative Approach to 20 Centuries of Materials Science*. In: van der Zwaag, S. (Ed.), Springer, Netherlands, pp. 195–204.
- Jonkers, H. e Schlangen, E. (2008). Development of a bacteria-based self healing concrete. *Tailor Made Concrete Structures – Walraven & Stoelhorst (eds) aylor & Francis Group, London, ISBN 978-0-415-47535-8, p: 425-430.*

- Jonkers, H. e Schlangen, E. (2009). A two component bacteria-based self-healing concrete. *Concrete Repair, Rehabilitation and Retrofitting II – Alexander et al (eds)*. Taylor & Francis Group, London, ISBN 978-0-415-46850-3, p: 215-220.
- Juárez, E. e Rico, A. (1965). *Mecánica de suelos*. Tomo I. México.
- Kadhim F. e Zheng J. (2016). Review of the Factors That Influence on the Microbial Induced Calcite Precipitation. *Civil and Environmental Research*, 8 (10):69-76.
- Karatas, I. (2008). Microbiological improvement of the physical properties of soils. PhD thesis. Arizona State University.
- Karol, R. H. (2003). *Chemical Grouting and Soil Stabilization*. New York: Marcel Dekker, 558.
- Kim, J., Dong, H., Seabaugh, J., Newell, S., and Eberl, D. (2004). Role of microbes in the smectite-to-illite reaction. *Science*, 303: 830-832.
- Kralj, D. e Vdovic, N. (2000). The influence of some naturally occurring minerals on the precipitation of calcium carbonate polymorphs. *Wat. Res. Vol. 34, No. 1*, pp. 179±184, 2000.
- Kucharski, E. S., Cord-Ruwisch, R., Whiffin, V. e Al-Thawadi, S. M. (2012). Microbial biocementation. Google Patents.
- Lee, Y.N. (2003). Calcite Production by *Bacillus amyloliquefacies* CMB01. *Journal of Microbiology*, 41 (4): 345-348.
- Lee, M.L., Ng, W.S. e Tanaka, Y. (2013). Stress-deformation and compressibility responses of bio-mediated residual soils. *Ecological Engineering*, 60: 142–149.
- Li, M., Cheng, X., e Guo, H. (2013). Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. *Int Biodeter Biodegr*, 76, 81–85.
- Lowenstam, H.A. and Weiner, S. (1989). *On biomineralization*. Oxford University Press US, 324 p.
- Márquez, C. G. (1982). *Propiedades ingenieriles de los suelos*. Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.
- Martinez, B. C., DeJong J. T., Ginn T. R., Montoya B. M., Barkouki T. M., Hunt C., Tanyu B. e Major D. (2013). Experimental Optimization of Microbial-Induced Carbonate Precipitation for Soil Improvement, *Journal of geotechnical and geoenvironmental engineering*, 139: 587- 598.
- Mavroulidou M., Morgan N.L., Sibanda T., Serumaga M. e Rao Bhamidimarri. (2011). Innovative environmentally responsible techniques of ground improvement stimulating natural processes. *Proceedings of the 12th International Conference on Environmental Science and Technology*. Rhodes, Greece: A1210 - A1217.
- Mitchell, J.K. (1993) *Fundamentals of Soil Behavior*. 2nd Edition, John Wiley & Sons, Hoboken.

- Mitchell A.C e Ferris F.G. (2005) The coprecipitation of Sr into calcite precipitates induced by bacterial ureolysis in artificial groundwater: temperature and kinetics dependence. *Geochim Cosmochim Acta*, 69:4199–4210.
- Mitchell, J. K., & Santamarina, J. C. (2005). Biological Considerations in Geotechnical Engineering. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, ASCE.131: 1122-1233.
- Mortensen, B. M., Haber, M., DeJong, J. T., Caslake, L. F. e Nelson, D. C. (2011). Effects of environmental factors on microbial induced calcite precipitation. *J. Appl. Microbiol*, 111 (2): 338–349.
- Mobley, H., e Hausinger, R. (1989). Microbial ureases: Significance, Regulation and Molecular Characterisation. *Microbiol Rev*, 52(1), 85–108.
- Montoya, C., Márquez, M., López, J. & Cuervo, C. (2005). Caracterización de cristales de calcita bioprecipitada por un aislamiento nativo de *Bacillus subtilis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. vol VII, número 002, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, 19-25.
- Mujah, D., Shahin, M.A. e Cheng, L. (2017) State-of-the-Art Review of Biocementation by Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP) for Soil Stabilization, *Geomicrobiology Journal*, 34:6, 524-537.
- Ng,W.S, Lee, M.L., Tan, C.K., Hii, S.L. (2014). Factors affecting improvement in engineering properties of residual soil through microbial-induced calcite precipitation. *J. Geotech. Geoenviron. Eng.*, 140(5):4001-4006.
- Ozdogan, A. (2010). A study on the triaxial shear behavior and microstructure of biologically treated sand specimens (Master thesis). Faculty of the University of Delaware.
- Okwadha GDO e Li J. (2010) Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. *Chemosphere* 81:1143–1148.
- Palmeira, E. M. (2014). Notas de aula, Melhoria de Solos. Universidade de Brasília.
- Phillips, A. J., Gerlach, R., Lauchnor, E., Mitchell, A. C., Cunningham, A. B., e Spangler, L. (2013). Engineered applications of ureolytic biomineralization: a review. *Biofouling*, 296, 715–733.
- Ramachandran, S. K., Ramakrishnan, V. e Bang, S. S. (2001). Remediation of concrete using microorganisms. *ACI Mater. J*, 98 (1): 3–9.
- Rebata-Landa, V. e J. C. Santamarina. (2006). Mechanical limits to microbial activity in deep sediments, *Geochem. Geophys. Geosyst.*, 7, Q11006.
- Rebata-Landa, V. (2007). Microbial Activity in Sediments: Effects on Soil Behavior. (PhD thesis). Georgia Institution of Technology.

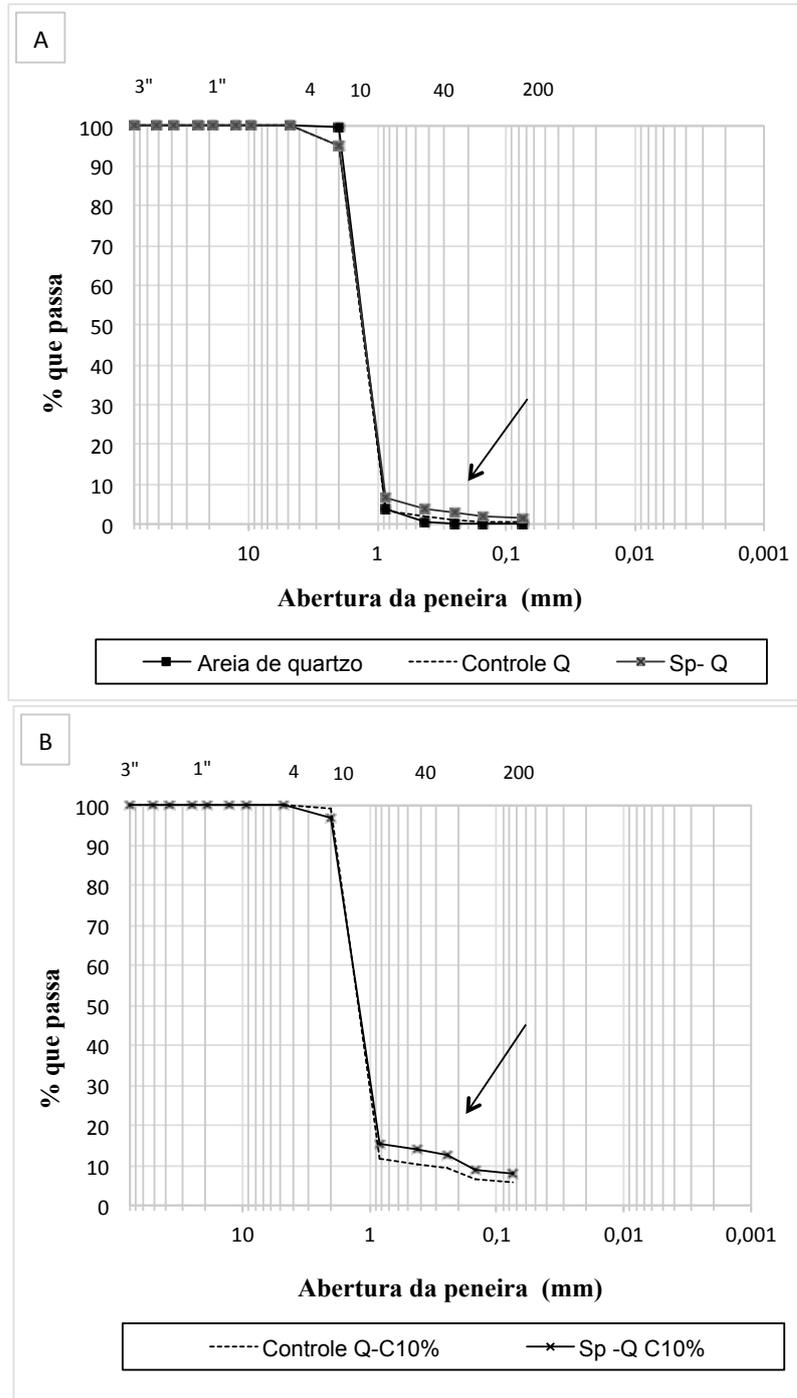
- Rivadeneira, M. A., Delgado, R., Moral, A., Ferrer, M. R., and Ramos-Cormenzana, A. (1994). Precipitation of calcium carbonate by *Vibrio* spp. from an inland saltern. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13:197–204.
- Rodríguez-Navarro, C., Jiménez-López, C., Rodríguez-Navarro, A., González-Muñoz, M. T., e Rodríguez-Gallego, M. (2007). Bacterially mediated mineralization of vaterita. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(5): 1197-1213.
- Rodríguez-Navarro, C., Jroundi, F., Schiro, M., Ruiz-Agudo, E. e González-Muñoz M.T. (2012). Influence of Substrate Mineralogy on Bacterial Mineralization of Calcium Carbonate: Implications for Stone Conservation. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (11): 4017–4029.
- Rowshanbakhta, K., Khamsehchiyana, M., Sajedib, Reza. e Reza M. (2016). Effect of injected bacterial suspension volume and relative density on carbonate precipitation resulting from microbial treatment. *Ecological Engineering*, 89: 49–55.
- Sarmast, M., Farpoor, M.H., Sarcheshmehpoor, M. e Eghbal, M.K. (2014). Micromorphological and biocalcification effects of *Sporosarcina pasteurii* and *Sporosarcina ureae* in sandy soil columns. *J. Agric. Sci. Technol.*, 16 (3): 681–693.
- Scholl MA, Mills AL, Herman JS, Hornberger GM. (1990). The influence of mineralogy and solution chemistry on the attachment of bacteria to representative aquifer minerals. *J. Contamin. Hydrol.* 6:321–336.
- Seifan, M., Samani, A.K. e Berenjian, A. (2017). New insights into the role of pH and aeration in the bacterial production of calcium carbonate (CaCO₃). *Appl Microbiol Biotechnol.*, 101:3131.
- Sensoy T., Bozbeyoglu N.N., Dogan N.M., Bozkaya O., e Akyol E. (2017). Characterization of Calcium Carbonate Produced by ureolytic bacteria (*Sporocarcina pasteurii* ATCC 6453 and *Bacillus aerius* U2) and Effect of Environmental Conditions on Production of Calcium Carbonate. *Proc: 15th International Conference on Environmental Science and Technology Rhodes, Greece*.
- Shaffer, G. (2010). Long-term effectiveness and consequences of carbon dioxide sequestration. *Nat. Geosci.*, 3: 464–467.
- Sharma, A. e Ramkrishnan, R. (2016). Study on effect of Microbial Induced Calcite Precipitates on strength of fine grained soils. *Perspectives in Science*, 8: 198—202.
- Shirakawa, M. A., Kaminishikawahara, K. K., Vanderley, M.J, Kahn, H. e Futai, M.M. (2011). Sand bioconsolidation through the precipitation of calcium carbonate by two ureolytic bacteria. *Materials Letters*, 65: 1730–1733.
- Shirakawa, M. A., Cincotto, A., Atencio, D., Gaylarde, C. e Vanderley, M.J. (2011b). Effect of culture medium on biocalcification by *pseudomonas putida*, *lysini bacillus sphaericus* and *bacillus subtilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 499-507.

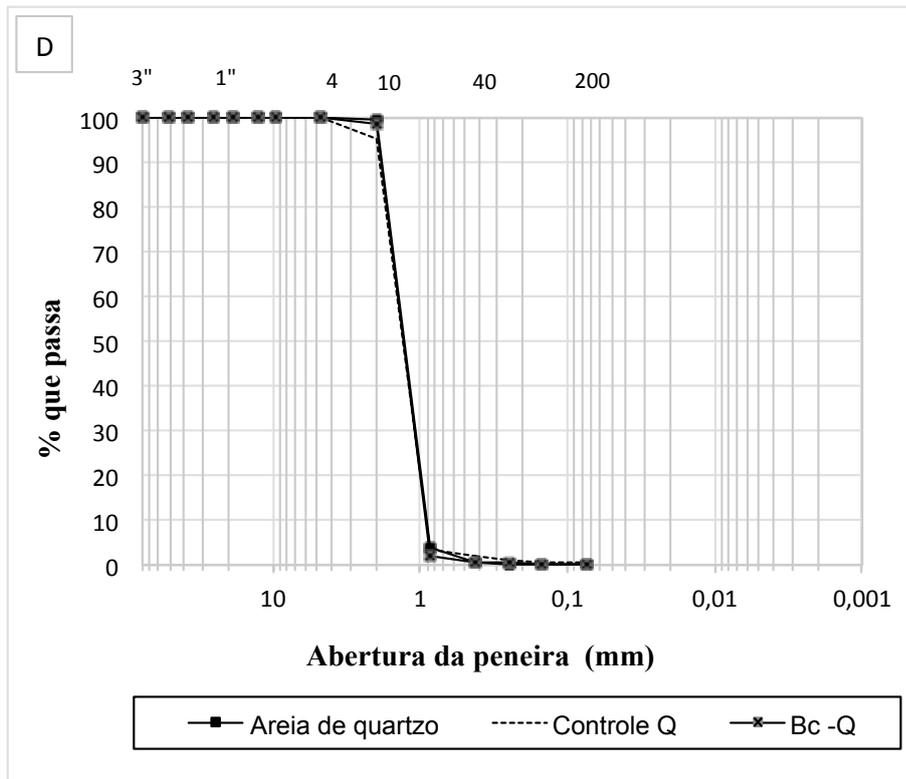
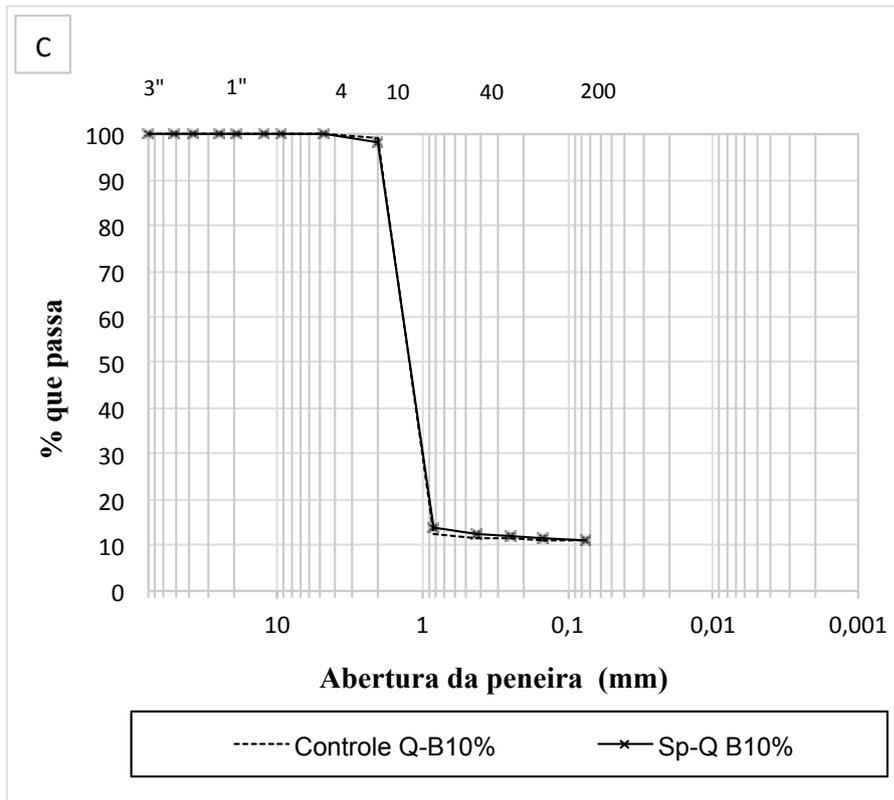
- Sondi, I. e Matijević, E. (2001). Homogeneous Precipitation of Calcium Carbonates by Enzyme Catalyzed Reaction. *Journal of Colloid and Interface Science*, 238: 208–214.
- Soon, N.W., Lee, L.M., Khun, T. C. e Ling, H. S. (2013). Improvements in engineering properties of soils through Microbial-Induced Calcite Precipitation. *KSCE J. Civil Eng.*, 17 (4): 718–728.
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K. e Bang, S. S. (1999). Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biol. Biochem.*, 3 (11): 1563 – 1571.
- Stuart, B. H. (1997). *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*, ACOL Series, Wiley, Chichester, UK. 191 p.
- Sukumaran, A. e Poulouse, E. (2018). Effect of biogrouting in improving soil properties- A review. *International Journal of Development Research*, 8 (03): 19548-19551.
- Terzagui, K. e Peck, R. (1980). *Mecánica de suelos en la ingeniería práctica*. Editorial El Ateneo, Barcelona, España.
- Terzis, D., Bernier-Latmani, R. e Laloui, L. (2016). Fabric characteristics and mechanical response of bio-improved sand to various treatment conditions. *Géotechnique Letters*, 6: 50-57.
- Tiano, P., Biagiotti, L. e Mastromei, B. (1999). Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *Journal of microbiological methods*, 36: 139-145.
- Tsukamoto, M., Inagaki, T., Sasaki, Y. e Oda, K. (2013). Influence of relative density on microbial carbonate precipitation and mechanical properties of sand. In: *Proceedings of the 18th International Conference on Soil Mechanics and Geotechnical Engineering*, Paris.
- Trushina D., Bukreeva T., Kovalchuk M. e Antipina M. (2014). CaCO₃vaterita microparticles for biomedical and personal care applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, 56:644-658.
- United States Department of Agriculture. (2004). *Soil survey laboratory methods manual*. Rebeca Burt, Editor. Soil Survey Investigations Report No 42. Version 4.0. Washington DC, USA, 700p.
- United States Department of Agriculture. (2017). *Soil survey manual*. C. Ditzler, K. Scheffe, and H.C. Monger (eds.). Handbook 18. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Valencia, Y. (2009). *Influência da biomineralização nas propriedades físicas e mecânicas de um perfil de solo tropical afetado pela erosão*. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

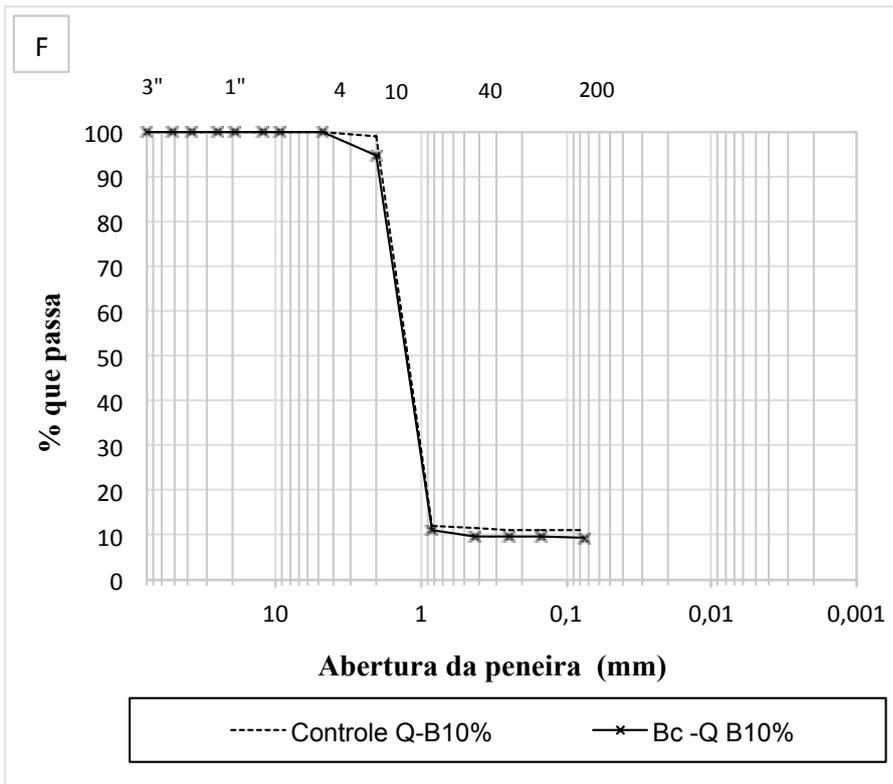
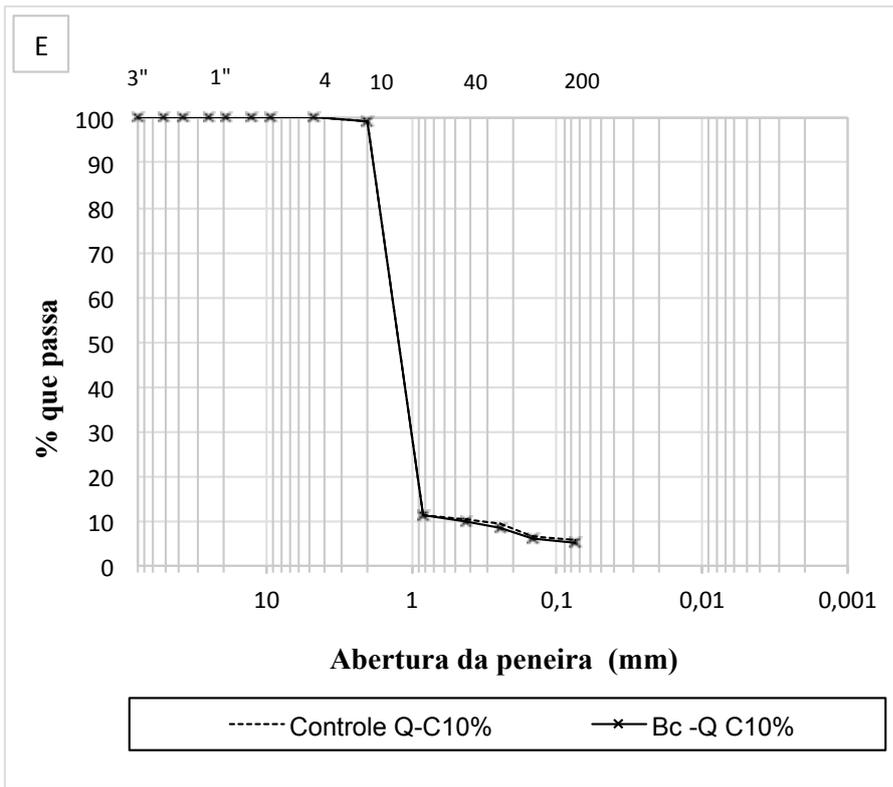
- Valencia, Y., Santana, A. e Camapum de Carvalho, J. (2014). Bactérias nativas indutoras de precipitação de minerais de carbonato de cálcio em solos tropicais. *Revista da Sociedad Venezolana de Microbiología*, 34:15-21.
- Valencia, Y., Camapum de Carvalho, J. e Lara, L.A. (2015). Influence of biomineralization on a profile of a tropical soil affected by erosive processes. *DYNA*, [S.l.], 82 (192):221-229.
- Van der Marel HW, Beutelspacher H. (1976). *Atlas of Infrared Spectroscopy of Clay Minerals and their Admixtures*. Elsevier Scientific Publisingh Co. 396 p.
- Van Paassen, L. A. (2009). Biogrout, ground improvement by microbially induced carbonate precipitation. Doctoral dissertation, Department of Biotechnology, Delft University of Technology, the Netherlands.
- Van Paassen, L.A, Harkes, M., Van Zwieten, A.A, Van der Zon, W.H., Van der Star, W.R.L, Van Loosdrecht, M.C.M. (2009). Scale up of BioGrout: a biological ground reinforcement method. Proc. of the 17th International Conference on Soil Mechanics and Geotechnical Engineering 2328 M. Hamza et al. (Eds.).2328-2333.
- Van Paassen, L.A, Ghose, R., Van der Linden, T.J.M., Van der Star, W.R.L e Van Loosdrecht, M.C.M. (2010). Quantifying Biomediated Ground Improvement by Ureolysis: Large-Scale Biogrout Experiment. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 136 (12):1721-1728.
- Van Paasen, L.A. (2011). Bio-mediated ground improvement: From laboratory experiment to pilot applications. Proc: *Geo-Frontiers 2011*, ASCE: 4099-4108.
- Warren, L. A., Maurice, P. A., Parmar, N., e Ferris, F. G. (2001). Microbially mediated calcium carbonate precipitation: implications for interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants. *Geomicrobiol J*, 18: 93–115.
- Wang, Z., Zhang, N., Ding, J., Lu, C. e Jin, Y. (2018). Experimental Study on Wind Erosion Resistance and Strength of Sands Treated with Microbial-Induced Calcium Carbonate Precipitation. *Advances in Materials Science and Engineering*, Article ID 3463298, 10 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/3463298>.
- Weiner, S. e Dove, P. (2003). An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54 (1):1-29.
- Whiffin, V. S. (2004). Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement (PhD thesis). Perth: Murdoch University, Western Australia.
- Whiffin, V. S., Van Paassen, L. A. e Harkes, M. P. (2007). Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiol. J.*, 24 (5): 417–423.
- Zapata, C., Houston, W., Houston, S. and Walsh, K. (2000). Soil-Water Characteristic Curve Variability. *GeoDenver 2000. Advances in Unsaturated Geotechnics*. Pp. 84-124.

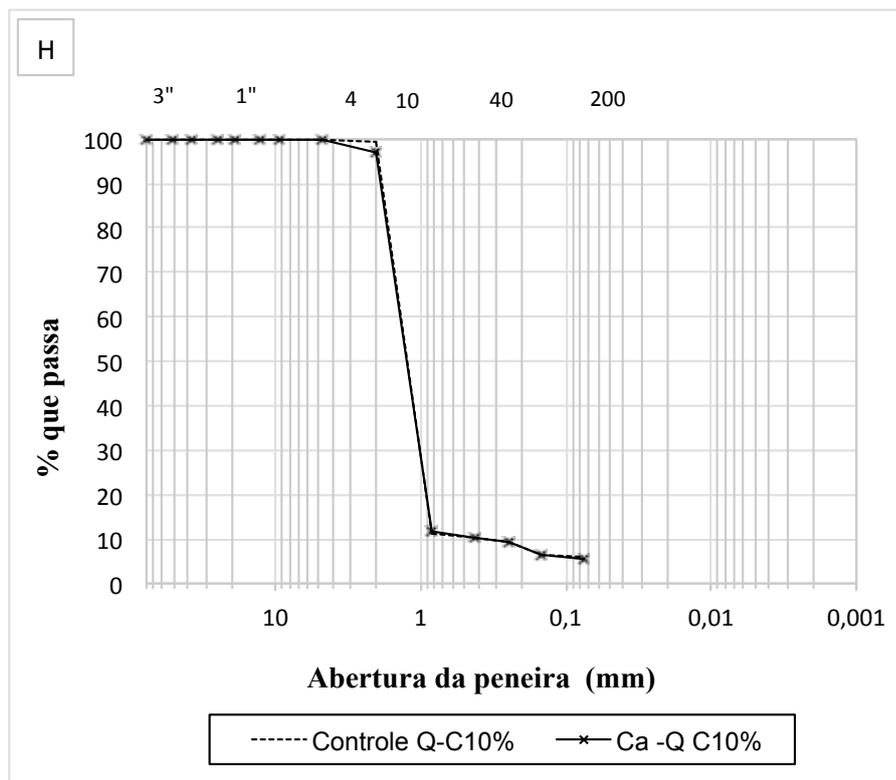
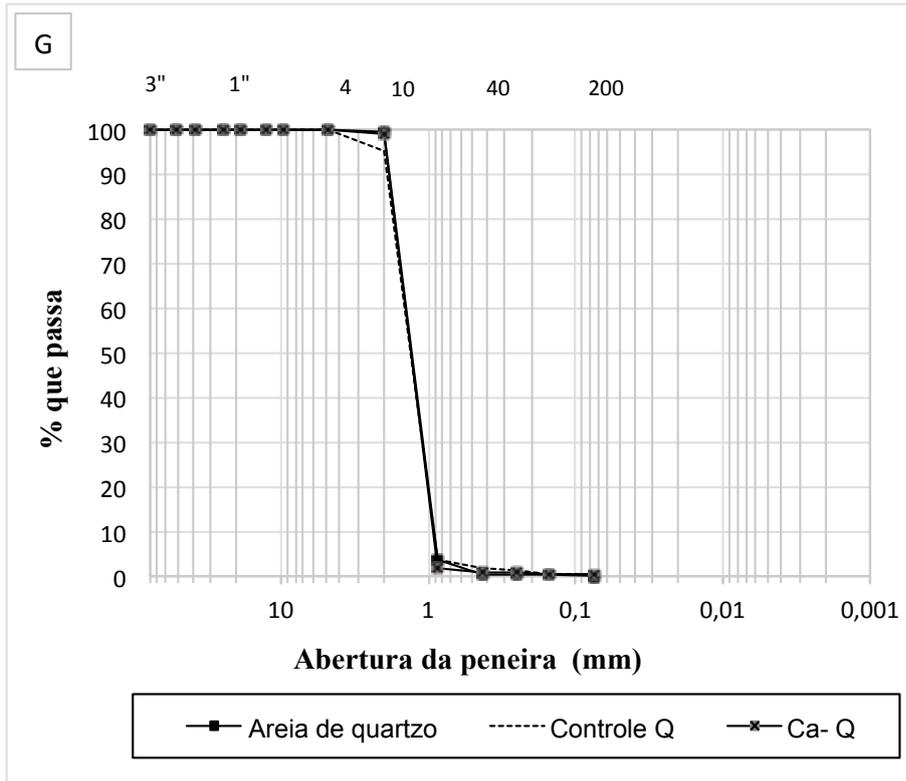
APENDICE A.

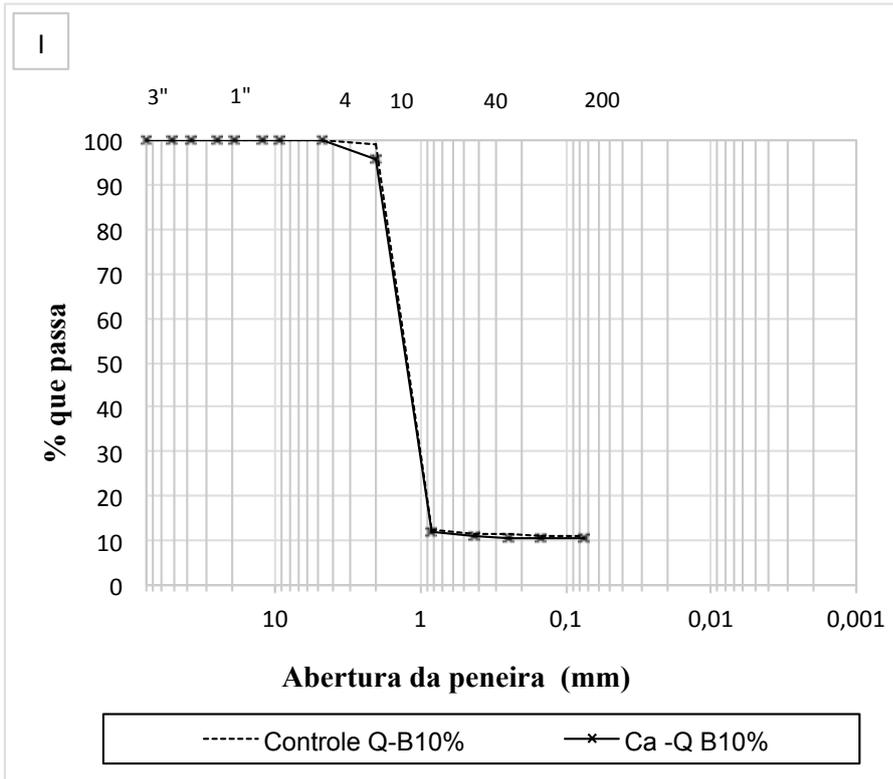
CURVAS DAS ANÁLISES GRANULOMÉTRICAS DAS AMOSTRAS NOS ENSAIOS DE BIOCIMENTAÇÃO DE SOLOS.











APENDICE B.

RESULTADOS PH DOS SOLOS, DAS AMOSTRAS, NOS ENSAIOS DE BIOCIMENTAÇÃO DE SOLOS.

Solo	pH (KCl)	pH (H ₂ O)	Denominação (do pH em KCl)
Q	8,2	8,5	Moderadamente alcalino
Controle Q rep	8,1	8,2	Moderadamente alcalino
<i>Sp - Q</i>	9,4	9,3	Muito fortemente alcalino
<i>B.c - Q</i>	7,8	8,4	Ligeiramente alcalino
<i>C.a - Q</i>	9,3	9,1	Muito fortemente alcalino
Q - C 2%	7,3	7,6	Neutro
Controle Q - C 2%	8,0	7,9	Moderadamente alcalino
<i>Sp Q - C 2%</i>	9,7	9,7	Muito fortemente alcalino
Q - C 10%	8,0	6,3	Moderadamente alcalino
Controle Q- C 10%	7,7	7,7	Ligeiramente alcalino
<i>Sp Q - C 10%</i>	9,4	9,5	Muito fortemente alcalino
<i>B.c Q- C 10%</i>	8,8	8,5	Fortemente alcalino
<i>C.a Q- C 10%</i>	9,2	9,0	Muito fortemente alcalino
Q - B 2%	9,3	9,9	Muito fortemente alcalino
Controle Q-B 2%	8,3	8,5	Moderadamente alcalino
<i>Sp Q - B 2%</i>	9,3	9,4	Muito fortemente alcalino
Q- B 10%	9,2	10,5	Muito fortemente alcalino
Controle Q-B 10%	8,0	8,2	Moderadamente alcalino
<i>Sp Q - B 10%</i>	9,1	9,1	Muito fortemente alcalino
<i>B.c Q- B 10%</i>	8,1	8,4	Moderadamente alcalino
<i>C.a Q- B 10%</i>	8,2	8,4	Moderadamente alcalino
Q fino	8,4	9,0	Moderadamente alcalino
<i>Sp Qfino</i>	9,0	8,8	Fortemente alcalino

CALCULO DA DIFERENÇA DE PH (Δ pH) E OPONTO DE CARGA ZERO (PCZ) DAS AMOSTRAS, NOS ENSAIOS DE BIOCIMENTAÇÃO DE SOLOS.

Solo	Δ pH	PCZ
Q	-0,3	7,9
Controle Q rep	-0,2	7,9
<i>Sp</i> - Q	0,1	9,5
<i>B.c</i> - Q	-0,5	7,3
<i>C.a</i> - Q	0,1	9,4
Q - C 2%	-0,3	7,0
Controle Q - C 2%	0,1	8,1
<i>Sp</i> Q- C 2%	0,0	9,7
Q - C 10%	1,7	9,7
Controle Q- C 10%	0,0	7,7
<i>Sp</i> Q- C 10%	-0,1	9,4
<i>B.c</i> Q- C 10%	0,3	9,1
<i>C.a</i> Q- C 10%	0,2	9,4
Q - B 2%	-0,6	8,7
Controle Q-B 2%	-0,2	8,0
<i>Sp</i> Q - B 2%	-0,1	9,1
Q- B 10%	-1,4	7,8
Controle Q-B 10%	-0,2	7,8
<i>Sp</i> Q - B 10%	0,0	9,2
<i>B.c</i> Q- B 10%	-0,3	7,8
<i>C.a</i> Q- B 10%	-0,1	8,1
Q fino	-0,6	7,8
<i>Sp</i> Qfino	0,2	9,2

APENDICE C.

CARBONATO DE CÁLCIO PRECIPITADO NAS AMOSTRAS, DOS ENSAIOS DE BIOCIMENTAÇÃO DE SOLOS, UTILIZANDO MÉTODO GRAVIMÉTRICO (PERDA DA MASSA POR HCL)

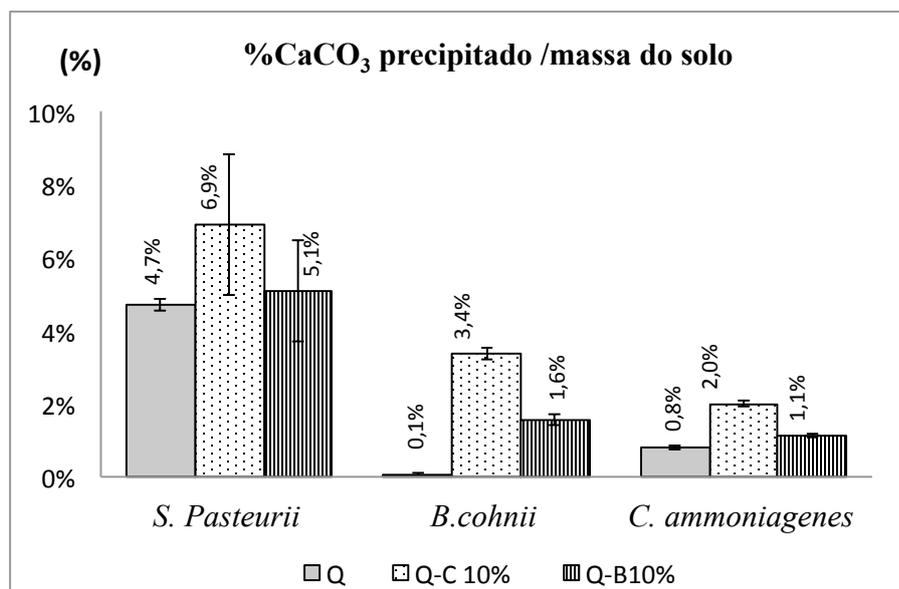


Figura C.1. Carbonato de cálcio precipitado (g/g) na matriz dos solos, utilizando *S. pasteurii*, *B. cohnii* e *C. ammoniagenes* e amostras de Q, Q-C 10% e Q-B 10%.

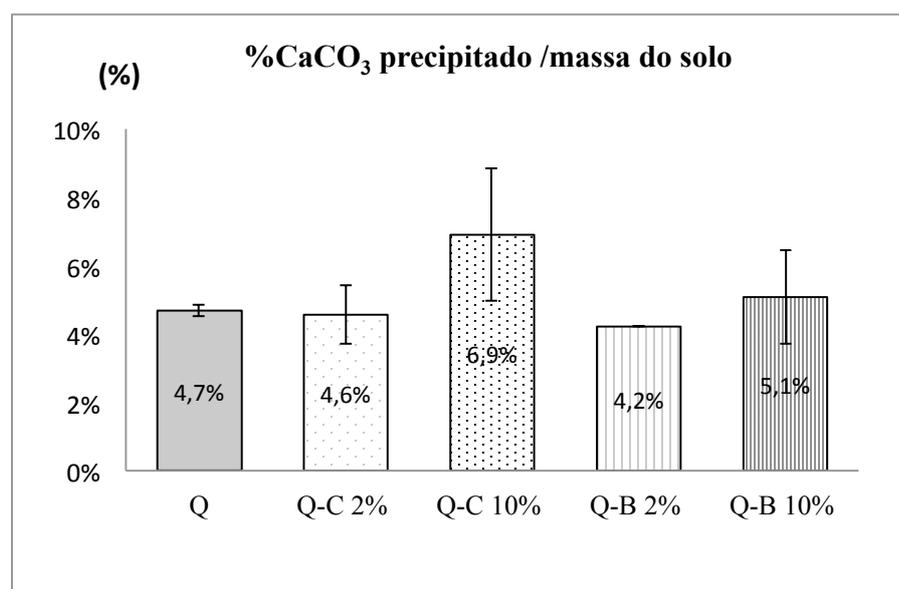


Figura C.2. Carbonato de cálcio precipitado (g/g) na matriz dos solos: Q e as diversas misturas Q-C e Q-B, utilizando *S. pasteurii*.

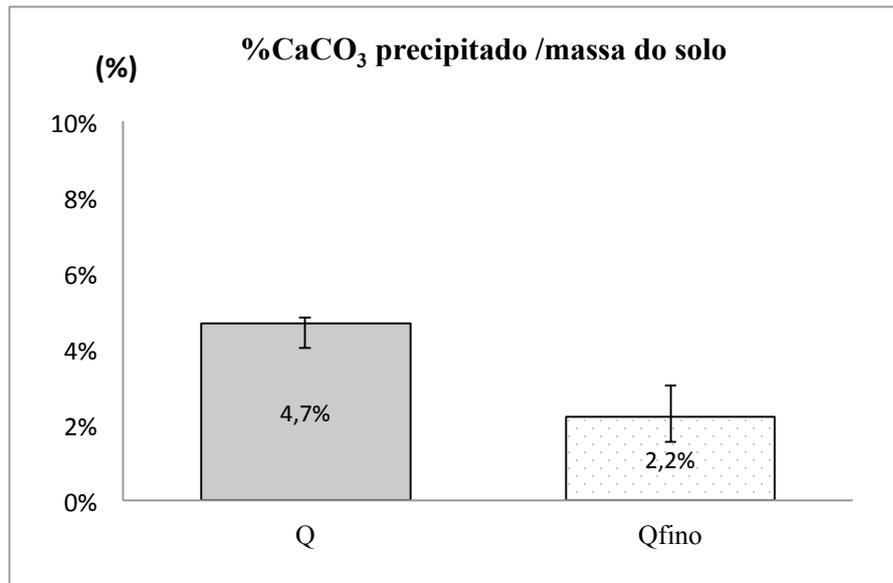


Figura C.3. Carbonato de cálcio precipitado (g/g) na matriz dos solos: Q e Q fino, utilizando *S. pasteurii*.

