

## BIOCIMENTAÇÃO EM ARGAMASSA POZOLÂNICA CONTENDO MICRORGANISMOS EM MATERIAL ORGÂNICO VEGETAL

JUPIRA ALMEIDA<sup>1</sup>, ANTONIO THOMÉ<sup>1</sup>, FABIANA TONIAL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Passo Fundo

<jupalm67@gmail.com>, <thome@upf.br>, <fabianatonial@upf.br>  
10.21439/conexoes.v17i0.2873

**Resumo.** A produção de cimento para o uso na construção civil tem gerado problemas socioambientais, portanto estratégias ecologicamente sustentáveis precisam ser desenvolvidas e implementadas. Em busca dessas soluções, pesquisadores têm utilizado microrganismos em misturas de materiais cimentícios buscando diminuir o uso do cimento Portland. Os microrganismos que produzem a enzima urease são capazes de metabolizar o cálcio quando disponível no meio e produzir calcita, que garante resistência aos materiais. Entretanto, a manutenção da viabilidade dos microrganismos e de sua bioatividade para posterior uso como um material de construção é um obstáculo. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de armazenamento de um isolado de *Bacillus* sp. em biomassa vegetal e, posteriormente verificar as influências mecânicas deste material em argamassa de metacaulim sem adição de cimento Portland. Para isso, um isolado de *Bacillus* foi acondicionado em substrato de ervilhaca (*Vicia villosa* Roth) e, após revitalização, adicionado à mistura pozolânica sem cimento em dois traços diferentes. Os testes conduzidos comprovaram a eficiência da biomassa vegetal como mecanismo de armazenamento do microrganismo. A bactéria manteve sua capacidade de revitalização mesmo após o período de cura da argamassa. Foi desenvolvido um material de baixo custo, fácil manuseio e sustentável.

**Palavras-chaves:** Biocimentação. Bioargamassa. Material orgânico. *Bacillus* sp.. Metacaulim.

## BIOCIMENTATION IN POZOLAN MORTAR CONTAINING MICROORGANISMS IN VEGETABLE ORGANIC MATTER

**Abstract.** The production of cement has generated socio-environmental problems, so ecologically sustainable strategies need to be developed. In search of solutions, researchers used microorganisms in mortar mixtures in to reduce the use of cement. The microorganisms that metabolize calcium when available in the medium and produce calcite, guaranteeing resistance to materials. However, maintaining the viability of their bioactivity for later use as a building material is an obstacle. Therefore, the objective of this work was to evaluate the storage potential of a *Bacillus* in vegetal biomass, and verify the mechanical influences of this material in mortar with metakaolin instead of Portland cement. For this, the microorganisms were placed in vetch substrate. After revitalization, were added to pozzolanic mixture in two different traits. The tests conducted proved the efficiency of biomass storing the microorganism. The bacterium maintained its ability to after the mortar cured. A low-cost, easy-to-handle and sustainable material was developed.

**Keywords:** Biocementation. Biomineralization. Biomortar. Biomass. *Bacillus* sp.. Metakaolin

### 1 INTRODUÇÃO

Os grandes impactos ecológicos resultantes da produção de cimento causam a demanda de soluções de produção mais limpas, viáveis e baratas na indústria da construção. Portanto, materiais pozolânicos comple-

mentares como metacaulim e sílica de casca de arroz têm sido usados como uma substituição parcial para o cimento em materiais de construção. As reações pozolânicas acontecem de maneira mais lenta do que as reações químicas no cimento, resultados observados na li-

temperatura encontram-se na faixa entre 90 e 180 dias (SELVARANJAN et al., 2021; VERMA et al., 2015; YU et al., 2021; SOW et al., 2021; SANTOS; CORDEIRO, 2021). Os teores de substituição de materiais pozolânicos como aglomerantes, variam entre 10% (AHMED et al., 2020) e 45% em seu teor ótimo, apresentando baixas de resistência mecânica quando passam deste patamar. As maiores porcentagens de materiais pozolânicos apresentadas na bibliografia foram reportadas por (DANG; DU; PANG, 2020), que ensaiaram traços com até 60% de substituição de cimento por metacaulim em argamassa

O solo em toda a superfície terrestre contém microrganismos que desempenham papel fundamental para o balanço químico do mesmo (KÜMMERER, 2004). Vários destes microrganismos presentes no solo são produtores de uma enzima chamada urease. A urease catalisa a hidrólise do substrato de ureia para formar dióxido de carbono e amônia, precipitando carbonato de cálcio (SYLVIA et al., 2005). A precipitação de carbonato microbiologicamente induzida (MICP) é uma extensão da mineralização induzida biologicamente, que se refere à formação de cristais de carbonato à base de calcita por microrganismos produtores de urease através de seu próprio metabolismo (HAMDAN et al., 2017; MOKHTAR et al., 2021; INTARASOONTRON et al., 2021; FENG et al., 2021). Os microrganismos produtores de urease são capazes de precipitar calcita na presença de ureia e fontes de cálcio, podendo ser utilizados em materiais de construção para melhoramento de propriedades mecânicas. Este tipo de microrganismo já teve eficiência comprovada para aumento de resistência em argamassas, concretos e solos (KHUSHNOOD et al., 2020; LIU; SHAO; HUANG, 2021; SUN et al., 2021; SANDALCI; TEZER; BUNDUR, 2021; CHENG; CORDRUWISCH, 2013; PARK et al., 2022). Entretanto, a produção e uso destes microrganismos requer condições específicas, impossibilitando que sejam armazenados para posterior uso como verdadeiros materiais de construção. (BANACH-WIŚNIEWSKA et al., 2021). A disposição dos microrganismos em biomassa é uma alternativa de armazenamento e uma forma de disponibilização da bactéria aos usuários finais, reduzindo o custo de produção e a viabilidade de transporte e manuseio (AMEEN et al., 2021; GUPTA; KUA; PANG, 2018). Diante disto, a presente pesquisa teve o objetivo principal de avaliar o potencial de armazenamento de microrganismos em biomassa de origem vegetal, para uso em processos de biocimentação de misturas em materiais de construção, ao mesmo tempo, como objetivos secundários, testar o poder cimentante deste novo material em mistura pozolânica, contendo metacaulim em

substituição total ao cimento Portland.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização dos ensaios foram utilizados materiais previamente testados em estudos anteriores. Os materiais utilizados nas misturas da argamassa e da bioargamassa (contendo microrganismos) foram o metacaulim, o calcário calcítico (material agregado a mistura como fonte de cálcio para o metabolismo bacteriano), a cal hidráulica e a areia. As Tabelas 1a e 1b apresenta as caracterizações física e química dos materiais aglomerantes. A Tabela 3 apresenta os indicadores de pozolanidade do metacaulim, de acordo com prescrição da ABNT NBR 12653:2014.

Para a produção da biomassa foi utilizado um substrato orgânico, a ervilhaca, uma leguminosa de espécie *Vicia villosa* Roth obtida de um produtor rural local, caracterizada quimicamente no Laboratório de Análises de Solos, Adubos, Plantas e Outros Materiais, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (Tabela 4). Para revitalização da biomassa foi utilizada Ureia Fertilizante 45% Nitrogênio.

### 2.1 Caracterização do microrganismo

O microrganismo utilizado nos experimentos foi isolado do solo de uma área experimental localizada no Centro Tecnológico de Engenharia Civil (CETEC), Campus I, da Universidade de Passo Fundo, nas coordenadas geográficas 22 J 0363961 UTM 6876967, altitude 694 metros (ALMEIDA et al., 2018). Dentre os microrganismos isolados, um foi selecionado como o de maior potencial para fins do trabalho, por ensaios de urease pelo método de Reis (2017) e a quantificação de carbonato de cálcio, seguindo o protocolo de Bhaduri et al. (2016). Para o microrganismo selecionado, a curva de atividade enzimática foi construída para definir a melhor condição de tempo e pH para a bioatividade desejada no material. A identidade da bactéria selecionada para os ensaios e denominada J3UPF foi obtida pelo sequenciamento do gene 16S apresentando 99,96% de identidade (1388/1389 bases) com *Bacillus megaterium*.

### 2.2 Produção da biomassa

Primeiramente, uma solução do microrganismo *Bacillus* J3UPF foi preparada a partir de colônias mantidas em ágar TSA (*Tryptic Soy Agar*) com ureia. Com elas foram inoculados 10 erlenmeyers contendo 100 mL de caldo nutritivo, os quais foram mantidos em mesa agitadora orbital a 497 rpm sob temperatura ambiente

**Tabela 1:** Caracterização física e química dos materiais

**Tabela 1a – Caracterização física materiais**

Caracterização	Propriedades	Materiais		
		Metacaulim	Cal Hidráulica	Calcário Calcítico
Física	Massa unitária (kg/dm <sup>3</sup> )	0,65	0,89	1,84
	Massa específica (kg/dm <sup>3</sup> )	2,56	2,42	2,72
	Finura – retido # 200 (%)	2,52	6,83	81,5
	pH em pasta	6,4	12,9	10,6

**Tabela 1b – Caracterização química dos materiais**

Caracterização	Propriedades	Materiais		
		Metacaulim	Cal Hidráulica	Calcário Calcítico
Química (%)	SiO <sub>2</sub>	55,64	24,91	10,52
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	37,04	8,89	4,43
	Fe <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,24	3,18	3,32
	TiO <sub>2</sub>	1,81	0,43	0,59
	K <sub>2</sub> O	1,73	1,14	0,91
	MgO	1	26,5	2,1
	CaO	0,12	33,88	77,29

**Tabela 2:** Caracterização física da areia e do calcário calcítico

	Abertura da peneira (mm)	Porcentagem retida (em massa)	
		Areia	Calcário calcítico
Composição granulométrica (NBR 7217)	4,75	0	0
	2,36	1	0
	1,18	3	3
	0,6	16	21
	0,3	41	27
	0,15	26	22
	0,075	13	27
Dimensão máxima característica (mm)		1,18	1,18
Módulo de finura		1,74	1,49
Massa unitária (kg/dm <sup>3</sup> )		1,71	1,84
Massa específica (kg/dm <sup>3</sup> )		2,29	2,72
Materiais pulverulentos (%)		6,16	1,57

até atingir a absorvância de 0,063 (OD 600nm), equivalente a concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL segundo os padrões de McFarland. Paralelamente, a ervilhaca (*Vicia villosa* Roth) foi seca em estufa a uma temperatura de 40 °C e triturada mecanicamente. Em seguida, o material orgânico foi misturado com a solução bacteriana na proporção de 12,5 g para 250 mL. Então, mistura foi seca a temperatura de 27 °C sendo revolvida diariamente. Depois de seca a peso constante, a biomassa foi ensacada e armazenada a temperatura ambiente (entre 15 e 25°C) em local seco e protegido do sol.

### 2.3 Produção da argamassa e bioargamassa

A biomassa foi revitalizada após 30 dias de armazenamento para substituir a água na produção da argamassa. A revitalização foi realizada com 15 g da biomassa produzida em 300 mL de água e 8 g de ureia fertilizante (45% N) em banho-maria a temperatura de 30 °C por 3 horas, sendo homogeneizada a cada 30 minutos. Ao final das 3 horas a biomassa foi filtrada e o líquido foi adicionado aos demais materiais da argamassa, compondo a bioargamassa. Com esse protocolo, a concentração bacteriana variou entre  $3 \times 10^5$  UFC/g a  $4 \times 10^5$  UFC/g, conforme contagem de placas realizada em triplicata, durante a revitalização. O pH alcançado no processo final de revitalização foi de 9,0.

**Tabela 3:** Indicadores de pozolanidade (NBR 12653:2014) - Metacaulim

Requisitos químicos	Propriedades	Classe de material pozolânico	Método de ensaio*	Resultado
		N		
	SiO <sub>4</sub> + Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	≥ 70%	FRX**	94,92%
	So <sub>3</sub>	≤ 4%	FRX**	0,08 %
	Teor de umidade	≤ 3%	ABNT NBR NM 24	0,2 %
	Perda de fogo	≤ 10%	ABNT NBR NM 18	3,15 %
	Álcalis disponíveis em Na <sub>2</sub> O	≤ 1,5%	ABNT NBR NM 25	Não realizado
* Os métodos de ensaios devem ser adaptados, substituindo o cimento Portland pelo material pozolânico				
** Fluorescência de Raio-X				
Requisitos físicos	Propriedades	Classe de material pozolânico	Método de ensaio	Resultado
		N*		
	Material retido na peneira 45 µm	< 20%	ABNT NBR 15894-3	13,75%
	Índice de desempenho com cimento Portland aos 28 dias, em relação ao controle	≥ 90%	ABNT NBR 5752	201,15%
	Atividade pozolânica com cal aos sete dias	≥ 6 MPa	ABNT NBR 5751	24,1 MPa
* Classe N: pozolanas naturais e artificiais que obedeçam aos requisitos desta Norma, como certos materiais vulcânicos de caráter petrográfico ácido, cherts silicosos, terras diatomáceas e argilas calcinadas.				

**Tabela 4:** Composição química da ervilhaca (*Vicia villosa* Roth)

(%)						(mg/kg)					% (m/m)
N	P	K	Ca	Mg	S	Zn	Cu	Mn	Fe	B	Carbono orgânico
3,98	0,38	3,01	1,23	0,31	0,16	52,58	7,97	93,14	1023,49	32,77	35,08

Os materiais usados para compor a argamassa foram metacaulim como ativador pozolânico, a cal hidráulica como ativador alcalino (GRANIZO et al., 2002), e o calcário calcítico como fonte de cálcio adicional. O calcário calcítico e a cal hidráulica forneceram cálcio ao meio metabólico. Os traços utilizados foram 1:1,5:2:6 e 1:1,5:2:8 (metacaulim: calcário calcítico: cal hidráulica: areia) calculados seguindo o método CIENTEC (RECENA, 2012) adaptado. Para cada traço foram moldados dois conjuntos de corpos de prova, compondo de 15 amostras cada, um com argamassa, sendo definido como referência (REF) onde não continha microrganismo, e outro denominado bioargamassa (BIO), contendo o isolado J3UPF. Foram realizados ensaios de propriedades no estado fresco e endurecido, conforme fluxograma da Figura 1. Cada amostra possui seção transversal e dimensões de 4x4x16mm, conforme ABNT NBR 13279:2005.

Também foram conduzidos os ensaios de Fluorescência de Raio X (FRX) para analisar a composição elementar da mistura, Difração de Raio X (DRX) para quantificar as fases cristalinas formadas no processo de

cura, e Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para identificar as bandas das principais ligações químicas presentes.

## 2.4 Análise de Difração de Raio X (DRX)

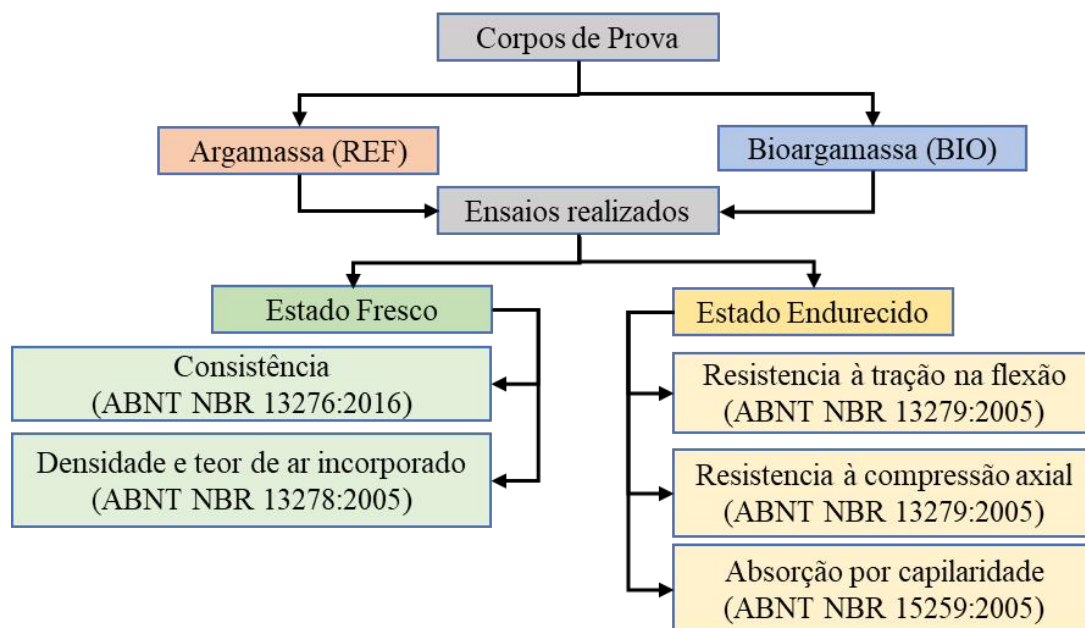
A análise de DRX foi realizada no Centro Tecnológico de Pedras, Gemas e Joias do Rio Grande do Sul, no município de Soledade.

Os resultados obtidos na análise de Difractometria de raios X foram tratados no software *Diffraç Eva* versão 5.0. Utilizou-se a base de dados *Crystallography Open Database Inorganic* (CHATEIGNER, 2019) para efetuar o cruzamento de picos e identificação de minerais, juntamente com análise semi-quantitativa de distribuição das fases identificadas na amostra, realizada em função da altura e da contagem de picos para cada fase mineral identificada.

## 2.5 Ensaio de Fluorescência de Raio X (FRX)

O ensaio de FRX foi realizado no Laboratório de Análises e Identificação de Materiais (LAIM) do Centro

**Figura 1:** Tela de menu principal (a), tela de acesso aos conteúdos (b), Tela de seleção de questões (c) e tela resolução de exercício (d).



Tecnológico de Pedras, Gemas e Joias do Rio Grande do Sul, no município de Soledade, onde para as análises foram confeccionadas pastilhas com a amostra em pó mais o aditivo Wax Panalytical®, nas proporções de 8:2, na Prensa Manual Fluxana a 25 ton. Após foram colocadas em amostradores, no equipamento S2 – Ranger – Bruker, sendo utilizado o método *Equa\_Oxides* para as análises. Para obtenção da análise química semi-quantitativa, o espectro gerado a partir da amostra foi avaliado pelo *software Spectra EDX* sem curva de calibração específica.

## 2.6 Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Foi realizada a identificação dos grupos funcionais no Parque Científico e Tecnológico UPF (UPFPARQUE), da Universidade de Passo Fundo - RS, através da análise de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR (modelo *Cary 630*, *Agilent Technologies*), utilizando a técnica de Refletância Total Atenuada - FTIR/ATR. As amostras foram analisadas por espectroscopia no infravermelho, nos números de onda de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , escaneado 48 vezes cada espectro com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , e o processamento dos espectros foi realizado com o *software MicroLab versão B.5* (*Agilent Technologies*).

## 2.7 Avaliação da manutenção da atividade biológica da bioargamassa

Para testar a eficácia da bioargamassa em manter a atividade do microrganismo, após a ruptura das amostras as mesmas foram moídas e diluídas em água. Em seguida, 0,1 mL da solução foi transferida para placas de petri contendo ágar ureia Christensen, as quais foram incubadas em estufa na temperatura de 25°C, sendo analisada a cada 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

## 2.8 Custo de produção da biomassa

Para confirmar o enfoque da biomassa ser um produto de baixo custo, foi realizado o levantamento do custo de produção da biomassa, desde a obtenção do microrganismo até o armazenamento. O custo para produzir 1 kg de biomassa é de R\$ 150,00 (referência março de 2022), obtidos a partir dos materiais e serviços utilizados na pesquisa.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados de consistência, densidade de massa e teor de ar incorporado dos corpos de prova produzidos estão apresentados na Tabela 5.

As amostras contendo o microrganismo apresentaram valores de densidade menores quando comparadas aos corpos de provas sem adição de bactérias devido ao peso específico da solução bacteriana revitalizada, a

**Tabela 5:** Propriedades das amostras no estado fresco

Traço	Consistência (mm)	Densidade no estado fresco (g/cm <sup>3</sup> )	Teor de ar incorporado (%)	Relação água/materiais secos (%)
1:2:1,5:6 (REF)	255,00	2,09	5,75	17
1:2:1,5:6 (BIO)*	251,00	1,97	5,06	16
1:2:1,5:8 (REF)	265,00	2,07	5,49	17
1:2:1,5:8 (BIO)*	264,00	1,95	5,17	16

\* Amostras contendo o microrganismo *Bacillus J3UPF*

qual foi de 1,15 g/cm<sup>3</sup>, pouco acima do peso específico da água. O teor de ar incorporado reduzido nas amostras contendo *Bacillus J3UPF* é atribuído à viscosidade da solução bacteriana com presença de material orgânico.

### 3.1 Ensaios no estado endurecido

Após confeccionado os corpos de provas das amostras de argamassa e bioargamassa, foram realizados ensaios de resistência mecânica, absorção de água e coeficiente de capilaridade.

#### 3.1.1 Resistência mecânica

As amostras foram rompidas aos 28 dias, testando resistências à tração na flexão e à compressão axial, sendo os resultados apresentados na Figura 2.

Os testes verificaram que as resistências do traço 1:1,5:2:6 foram superiores às do traço 1:1,5:2:8. Além disso, o traço 1:1,5:2:6 contendo *Bacillus J3UPF* (BIO) apresentou um leve aumento de resistência em comparação com sua referência (REF). Os acréscimos no traço 1:1,5:2:6 foram de 14,93% à tração e de 3,69% à compressão. O traço 1:1,5:2:8, por outro lado, apresentou decréscimo de 9,81% à tração e 22,33% à compressão nas amostras contendo o microrganismo.

Após análise estatística de normalidade das amostras, feita pelo teste de Shapiro-Will, sugerem que, tanto a tração como a compressão, os resultados são anormais, pois  $p > 0,05$ . Quanto ao teste de Tukey, apresentado na Tabela 6, sugerem diferença estatística das médias de tração com intervalo de confiança de 99,9% entre os traços: 1:1,5:2:6 (BIO) - 1:1,5:2:8 (BIO); 1:1,5:2:6 (BIO) - 1:1,5:2:8 (REF); 1:1,5:2:6 (REF) - 1:1,5:2:8 (BIO) e 1:1,5:2:6 (REF) - 1:1,5:2:8 (REF). Já para a compressão, com o mesmo intervalo de confiança temos: 1:1,5:2:6 (BIO) - 1:1,5:2:8 (BIO); 1:1,5:2:6 (BIO) - 1:1,5:2:8 (REF); 1:1,5:2:6 (REF) - 1:1,5:2:8 (BIO); 1:1,5:2:6 (REF) - 1:1,5:2:8 (REF) e 1:1,5:2:8 (BIO) - 1:1,5:2:8 (REF).

Resultados indicam que não houve diferença significativa de variação de resistência entre os corpos de

prova contendo ou não microrganismos.

#### 3.1.2 Absorção de água e coeficiente de capilaridade

Para analisar a permeabilidade, foram conduzidos ensaios de determinação da absorção de água por capilaridade e de coeficiente de capilaridade, sendo realizados de acordo com a NBR 15259 (ABNT, 2005). Os resultados são apresentados na Figura 3.

Em ambos os traços bacterianos (BIO) houve redução na absorção de água por capilaridade comparados aos de referência (REF). O traço 1:1,5:2:6 (BIO) apresentou decréscimo de 33,2% aos 90 minutos de imersão em comparação com a referência (REF). No traço 1:1,5:2:8, os resultados mostram que também houve diminuição de absorção de 46,6% aos 90 minutos de imersão das amostras (BIO) comparadas às de referência (REF).

Em todos os traços o coeficiente de capilaridade diminuiu, ao final do ensaio, obtendo percentuais de redução nas amostras contendo microrganismos, sendo que as amostras do traço 1:1,5:2:6 absorveram mais água no início do ensaio, por conterem finos em maior quantidade em sua composição. As amostras contendo microrganismos obtiveram resultados melhores, fato atribuído a solução bacteriana, material com viscosidade que funcionou como aditivo.

### 3.2 Análises complementares

#### 3.2.1 Fluorescência de Raio X (FRX)

A Fluorescência de Raio X (FRX) nos permite avaliar quantitativamente os elementos químicos, em forma de óxidos e que possuam número atômico maior que 10, presentes na amostra. Foi realizado ensaios nas amostras de argamassa e bioargamassa dos dois traços experimentais, para detectar os elementos presentes nelas, com principal interesse no óxido de cálcio (CaO) e óxido de silício (SiO<sub>2</sub>). Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Segundo Murta (2008), a ativação alcalina e pozolânica é obtida através de uma proporção adequada de

**Figura 2:** Resistência mecânica a tração e compressão.



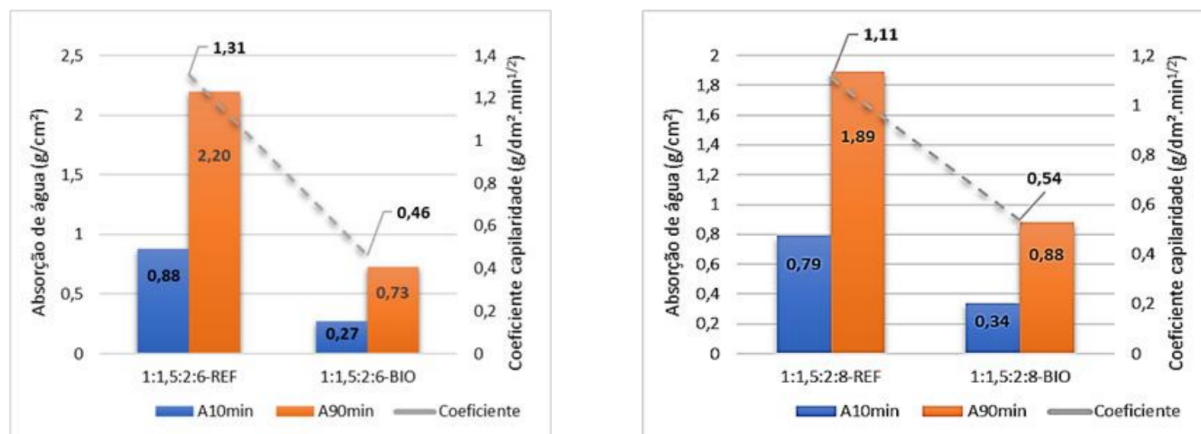
**Tabela 6:** Teste Tukey – valores de p para as amostras de argamassa e bioargamassa.

Teste Tukey – valores de p para as amostras de argamassa e bioargamassa - Tração				
Traços	1:1,5:2:6 (REF)	1:1,5:2:6 (BIO)	1:1,5:2:8 (REF)	1:1,5:2:8 (BIO)
1:1,5:2:6 (REF)	-	-	<0,001	<0,001
1:1,5:2:6 (BIO)	0,012	-	<0,001	<0,001
1:1,5:2:8 (REF)	-	-	-	-
1:1,5:2:8 (BIO)	-	-	0,647	-
* p <0,05 – diferença estatística com intervalo de confiança de 95%				
** p <0,01 - diferença estatística com intervalo de confiança de 99%				
*** p <0,001 - diferença estatística com intervalo de confiança de 99,9%				
Teste Tukey – valores de p para as amostras de argamassa e bioargamassa - Compressão				
Traços	1:1,5:2:6 (REF)	1:1,5:2:6 (BIO)	1:1,5:2:8 (REF)	1:1,5:2:8 (BIO)
1:1,5:2:6 (REF)	-	-	<0,001	<0,001
1:1,5:2:6 (BIO)	0,357	-	<0,001	<0,001
1:1,5:2:8 (REF)	-	-	-	<0,001
1:1,5:2:8 (BIO)	-	-	<0,001	-
* p <0,05 – diferença estatística com intervalo de confiança de 95%				
** p <0,01 - diferença estatística com intervalo de confiança de 99%				
*** p <0,001 - diferença estatística com intervalo de confiança de 99,9%				

**Tabela 7:** FRX dos traços analisados.

Traço	Caracterização química (%)						
	SiO <sub>2</sub>	CaO	MgO	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> O
1:1,5:2:6 - REF	35,52	31,77	14,60	12,55	2,55	1,22	0,70
1:1,5:2:6 - BIO	37,53	30,09	14,80	12,30	2,55	1,40	0,69
1:1,5:2:8 - REF	39,07	28,37	13,50	13,44	2,15	1,24	1,10
1:1,5:2:8 - BIO	42,03	26,56	12,83	12,40	2,22	1,49	1,10

Figura 3: Resistência mecânica a tração e compressão.



CaO/SiO<sub>2</sub>, pois esta relação favorece a formação do silicato de cálcio hidratado (C-S-H), fazendo com que o CaO não só seja um ativador, como também um importante componente da estrutura química do produto final. Para Pan et al. (2002), quanto menor a relação CaO/SiO<sub>2</sub>, maior é a resistência obtida, em seu estudo esta relação, com valor ótimo, ficou em torno de 0,8.

Analisando os resultados de FRX das amostras e efetuando a relação utilizada por Murta (2008), obtemos para o traço 1:1,5:2:6 uma relação CaO/SiO<sub>2</sub> de 0,89 para a REF e 0,80 para a BIO, enquanto que para o traço 1:1,5:2:8 encontrou-se a relação CaO/SiO<sub>2</sub> de 0,73 para a REF e 0,63 para a BIO. Observando resultados de Pan et al. (2002), em que a relação ideal seria em torno de 0,8, o traço seria 1:1,5:2:6 BIO, comprovado por apresentar as maiores resistências a tração e a compressão, como visto no gráfico da Figura 1.

A diminuição da proporção entre CaO/SiO<sub>2</sub> nas amostras contendo microrganismos deve-se por dois pontos, sendo eles: 1º) o teor de cálcio contido junto ao material orgânico onde houve a revitalização das bactérias é de 1,35%. Isto evidencia que para cada unidade do traço, em volume, adiciona-se, por equivalência molecular, 1,89% de CaO. Desta forma, diminui-se a relação CaO/SiO<sub>2</sub> tendo em vista que há um substancial aumento no teor de óxido de cálcio contido no material orgânico e na parede celular bacteriana; 2º) dado o incremento de material orgânico no traço, a proporção de silício adicionado, em equivalente molecular SiO<sub>2</sub>, não acompanha o incremento de cálcio. Vale lembrar, a partir da massa molecular, que para cada unidade de CaO adicionado pelo material orgânico diminui-se 1,22 unidades de SiO<sub>2</sub>, em volume. Isto deve-se pelo fato de que o material orgânico adicionado não contém teor de silício expressivo, já que este se originou de *Vicia vil-*

*losa*, uma planta que não depende deste elemento como um nutriente mas como um elemento benéfico apenas (DECHEN; NACHTIGALL, 2007, p. 127).

### 3.2.2 Difração de Raio X (DRX)

As amostras de argamassa e bioargamassa foram também analisadas por difração de raio X (DRX), sendo seus difratogramas apresentados nas Figuras 4a e 4b.

O relatório de ensaio DRX apresenta uma análise semi-quantitativa de distribuição das fases identificadas nas amostras, realizada em função da altura e da contagem de picos para cada fase mineral identificada. Observou-se que nos traços experimentais identifica-se a presença de quartzo e calcita, como principais fases cristalinas, indicando que houve a reação de carbonatação. A Tabela 8 apresenta os dados semi-quantitativos das amostras apresentadas nos difratogramas de acordo com relatório de análise.

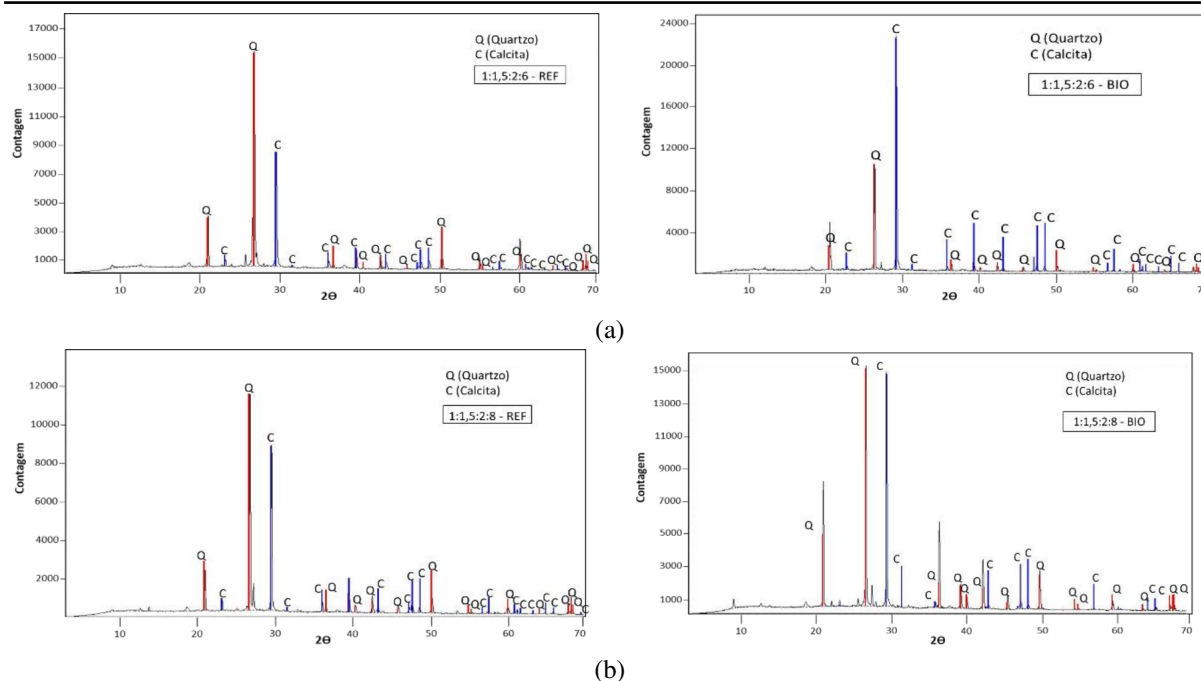
Tabela 8: Resultados semi-quantitativos do ensaio de DRX

Fase cristalina	Traço 1:1,5:2:6 (%)		Traço 1:1,5:2:8 (%)	
	REF	BIO	REF	BIO
Calcita (CaO <sub>3</sub> )	45,4	76,0	51,8	53,2
Quartzo (SiO <sub>2</sub> )	54,6	24,0	48,2	46,8

Os resultados do ensaio de DRX mostram que houve a reação de precipitação de carbonato de cálcio, formando assim a calcita, verificando a presença de um percentual de (76,0%) na amostra do traço 1:1,5:2:6 (BIO), sendo 67,4% maior que a sua amostra REF, porém observa-se que no traço 1:1,5:2:8, a diferença é mínima e imperceptível quando analisado apenas os difratogramas.

O traço que apresentou melhores condições de promover a reação pozolânica foi o traço 1:1,5:2:6, onde





**Figura 4:** Difração de Raio X (DRX) das amostras analisadas (Traço 1:1,5:2:6)

com o acréscimo do elemento bacteriano foi possível aumentar a resistência a tração e obter uma relação  $\text{CaO}_3/\text{SiO}_2$  menor, mas ainda não ideal. Porém, analisando as amostras, do ponto de vista microbiano, ao ser restringida a presença de água, necessária para o crescimento e metabolismo das bactérias, as mesmas entram em estado de dormência, permanecendo em forma de esporos, aguardando sua reativação. Desta forma, mesmo aguardando maior tempo de cura das argamassas pozolânicas, relatadas por (SELVARANJAN et al., 2021; VERMA et al., 2015; YU et al., 2021; SOW et al., 2021; SANTOS; CORDEIRO, 2021), não obter-se-iam maior resistência nas amostras contendo isolado J3UPF, pois os microrganismos estariam em forma de esporos, mas se fossem reativados, com aspersão de solução de ureia, e com o cálcio presente no meio, o metabolismo bacteriano seria reativado, o que poderia ocasionar acréscimo de resistência e permeabilidade.

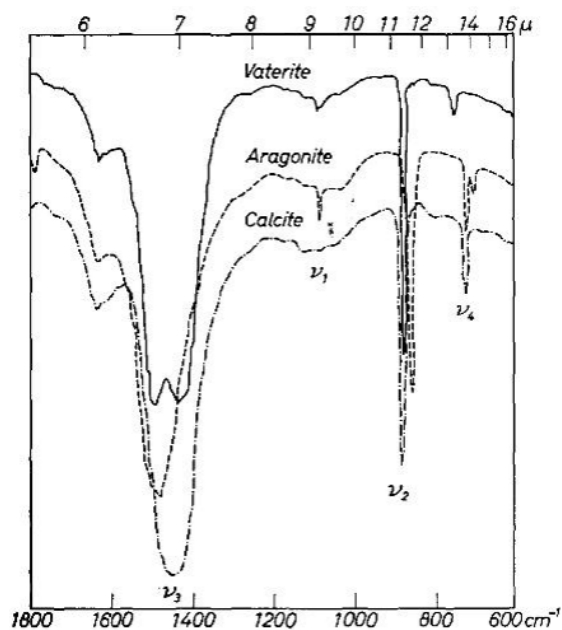
### 3.2.3 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

FTIR significa infravermelho por transformada de Fourier, método usual para espectroscopia de infravermelho, ensaio que permite identificar diferentes estruturas químicas através dos traços espectrais diferentes, fornecidas em seus picos amostrais.

Segundo Sato e Matsuda (1969) os cristais formados pela precipitação de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ),

a calcita, a aragonita e a vaterita, possuem espectros específicos, conforme Figura 5 e Tabela 9.

**Figura 5:** Espectrometria de infravermelho de polimorfos de  $\text{CaCO}_3$ .



Sağın et al. (2012) encontraram áreas dos picos de absorvância de  $\text{CaCO}_3$  em  $1432\text{ cm}^{-1}$  e de  $\text{SiO}_3$  em

**Tabela 9:** Espectros de infravermelho dos polimorfos de  $\text{CaCO}_3$ .

	V <sub>3</sub> ( $\text{cm}^{-1}$ )	V <sub>1</sub> ( $\text{cm}^{-1}$ )	V <sub>2</sub> ( $\text{cm}^{-1}$ )	V <sub>4</sub> ( $\text{cm}^{-1}$ )
Vaterita	1490, 1420	1085, 1070	870, 850, 830	750
Aragonita	1475	1080	855, 840	715, 700
Calcita	1430		870, 845	715

$1100 \text{ cm}^{-1}$ , já Brunello et al. (2019) analisaram amostras de argamassa e encontraram picos pertencentes ao  $\text{CaCO}_3$  com valores dentro das faixas definidas por Sato e Matsuda (1969).

Nos ensaios de FTIR das amostras de argamassa e bioargamassa, traços 1:1,5:2:6 e 1:1,5:2:8, foi analisado apenas os espectros que referenciavam a presença de polimorfos de  $\text{CaCO}_3$ , os quais são apresentados e discutidos.

Na Figura 6 tem-se os espectros do traço 1:1,5:2:6, para as amostras (REF) e (BIO), e os espectros do traço 1:1,5:2:8, para as amostras (REF) e (BIO).

Ambas as imagens definem na região de impressão digital, número de ondas de  $1400 - 600 \text{ cm}^{-1}$ , ligações C-C, C-O e C-N, observando espectros com simetrias de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), segundo comparativo de dados de Sato e Matsuda (1969).

Verifica-se um estiramento mais intenso nas amostras com microrganismos nos traços 1:1,5:2:6 – BIO e nos traços 1:1,5:2:8 – REF, mas não são significativos, o que pode ser verificado nos resultados de resistências a tração e compressão e nas demais análises adicionais (FRX e DRX).

O intervalo do número de ondas entre  $1400 - 600 \text{ cm}^{-1}$  de todas as amostras, com valores dos estiramentos, onde pode-se comparar V<sub>3</sub>, V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub> e V<sub>4</sub>, apresentados por Sato e Matsuda (1969). Comparando valores de Sato e Matsuda (1969) da Tabela 9, valor de V<sub>3</sub> aproximasse de vaterita, valor de V<sub>1</sub> está distante de vaterita e aragonita, mas não possui valor de calcita, valor de V<sub>2</sub> aproximasse de vaterita e calcita e valor de V<sub>4</sub> aproximasse de aragonita e calcita. Desta forma, pode-se inferir que se tem a presença de calcita, por apresentar mais estiramentos de comparação, mas não descartando a presença de vaterita e aragonita.

As absorções localizadas em  $845-878 \text{ cm}^{-1}$  são devidas a vibrações de Si-OH, já entre  $712 \text{ e } 724 \text{ cm}^{-1}$  são atribuídos a grupos tetraédricos de ligações Si-O. A banda em  $660 - 725 \text{ cm}^{-1}$ , presente no espectro de todas as amostras analisadas, foi atribuída ao Si - O.

As vibrações de alongamento C-O e C-C, típicas do  $\text{CaCO}_3$  também foram observadas em torno de  $800 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.2.4 Avaliação da manutenção da bioatividade dos microrganismos na bioargamassa

Decorrido 60 dias após o rompimento das amostras de bioargamassa, foram realizados ensaio para avaliar a bioatividade bacteriana na bioargamassa, apresentados nas Figuras 7 e 8.

Ao analisarmos as placas de petri contendo amostras de bioargamassa diluída em água e ureia, verificou-se que os microrganismos se mantiveram ativos. Nas amostras contendo apenas água, a atividade de urease e o crescimento de colônias bacterianas foi mais lento, quando comparado às amostras com fornecimento de ureia adicional, elemento necessário para o metabolismo bacteriano realizar a urease. Já nas amostras com adição de ureia, com visualização modesta da atividade de urease, percebeu-se que o crescimento de colônias foi verificado 48 horas após a incubação. Além disso, ambas as amostras (com água e com adição de ureia) apresentaram atividade de urease e crescimento de colônias bacterianas a partir de 6 dias de incubação. O que comprova que os microrganismos estavam em estado de latência, na forma de esporos.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O armazenamento do microrganismo isolado em material orgânico vegetal, no caso, a *Vicia villosa* Roth, mostrou-se promissor, garantindo viabilidade de crescimento bacteriano e manutenção da bioatividade. Foi produzido um material de baixo custo, fácil armazenamento e manuseio e garantia de sustentabilidade ambiental.

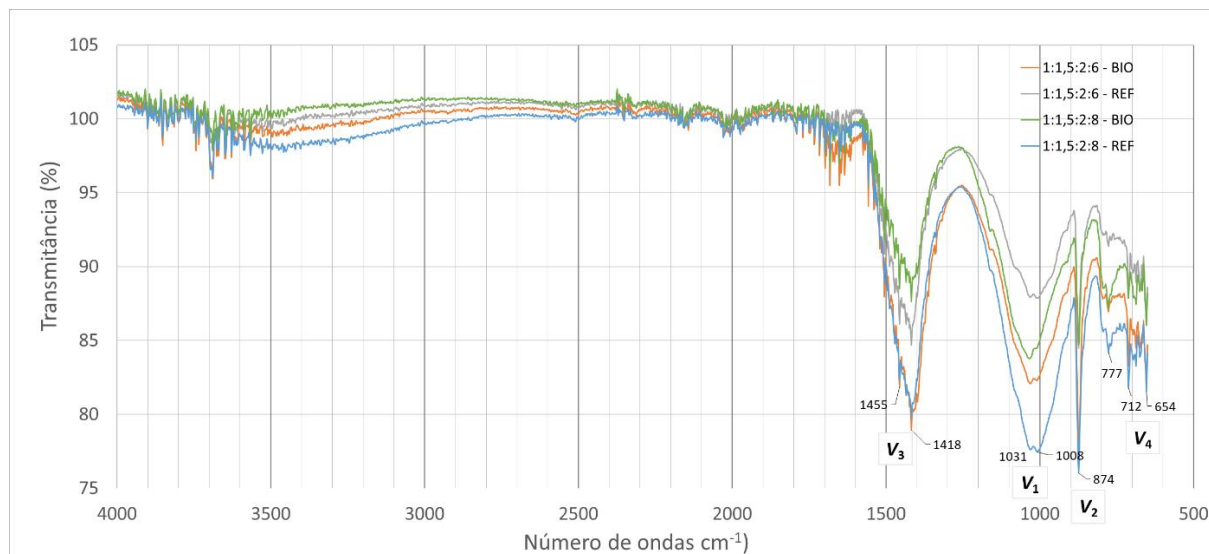
O isolado de solo condicionado em material orgânico foi relatado pela primeira vez como forma de armazenar e cultivar novas colônias. A viabilidade de uso do isolado em biomassa vegetal para promover a biocimentação foi comprovada.

O uso do isolado em argamassa pozolânica sem adição de cimento Portland foi testada, a bioargamassa não aumentou significativamente a resistência das argamassas pozolânicas durante o período de cura de 28 dias, mas mostrou-se capaz de precipitar carbonato de cálcio no traço contendo menos teor de areia.

As análises de FRX, DRX e FTIR, foram ferramentas complementares importantes para uma melhor compreensão do resultado das misturas.

Foi possível verificar que as amostras secas das bioargamassas mantêm os microrganismos em estado de

**Figura 6:** Espectroscopia de infravermelho todas as amostras.



**Figura 7:** Atividade de urease nas bioargamassas revitalizadas.

		48 horas	5 dias	6 dias
Diluída em água	Traço 1:1,5:2:6 (BIO)			
	Traço 1:1,5:2:8 (BIO)			

**Figura 8:** Atividade de urease nas bioargamassas revitalizadas.

		48 horas	5 dias	6 dias
Diluída em água c/ 2% ureia	Traço 1:1,5:2:6 (BIO)			
	Traço 1:1,5:2:8 (BIO)			

dormência, podendo serem reativados, com o intuito de melhorar o desempenho da argamassa. Desta forma, podendo o produto ser utilizado como aditivo para melhorar o desempenho da argamassa e aumentar a vida útil, principalmente no reparo de fissuras e na permeabilidade.

## REFERÊNCIAS

AHMED, A.; HYNDMAN, F.; KAMAU, J.; FITRIANI, H. Rice husk ash as a cement replacement in high strength sustainable concrete. **Materials Science Forum**, v. 1007, n. 1, p. 90–98, 2020.

ALMEIDA, J.; THOMÉ, A.; TONIAL, F.; SIQUEIRA, G. d. N. Isolamento e avaliação de bactérias do gênero bacillus com potencial para uso em biocimentação na produção de argamassas. In: ANAIS... **ENCONTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA DO AMBIENTE CONSTRUÍDO**. Foz do Iguaçu: ANTAC, 2018. p. 17.

AMEEN, F.; RANJITHA, J.; AHSAN, N.; SHANKAR, V. Co-digestion of microbial biomass with animal manure in three-stage anaerobic digestion. **Fuel**, Elsevier, v. 306, n. 1, p. 121746, 2021.

BANACH-WISNIEWSKA, A.; TOMASZEWSKI, M.; HELLAL, M. S.; ZIEMBIŃSKA-BUCZYŃSKA, A. Effect of biomass immobilization and reduced graphene oxide on the microbial community changes and nitrogen removal at low temperatures. **Scientific Reports**, Nature Publishing Group UK London, v. 11, n. 1, p. 840, 2021.

BHADURI, S.; DEBNATH, N.; MITRA, S.; LIU, Y.; KUMAR, A. Precipitação de calcite induzida microbiologicamente mediada por sporosarcina pasteurii. **Journal of Visualized Experiments**, v. 110, n. 1, p. 53253, 2016.

BRUNELLO, V.; CORTI, C.; SANSONETTI, A.; TEDESCHI, C.; RAMPAZZI, L. Non-invasive ftir study of mortar model samples: Comparison among innovative and traditional techniques. **The European Physical Journal Plus**, Springer Berlin Heidelberg, v. 134, n. 6, p. 270, 2019.

CHATEIGNER, D. **Crystallography Open Database**. 2019. Disponível em: <<http://www.crystallography.net/cod/>>.

CHENG, L.; CORD-RUWISCH, R. Selective enrichment and production of highly urease active bacteria by non-sterile (open) chemostat culture. **Journal of Industrial Microbiology and**

**Biotechnology**, Oxford University Press, v. 40, n. 10, p. 1095–1104, 2013.

DANG, J.; DU, H.; PANG, S. D. Hydration, strength and microstructure evaluation of eco-friendly mortar containing waste marine clay. **Journal of Cleaner Production**, Elsevier, v. 272, n. 1, p. 122784, 2020.

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. Elementos requeridos à nutrição de plantas. In: \_\_\_\_\_. 1. ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. cap. Fertilidade do solo., p. 1.

FENG, C.; CUI, B.; GE, H.; HUANG, Y.; ZHANG, W.; ZHU, J. Reinforcement of recycled aggregate by microbial-induced mineralization and deposition of calcium carbonate—influencing factors, mechanism and effect of reinforcement. **Crystals**, MDPI, v. 11, n. 8, p. 887, 2021.

GRANIZO, M. L.; ALONSO, S.; BLANCO-VARELA, M. T.; PALOMO, A. Alkaline activation of metakaolin: effect of calcium hydroxide in the products of reaction. **Journal of the American Ceramic Society**, Wiley Online Library, v. 85, n. 1, p. 225–231, 2002.

GUPTA, S.; KUA, H. W.; PANG, S. D. Healing cement mortar by immobilization of bacteria in biochar: An integrated approach of self-healing and carbon sequestration. **Cement and Concrete Composites**, Elsevier, v. 86, n. 1, p. 238–254, 2018.

HAMDAN, N.; JR, E. K.; RITTMANN, B. E.; KARATAS, I. Carbonate mineral precipitation for soil improvement through microbial denitrification. **Geomicrobiology journal**, Taylor & Francis, v. 34, n. 2, p. 139–146, 2017.

INTARASOONTRON, J.; PUNGRASMI, W.; NUAKLONG, P.; JONGVIVATSAKUL, P.; LIKITLERSUANG, S. Comparing performances of micp bacterial vegetative cell and microencapsulated bacterial spore methods on concrete crack healing. **Construction and Building Materials**, Elsevier, v. 302, n. 1, p. 124227, 2021.

KHUSHNOOD, R. A.; QURESHI, Z. A.; SHAHEEN, N.; ALI, S. Bio-mineralized self-healing recycled aggregate concrete for sustainable infrastructure. **Science of the Total Environment**, Elsevier, v. 703, n. 1, p. 135007, 2020.

KÜMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, Oxford University Press, v. 54, n. 2, p. 311–320, 2004.

- LIU, P.; SHAO, G.; HUANG, R. Treatment of bayer-process red mud through microbially induced carbonate precipitation. **Journal of Materials in Civil Engineering**, American Society of Civil Engineers, v. 33, n. 5, p. 04021067, 2021.
- MOKHTAR, N.; JOHARI, M. A. M.; TAJARUDIN, H. A.; AL-GHEETHI, A. A.; ALGAIFI, H. A. A sustainable enhancement of bio-cement using immobilised bacillus sphaericus: Optimization, microstructural properties, and techno-economic analysis for a cleaner production of bio-cementitious mortars. **Journal of Cleaner Production**, Elsevier, v. 318, n. 1, p. 128470, 2021.
- PARK, M.; PARK, S.; YOO, J.-Y.; KIM, Y.; LEE, K. M.; HWANG, D.-Y.; SON, H.-J. Enzyme-mediated biocalcification by a novel alkaliphilic bacillus psychrodurans lc40 and its eco-friendly application as a biosealant for crack healing. **Science of The Total Environment**, Elsevier, v. 802, n. 1, p. 149841, 2022.
- RECENA, F. A. P. **Conhecendo argamassa**. 1. ed. Rio Grande do Sul: Edipucrs, 2012.
- SAĞIN, E. U.; BÖKE, H.; ARAS, N.; YALÇIN, Ş. Determination of caco 3 and sio 2 content in the binders of historic lime mortars. **Materials and Structures**, Springer, v. 45, n. 6, p. 841–849, 2012.
- SANDALCI, I.; TEZER, M. M.; BUNDUR, Z. B. Immobilization of bacterial cells on natural minerals for self-healing cement-based materials. **Frontiers in Built Environment**, Frontiers Media SA, v. 7, n. 1, p. 655935, 2021.
- SANTOS, A. A. M. d.; CORDEIRO, G. C. Investigation of particle characteristics and enhancing the pozzolanic activity of diatomite by grinding. **Materials Chemistry and Physics**, Elsevier, v. 270, n. 1, p. 124799, 2021.
- SATO, M.; MATSUDA, S. Structure of vaterite and infrared spectra. **Zeitschrift für Kristallographie**, v. 129, n. 5-6, p. 405–410, 1969.
- SELVARANJAN, K.; GAMAGE, J.; SILVA, G. D.; NAVARATNAM, S. Development of sustainable mortar using waste rice husk ash from rice mill plant: Physical and thermal properties. **Journal of Building Engineering**, Elsevier, v. 43, n. 1, p. 102614, 2021.
- SOW, M.; HOT, J.; TRIBOUT, C.; CYR, M. Improving circular economy by the valorization of non-conventional coal fly ashes in composite cement manufacturing. **Construction and Building Materials**, Elsevier, v. 300, n. 1, p. 124053, 2021.
- SUN, X.; CHEN, J.; LU, S.; LIU, M.; CHEN, S.; NAN, Y.; WANG, Y.; FENG, J. Ureolytic micp-based self-healing mortar under artificial seawater incubation. **Sustainability**, MDPI, v. 13, n. 9, p. 4834, 2021.
- SYLVIA, D. M.; FUHRMANN, J. J.; HARTEL, P. G.; ZUBERER, D. A. **Principles and applications of soil microbiology**. 1. ed. United Kingdom: Pearson, 2005.
- VERMA, R. K.; CHAURASIA, L.; BISHT, V.; THAKUR, M. Bio-mineralization and bacterial carbonate precipitation in mortar and concrete. **Biosci. Bioeng**, v. 1, n. 1, p. 5–11, 2015.
- YU, J.; MISHRA, D. K.; HU, C.; LEUNG, C. K.; SHAH, S. P. Mechanical, environmental and economic performance of sustainable grade 45 concrete with ultrahigh-volume limestone-calcined clay (lcc). **Resources, Conservation and Recycling**, Elsevier, v. 175, n. 1, p. 105846, 2021.