

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**ANÁLISE DE ESTIRPES BACTERIANAS COM POTENCIAL  
APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE AUTO-CURA DE MATERIAL  
CIMENTÍCIO VIA BIOPRECIPITAÇÃO**

Autor: Romário de Jesus Santos

Orientadores: Prof. Dr. Ranyere Lucena Souza.

Prof<sup>ª</sup>. Dr. Cleide Mara Faria Soares.

ARACAJU, SE - BRASIL  
FEVEREIRO DE 2018

ANÁLISE DE ESTIRPES BACTERIANAS COM POTENCIAL APLICAÇÃO EM  
PROCESSOS DE AUTO-CURA DE MATERIAL CIMENTÍCIO VIA BIOPRECIPITAÇÃO

Romário de Jesus Santos

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE  
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
ENGENHARIA DE PROCESSOS

Aprovada por:

---

Dr. Ranyere Lucena de Souza.

---

Dra. Cleide Mara Farias Soares.

---

Dr. Álvaro Silva Lima.

---

Dra. Odélsia Leonor Sanchez de Alsina.

---

Dra. Paulo Eduardo Silva Martins.

---

Dra. Luciana Cristina Lins de Aquino Santana.

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

C!!!e Santos, Romário de Jesus.

Análise de estirpes bacterianas com potencial aplicação em processos de auto-cura de material cimentício via bioprecipitação / Romário de Jesus Santos; orientadores Ranyere Luncena Souza, Cleide Mara Farias Soares. – Aracaju, 2018.

104 p.: il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, 2018.

1. Concreto. 2. Auto cura. 3. Precipitação. 4. Bactéria. 5. Engenharia Civil. 6. Engenharia de processos. I. Ranyere Luncena Souza (orient.). II. Cleide Mara Faria Soares (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 543.555

665.6

A minha família

## ***Agradecimentos***

A Deus, por ter me dado a oportunidade de estar nesse mundo.

Aos meus pais, em especial minha mãe Sandra pelos conselhos, ensinamentos e amor incondicional.

As minhas irmãs Elismary e Samary pelo companheirismo e amizade, amo vocês.

A minha namorada Luana pelo amor e compreensão mesmo nos momentos em que precisei estar ausente.

Aos meus amigos verdadeiros pelo incentivo e palavras de conforto nas horas difíceis.

Aos meus orientadores Ranyere Lucena Souza e Cleide Mara Faria Soares pela dedicação e por acreditar em minha capacidade.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

## ANÁLISE DE ESTIRPES BACTERIANAS COM POTENCIAL APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE AUTO-CURA DE MATERIAL CIMENTÍCIO VIA BIOPRECIPITAÇÃO

Romário de Jesus Santos

O processo de auto-cura de concreto utilizando bactérias é um mecanismo inovador e alternativo para as problemáticas fissuras em estruturas de concreto. O presente estudo identificou e avaliou cinco linhagens bacterianas coletadas de solo com histórico de contaminação com petróleo para sua potencial aplicação no processo de autocura de concreto via bioprecipitação de  $\text{CaCO}_3$ . Baseado nas análises de 16S rDNA em conjunto com os ensaios bioquímicos os resultados demonstram que as linhagens são ou *Bacillus cereus* ou *thuringiensis*. Um alto potencial para realizar a bioprecipitação foi verificado, com atividade de uréase de  $2.379,02 \pm 1,35$  U/mL em meio com adição de glicerol após 40 dias de crescimento bacteriano. A bioprecipitação de  $\text{CaCO}_3$  em moldes cimentícios preparados com microrganismo promoveu um aumento da resistência à compressão de  $\pm 14,2\%$ . O bioprecipitado de  $\text{CaCO}_3$  foi confirmada com FTIR em conjunto com ICP-OES, e foi verificado nos moldes cimentícios preparados com microrganismo.

**Palavras-chave:** bioprecipitação, atividade de urease, concreto, resistência.

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of Universidade Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

ANALYSIS OF BACTERIAL STRAINS WITH POTENTIAL APPLICATION IN SELF-HEALING PROCESSES OF CEMENTITIOUS MATERIAL VIA BIOPRECIPITATION

Romário de Jesus Santos

The self-healing process of concrete using bacteria is an innovative and alternative mechanism to solve the problematic cracks in concrete structures. The present study identified and evaluated five *Bacillus* strains collected from soil with a history of contamination with petroleum for application in the protocol of self-healing via  $\text{CaCO}_3$  bioprecipitation. Based on analyzes of 16S rDNA in conjunction with biochemical assays the results demonstrate that the strains are either *Bacillus cereus* or *thuringiensis*. The microorganism are able to produce urease activity of approximately  $2,379.02 \pm 1.35$  U/mL after 40 days when used glycerol as a carbon source. The cementitious molds with microorganism promoted self-healing of cracks and increased the compressive strength in approximately 14.2%. The  $\text{CaCO}_3$  bioprecipitated in cementitious molds was confirmed with FTIR together with ICP-OES.

Keywords: bioprecipitação, urease activity, concrete, resistance.

## SUMÁRIO

|                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                         | <b>12</b> |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                          | <b>14</b> |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                              | <b>15</b> |
| 3.1. MATERIAL CEMENTICO                                      | 15        |
| 3.2. COMPOSIÇÃO DO CIMENTO E SUAS APLICAÇÕES                 | 17        |
| 3.2.1 Cimento Portland comum (CP I)                          | 17        |
| 3.2.2 Cimento Portland composto (CP II)                      | 17        |
| 3.2.3 Cimento Portland de alto forno (CP III)                | 17        |
| 3.2.4 Cimento Portland pozolânicos (CP IV)                   | 18        |
| 3.2.5 Cimento Portland de alta resistência inicial (CP VARI) | 18        |
| 3.2.6 Cimento Portland branco (CPB)                          | 18        |
| 3.2.7 Cimento Portland resistente a sulfatos (RS)            | 18        |
| 3.3. PREPARO DE CORPO-DE-PROVA                               | 20        |
| 3.4. PROPRIEDADES DO CONCRETO                                | 20        |
| 3.5.1 Estado endurecido                                      | 20        |
| 3.5.2 Propriedades do estado fresco                          | 21        |
| 3.6. PATOLOGIAS NO CONCRETO                                  | 22        |
| 3.6.1 Fissuras                                               | 23        |
| 3.7. CONTROLE                                                | 24        |
| 3.5. MÉTODOS DE RECUPERAÇÃO DE ESTRUTURAS                    | 25        |
| 3.8.1 Métodos convencionais                                  | 25        |
| 3.8.2 Processo de Auto-cura                                  | 26        |
| 3.8.2.1 Biomineralização                                     | 28        |
| 3.8.2.2 Precipitação de calcita bacterianamente induzida     | 28        |
| 3.6. INDUTORES DE BIOPRECIPITAÇÃO                            | 34        |
| 3.6.1. Tipo de bactéria                                      | 34        |
| 3.6.2. Concentração de células de bactérias                  | 35        |
| 3.6.3. pH                                                    | 35        |
| 3.6.4. Temperatura                                           | 36        |
| 3.6.5. Concentração de ureia e $\text{Ca}^{+}$               | 36        |
| 3.7. APLICAÇÃO DO MICP                                       | 37        |
| 3.7.1. Concentração de ureia e $\text{Ca}^{+}$               | 37        |
| <b>INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO 4</b>                              | <b>41</b> |
| <b>ABSTRACT</b>                                              | <b>43</b> |
| <b>1. INTRODUCTION</b>                                       | <b>44</b> |
| <b>2. MATERIALS AND METHODS</b>                              | <b>45</b> |
| 2.1. MICRORGANISMS                                           | 45        |
| 2.2. BIOCHEMICAL IDENTIFICATION OF STRAINS                   | 46        |
| 2.3. PHYLOGENETIC IDENTIFICATION OF STRAINS                  | 46        |
| 2.3.1. DNA extraction                                        | 46        |
| 2.3.2. Identification of 16S rDNA and phylogenetic analysis  | 47        |
| 2.4. FERMENTATIVE PROCESS                                    | 48        |
| 2.4.1. Fermentative operational conditions                   | 48        |
| 2.4.2. Urease activity                                       | 48        |
| 2.4.3. Cinetic parameters                                    | 49        |
| 2.5. BIOPRECIPITATION ESSAYS                                 | 49        |
| 2.5.1. Preparation of cementitious molds                     | 49        |
| 2.5.2. Compressive strength                                  | 50        |
| 2.5.3. Characterization of bioprecipitate                    | 50        |
| <b>3. RESULTS AND DISCUSSIONS</b>                            | <b>50</b> |



|                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.1. BIOCHEMICAL IDENTIFICATION OF STRAINS.....</b>    | <b>50</b> |
| <b>3.2. PHYLOGENETIC IDENTIFICATION OF STRAINS.....</b>   | <b>51</b> |
| <b>3.3. FERMENTATIVE PROCESS .....</b>                    | <b>52</b> |
| 3.3.1. Adaptation and selection of bacterial strain ..... | 52        |
| 3.3.2. Enzymatic activity.....                            | 54        |
| <b>3.4. BIOPRECIPIATION ASSAY .....</b>                   | <b>56</b> |
| 3.4.1. Potential compressive strength.....                | 56        |
| 3.4.2. Caracterization of CaCO <sub>3</sub> .....         | 57        |
| <b>4. CONCLUSION.....</b>                                 | <b>58</b> |
| <b>ACKNOWLEDGMENTS.....</b>                               | <b>59</b> |
| <b>REFERENCES.....</b>                                    | <b>59</b> |
| <b>CONCLUSÕES.....</b>                                    | <b>76</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1: CORPO DE PROVA DE CONCRETO. FONTE: <a href="http://www.betontecnologia.com.br">HTTP://WWW.BETONTECNOLOGIA.COM.BR</a> (ACESSADO 20 DE MAIO 2017) .....                                                                                                                            | 15 |
| FIGURA 2: FISSURA NO CONCRETO. FONTE: <a href="http://www.clubedoconcreto.com.br/html">HTTP://WWW.CLUBEDOCONCRETO.COM.BR.HTML</a> (ACESSADO 10 DE MAIO 2017) .....                                                                                                                         | 23 |
| FIGURA 3: FISSURAS POR RETRAÇÃO NA FASE PLÁSTICA DO CONCRETO DEVIDO À PERDA RÁPIDA DE ÁGUA E AUSÊNCIA DE CURA. FONTE - <a href="http://construcaomercado.pini.com.br">HTTP://CONSTRUCAOMERCADO.PINI.COM.BR</a> (ACESSADO 10 MAI. 2017) .....                                               | 24 |
| FIGURA 4: TRATAMENTO DE ABERTURAS NO CONCRETO COM APLICAÇÃO DO MICROCONCRETO FLUIDO. FONTE: <a href="http://www.reitec.com.br">HTTP://WWW.REITEC.COM.BR</a> (ACESSADO 10 MAI. 2017).....                                                                                                   | 26 |
| FIGURA 5: TRATAMENTO DE ABERTURAS NO CONCRETO COM MÉTODOS CONVENCIONAIS. FONTE: <a href="http://www.reitec.com.br">HTTP://WWW.REITEC.COM.BR</a> (ACESSADO 10 MAI. 2017) .....                                                                                                              | 26 |
| FIGURA 6: UREÓLISI CONDUZINDO A PRECIPITAÇÃO DE CALCITA. FONTE: MUYNCK ET AL. 2010..                                                                                                                                                                                                       | 31 |
| FIGURA 7: MICROGRAFIAS DE VARREDURA DE ELÉTRONS MOSTRANDO OS EFEITOS DAS FONTES DE CÁLCIO DIFERENTES SOBRE A FORMA DOS CRISTAIS FORMADOS. CLORETO DE CÁLCIO (A), O ACETATO DO CÁLCIO (B), LACTATO DE CÁLCIO (C), GLUCONATO DE CÁLCIO (D). FONTE: GOROSPE ET AL. 2013. ....                 | 33 |
| FIGURA 8: DIGITALIZAÇÃO DE MICROGRAFIA ELETRÔNICA MOSTRANDO O SOLO BIOCONSOLIDADO DE <i>L. SPHAERICUS</i> WJ-8. (A) ÁGUA, (B) MEDIA YAU, (C) CÉLULA VEGETATIVA, (D) CÉLULA VEGETATIVA E ESPOROS. FONTE: GOROSPE ET AL. 2013. ....                                                          | 38 |
| FIGURA 9: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CURA POR BACTÉRIAS. CARBONATO DE CÁLCIO (AMARELO) É FORMADO POR BACTÉRIAS (AZUL ESCURO) INCORPORADAS AO CONCRETO (CINZA). AS SETAS PRETAS REPRESENTAM O FLUXO DE ÁGUA E A BARRA VERMELHA REPRESENTA O REFORÇO DE AÇO. FONTE: DE KOSTER., 2015. .... | 40 |

## ***LISTA DE TABELAS***

|                                                                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>TABELA 1: MISTURAS ENVOLVENDO OS MATERIAIS PRESENTES PARA O PREPARO DO CONCRETO NO CONCRETO. ....</i>                                               | <i>17</i> |
| <i>TABELA 2: PERCENTUAL DOS COMPONENTES EM MASSA DO CIMENTO (SOUZA ET AL, 1998).....</i>                                                               | <i>19</i> |
| <i>TABELA 3: UREASE, PRODUZINDO BACTÉRIAS DE DIVERSAS FONTES E QUANTIDADE DE PRECIPITAÇÃO DE ATIVIDADE E CALCITA DA UREASE. (ABO ET AL, 2016).....</i> | <i>30</i> |

# Capítulo 1

## 1. INTRODUÇÃO

O concreto consiste em um material heterogêneo resultante da mistura de um aglomerante hidráulico (Cimento Portland), agregado miúdo (areia), agregado graúdo (brita) e água. Devido à disponibilidade de suas matérias-primas, a acessibilidade, a durabilidade e a resistência à compressão e torna o material amplamente utilizado na construção civil para as estruturas. Segundo a ABCP (Associação Brasileira de Cimento Portland), no ano de 2012 o Brasil produziu cerca de 51 milhões de m<sup>3</sup> de concreto.

As estruturas de concreto inevitavelmente sofrem degradação e deterioração ao longo do tempo e estes materiais são suscetíveis ao aparecimento de aberturas quando exposto a determinadas condições ambientais e cargas externas. Estas patologias associadas a sintomas, e aos mecanismos que causam defeitos nos materiais, certamente comprometem a integridade das estruturas com a formação de gases indesejáveis e a entrada de água. Várias técnicas de reparação estão disponíveis para corrigir as rachaduras. A manutenção e reparação de estruturas de concreto contam com programas de inspeção regular, que são onerosos e eles também dependem de uma combinação de ensaios não destrutivos e percepção humana (Alghamri *et al.*, 2017). Há outras técnicas para reparar as rachaduras pelos materiais constituintes do próprio concreto chamado concreto auto-curável (Vijay *et al.*, 2017).

Atualmente um dos processos alternativos para corrigir essa patologia é incorporar ao concreto bactérias capazes de mediar a precipitação de minerais, cuja a reação proposta é mineralização biológica controlada com a formação de magnetita ou por mineralização biológica induzida. Sob condições apropriadas, a maioria das bactérias são capazes de induzir a precipitação de carbonato.

Entre as principais bactérias capazes de induzir a precipitação de carbonatos, podem-se destacar: *Bacillus* spp. (por exemplo, as espécies *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. amyloliquefacies*, *B. cereus*), *Pseudomonas* spp., *Variovorax* spp., *Micrococcus* spp., *Leuconostoc mesenteroides*, *Myxococcus xanthus*, *Sporosarcina pasteurii*, *S. ureae*, *Escherichia coli*, *Beijerinckia indica* e *Penicillium chrysogenum* (VALENCIA, 2009). Destas espécies o gênero *Bacillus* se apresenta como uma bactéria ótima para a precipitação de carbonato de cálcio no habitat natural (BASKAR *et al.*, 2006). Os

primeiros cristais produzidos na precipitação de carbonato de cálcio são amorfos e provavelmente hidratados. Eles aparecem na superfície dos corpos bacterianos como manchas ou estrias, que se estendem e se unem até formar uma capa rígida. Em outros casos, as partículas sólidas se formam dentro do corpo celular e posteriormente são excretadas para fora da célula. Todas estas pequenas partículas formam agregados “biominerais”, os quais estrutura “precristalina” ou “procrystalina” são visualizadas (GONZÁLEZ *et al.*, 2014). Este precipitado é ambientalmente correto, durável e compatível com materiais de construção; devido à isto, a indução de microrganismos para a precipitação de carbonato está sendo amplamente investigada para aplicações de engenharia civil, tais como a proteção da superfície de materiais de construção (DE MUYNCK *et al.*, 2008; TIANO *et al.*, 2006), cimentação e reparação de aberturas (JONKERS *et al.*, 2010; VAN TITTELBOOM *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015; WIKTOR AND JONKERS, 2011).

Além disso, González *et al.* (2014), observaram que isolados bacterianos de *Bacillus* spp., são capazes de induzir a precipitação de carbonato de cálcio a partir da adição de nutrientes, como o cálcio, extrato de levedura e glicose que foram utilizados para estabilizar o solo. Neste sentido uso da mistura dos nutrientes podem ser uma alternativa promissora para induzir uma bioprecipitação eficiente.

Portanto, este trabalho tem por objetivo investigar diferentes cepas bacterianas isoladas de solo contaminado por petróleo, no campo de extração do município de Carmópolis-Sergipe, para induzir a bioprecipitação bacteriana. Além disso, a proposta consistiu na avaliação de indutores (ureia e glicerol) capazes de melhorar o processo de auto-cura de materiais cimentícios.

## Capítulo 2

### 2. OBJETIVOS

#### 2.1. *Objetivo Geral*

Avaliar a capacidade de bactérias selecionadas em bioprecipitar carbonato de cálcio para potencial aplicação em processos de auto-cura de concreto.

#### 2.2. *Objetivos específicos*

Os objetivos específicos são assim estabelecidos:

- Caracterizar e identificar as estirpes bacterianas;
- Avaliar o crescimento de cinco tipos de estirpes bacterianas em meios controlados de nutrientes;
- Avaliar a atividade de uréase e crescimento celular das cinco estirpe bacterianas em meios com extrato de levedura e ureia, e adição de glicerol;
- Preparar moldes cimentícios na ausência e presença do meio com microrganismos;
- Avaliar a resistência à compressão dos moldes de argamassa na ausência e presença do meio com microrganismos.
- Caracterizar a bioprecipitação bacteriana por espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR) e espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES).

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Material cementício

Os materiais cimentícios são compostos que consiste essencialmente de um meio contínuo aglomerante dentro do qual estão imersas partículas ou fragmentos de agregados (MEHTA *et al.*, 1994). É construído por uma a mistura de água, agregado miúdo (pedra) e agregado graúdo (areia) e cimento que ao ser hidratado pela água, forma uma pasta resistente e aderente aos agregados formando um bloco monolítico como mostra a Figura 1.



**Figura 1:** Corpo de prova de concreto. Fonte: <http://www.betontecnologia.com.br>  
(Acessado 20 de maio 2017)

De acordo com o Instituto Brasileiro de Concreto (IBRACON) estima-se que anualmente são consumidas 11 bilhões de toneladas de concreto, o que dá aproximadamente, um consumo médio de 1,9 tonelada de concreto por habitante por ano, valor inferior apenas ao consumo de água. O Sistema Nacional de Pesquisa de Custos e Índices da Construção Civil (SINAPI) estima o custo do concreto usinado à um preço de R\$ 262,14 o metro cúbico.

HELENE *et al.*, (2011) ressaltam que até o século XIX, pouco se conhecia acerca das proporções adequadas dos materiais constitutivos dos concretos e argamassas. Em

1828, na França, Louis J. Vicat constatou experimentalmente que uma determinada relação cimento/areia conduzia à máxima resistência das argamassas. O autor também fez considerações sobre os inconvenientes do excesso e da insuficiência de areia no traço e descrevem que, na mesma época, Rondelet, em 1830, preconizou a utilização de areia mais grossa possível para obtenção de argamassas e concretos econômicos. Préaudeau, em 1881, apresentou formalmente um método de dosagem das argamassas e concretos. Propôs que fosse determinado o volume de vazios da areia e que o volume da pasta aglomerante deveria ser 5% superior ao volume de vazios encontrado no agregado miúdo. Em 1918, Duff A. Abrams, após o estudo de inúmeros traços e análise de mais de 50.000 corpos-de-prova, enunciou a “Lei de Abrams”, mundialmente aceita até os dias de hoje. Abrams introduziu também o termo “Módulo de Finura”, que propôs representar, por meio de um único índice, a distribuição granulométrica dos agregados. O índice assim obtido mostrou-se tão útil que foi adotado mundialmente nas normas de agregados para concreto, inclusive na brasileira, a ABNT NBR 7211 (2009) - agregados para o concreto.

O cimento mais utilizado, conhecido como Cimento Portland é um aglomerante hidráulico, pulverulento, produzido pela moagem do clínquer - constituído essencialmente por silicatos de cálcio hidráulicos, com adição de uma ou mais formas de sulfato de cálcio onde a junção do clínquer com a gipsita gera o Cimento Portland (BAUER, 2008).

O agregado é um material granular tal como areia, o pedregulho, a pedra britada ou escoria de alto forno, usado com o meio cimentante, para formar um concreto ou uma argamassa de cimento hidráulico. O termo agregado graúdo se refere as partículas de agregados maiores do que 4,8 mm e o termo agregado miúdo se refere as partículas de agregados menores que 4,8 mm e maiores que 75 µm, e pedregulho é o agregado graúdo resultante da desintegração natural e abrasão da rocha ou do processamento mecânico de conglomerados fracamente cimentados (NIVILLE, 2013).

Desse modo, CARVALHO *et al*, (2015) ressaltam que como o cimento é um material caro, o principal objetivo da utilização do agregado de maiores dimensões é reduzir o custo sem que a qualidade do material seja prejudicada. Associando estes materiais resulta na Tabela 01.



**Tabela 1:** Misturas envolvendo os materiais presentes para o preparo do concreto no concreto.

| <b>Material 01</b> | <b>Material 02</b> | <b>Produto</b>    |
|--------------------|--------------------|-------------------|
| Cimento            | Água               | Pasta de cimento  |
| Pasta de cimento   | Agregado miúdo     | Argamassa         |
| Argamassa          | Agregado graúdo    | Concreto          |
| Concreto           | Aço                | Concreto armado   |
| Concreto           | Adições            | Concreto especial |

A diferença de materiais entre argamassa e concreto é somente a presença do agregado graúdo (brita), portanto para testes experimentais a aplicação de ensaios em argamassa dá uma boa representatividade de aplicação em concreto.

### **3.2. Composição do cimento e suas aplicações.**

O cimento Portland é o produto obtido pela pulverização de clínquer, sendo um material de origem mineral, e constituído basicamente de silicatos hidráulicos de cálcio, com certa proporção de sulfato de cálcio natural derivado da moagem e mistura de rochas calcárias, todos esses elementos quando misturados com água tem propriedades aglomerantes (BAUER, 2008).

#### *3.2.1 Cimento Portland comum (CP I)*

O cimento Portland comum (CP I), segundo a NBR 5732 (1991), é um aglomerante hidráulico obtido pela moagem de clínquer Portland ao qual se adiciona, durante a operação, a quantidade necessária de uma ou mais formas de sulfato de cálcio.

#### *3.2.2 Cimento Portland composto (CP II)*

O cimento Portland composto (CP II) é um aglomerante hidráulico obtido pela moagem de clínquer Portland ao qual se adiciona, durante a operação, a quantidade necessária de uma ou mais formas de sulfato de cálcio. Durante a moagem é permitido adicionar a esta mistura materiais pozolânicos, escórias granuladas de alto-forno e/ou materiais carbonáticos (NBR 11578, 1991).

Este tipo de cimento é recomendado para obras correntes de engenharia civil sob a forma de argamassa, concreto simples, armado e protendido, elementos pré-moldados e artefatos de cimento.

#### *3.2.3 Cimento Portland de alto forno (CP III)*

A NBR 5735 (1991) trata como um produto constituído em sua maior parte de silicato de cálcio com propriedades hidráulicas. Subproduto do tratamento de minério de ferro em alto-forno obtido sob forma granulada por resfriamento brusco.

É indicado a aplicação em obras de concreto-massa, tais como barragens, peças de grandes dimensões, fundações de máquinas, pilares, obras em ambientes agressivos, tubos e canaletas para condução de líquidos agressivos, esgotos e efluentes industriais, concretos com agregados reativos, pilares de pontes ou obras submersas, pavimentação de estradas e pistas de aeroportos.

#### *3.2.4 Cimento Portland pozolânicos (CP IV)*

O cimento Portland pozolânico (CP IV) é um aglomerante hidráulico obtido pela mistura homogênea de clínquer Portland e materiais pozolânicos, moídos em conjunto ou em separado. O teor de materiais pozolânicos secos deve estar compreendido entre 15% e 50% da massa total de aglomerante (NBR 5736, 1991)

Recomenda-se usar em obras expostas à ação de água corrente e ambientes agressivos.

#### *3.2.5 Cimento Portland de alta resistência inicial (CP V ARI)*

O Cimento Portland de alta resistência inicial (CP V ARI) é um produto constituído em sua maior parte por silicatos de cálcio com propriedades hidráulicas e carbonato de cálcio (NBR 5733, 1991)

Suas aplicações adequadas são em blocos para alvenaria, blocos para pavimentação, tubos, lajes, meio-fio, mourões, postes, elementos arquitetônicos pré-moldados e pré-fabricados.

#### *3.2.6 Cimento Portland branco (CPB)*

Cimento Portland branco (CPB) é um produto constituído em sua maior parte de silicato de cálcio com propriedades hidráulicas e com teores limitados de óxidos corantes que garantem a brancura exigida para este tipo de cimento. (NBR 12989, 1991)

Sua aplicação pode ser em concretos brancos para fins arquitetônico e não estrutural aplica-se em rejuntamento de azulejos.

#### *3.2.7 Cimento Portland resistente a sulfatos (RS)*

Aglomerante hidráulico que atenda à condição de resistência dos sulfatos, obtido pela moagem de clínquer Portland ao qual se adiciona, durante a operação, a quantidade necessária de uma ou mais formas de sulfato de cálcio durante a moagem, são permitidas, a esta mistura, de escória granuladas de alto-forno ou matérias pozolânicas e/ou materiais carbonáticos (NBR 5737, 1992).

A Tabela 2 resume a proporção de misturas presentes na composição do cimento cada tipo de cimento que possui suas características resultantes nas diferentes adições as quais influenciam nas propriedades do concreto, onde também podem ser acrescentados de alguns compostos químicos que dão características particulares ao concreto, como por exemplo a adição de filer calcário moído, quimicamente inerte, adicionado ao clínquer, durante a moagem, para diminuir a permeabilidade e porosidade de concretos e argamassas e melhorar trabalhabilidade. Ou adicionar também sílica ativa que é um subproduto da produção de silício metálico e ligas de ferro-silício, composto de partículas extremamente finas (100 vezes menores que as do cimento) de dióxido de silício amorfo. Atuam na pasta de cimento por efeito de micro filer ou efeito pozolânico (SOUZA *et al.*, 1998).

**Tabela 2:** Percentual dos componentes em massa do cimento (SOUZA *et al.*, 1998).

| <b>Sigla</b> | <b>Clinquer +<br/>Sulfato de cálcio</b> | <b>Escória de alto-<br/>forno</b> | <b>Material<br/>pozolânicos</b> | <b>Material<br/>carbonático</b> |
|--------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| CP I         | 100                                     | -                                 | -                               | -                               |
| CP II-E      | 94 – 56                                 | 6 – 34                            | –                               | 0 – 10                          |
| CP II-Z      | 95 – 76                                 | –                                 | 6 – 14                          | 0 – 10                          |
| CP II-F      | 94 - 90                                 | –                                 | –                               | 6 – 10                          |
| CP III       | 65 – 25                                 | 35 – 70                           | –                               | 0 – 5                           |
| CP IV        | 85 – 45                                 | –                                 | 15 – 50                         | 0 – 5                           |
| CP V         | 100 – 95                                | –                                 | –                               | 0 – 5                           |

O estudo de dosagem dos concretos de cimento Portland e os procedimentos necessários à obtenção da melhor proporção entre os materiais constitutivos do concreto, também conhecido por traço visam obter a mistura ideal e mais econômica, numa determinada região e com os materiais ali disponíveis. Essa proporção ideal pode ser expressa em massa ou em volume, sendo preferível e sempre mais rigorosa a proporção expressa em massa seca de materiais. (HELENE *et al.*, 2011).

### **3.3. Preparo de corpo-de-prova**

Conforme a NBR 5738 (2008) (Concreto - Procedimento para moldagem e cura de corpos de prova) os corpos-de-prova devem ter altura igual ao dobro do diâmetro. O diâmetro deve ser de 10 cm, 15 cm, 20 cm, 25 cm, 30 cm ou 45 cm. As medidas diametraais têm tolerância de 1 % e a altura, 2 %. Os planos das bordas circulares extremas do molde devem ser perpendiculares ao eixo longitudinal do molde. Antes de proceder à moldagem dos corpos de prova, os moldes e suas bases devem ser convenientemente revestidos internamente com uma fina camada de óleo mineral ou outro lubrificante que não reaja com o cimento. A superfície de apoio dos moldes deve ser rígida, horizontal, livre de vibrações e outras perturbações que possam modificar a forma e as propriedades do concreto dos corpos de prova durante sua moldagem e início de pega. Ao introduzir o concreto, deslocar a concha ao redor da borda do molde, de forma a assegurar uma distribuição simétrica e, imediatamente, com a haste em movimento circular, nivelar o concreto antes de iniciar seu adensamento. Colocar o concreto no molde em camadas de volumes aproximadamente iguais. Antes de iniciar a vibração de cada camada, o molde deve conter a quantidade total de concreto correspondente a essa camada. Somente quando o adensamento for realizado por vibração interna, o concreto da última camada deve ser colocado de modo que sua superfície fique no máximo 5 m abaixo da altura do molde, preenchendo totalmente o molde com concreto ao vibrar.

### **3.4. Propriedades do concreto**

As propriedades do concreto divergem em estado endurecido e fresco os quais apresentam características diferentes.

#### **3.5.1 Estado endurecido**

Tradicionalmente a deformação decorrente de cargas aplicadas é expressa em deformação específica, definida como a mudança do comprimento por unidade de comprimento; a carga é expressa em tensão, definida como a força por unidade de área. Dependendo de como agem sobre o material, as tensões poderão ser distinguidas umas das outras: por exemplo, compressão, tração, flexão, cisalhamento e torção. As relações tensão-deformação dos materiais são geralmente expressas em termos de resistência, módulo de elasticidade, ductilidade e tenacidade esclarece (CARVALHO *et al.*, 2015).

A resistência é a medida da tensão exigida para romper o material. Sendo a resistência do concreto em função do processo de hidratação do cimento, o qual é

relativamente lento, as especificações e ensaios de resistência do concreto são baseados em corpos de provas curados em condições específicas de temperatura e humidade por um período de 28 dias.

Segundo a NBR 8953 (2015), o concreto para fins estruturais – a classificação pela massa específica, por grupos de resistência e consistência, o concreto para fins estruturais deve ter resistência característica a compressão entre 20 e 100 Mpa.

As propriedades do concreto endurecido estão na obtenção de um concreto de boa qualidade para qual é necessário empregar materiais de boa qualidade, dosá-los em proporções adequadas e colocar o concreto nas fôrmas sem provocar segregação dos componentes compactando o concreto por meio de vibração (CARVALHO *et al.*, 2015).

A cura do concreto tem por finalidade impedir a evaporação da água empregada no traço, durante o período inicial de hidratação.

A resistência à compressão simples é a propriedade mecânica mais importante do concreto, não só porque o concreto trabalha predominantemente à compressão, como também, porque fornece outros parâmetros físicos que podem ser relacionadas empiricamente à resistência à compressão NBR 8953 (2015).

### 3.5.2 Propriedades do estado fresco

A consistência do concreto fresco é estabelecida por MEHTA *et al.* (1994) como uma propriedade relacionada com o estado de fluidez da mistura. A consistência adequada é fundamental para garantir a trabalhabilidade do concreto, ou seja, a facilidade com que o concreto pode ser colocado num certo tipo de fôrma, sem segregação.

A consistência do concreto é geralmente medida no ensaio de abatimento (slump test). O concreto fresco é compactado no interior de uma fôrma troco-cônica, com altura de 30 cm. Retirando-se da fôrma, por cima do concreto, este sofre um abatimento, cuja medida em centímetros é usada como valor comparativo da consistência (MEHTA *et al.*, 1994).

A consistência e a trabalhabilidade dependem da composição do concreto, e, em particular, da quantidade de água da granulometria dos agregados, da presença de aditivos, etc.

A dosagem do concreto deve levar em conta a consistência necessária para as condições da obra. Peças finas e fortemente armadas necessitam misturas mais fluidas que peças de grande largura e com pouca armação (CARVALHO *et al.*, 2015).

### 3.6 Patologias no concreto

Desde o início da civilização o homem tem se preocupado com a construção de estruturas adaptadas às suas necessidades, sejam elas habitacionais ou de infraestrutura. Em função disso, acumulou-se um grande acervo científico ao longo dos séculos, o que permitiu o desenvolvimento da tecnologia da construção, abrangendo a concepção, o cálculo, a análise e o detalhamento das estruturas, a tecnologia de materiais e as respectivas técnicas construtivas (SOUZA *et al.*, 1998).

No caso de concreto, Helene *et al.*, (2011) alerta os efeitos degenerativos manifestam-se na forma de manchas superficiais causadas pelos produtos de corrosão, seguidas por fissuras nas estruturas, destacamento do concreto de cobrimento, redução da seção resistente das armaduras com frequente seccionamento de estribos, redução e eventual perda de aderência das armaduras principais, ou seja, deteriorações que levam a um comprometimento da segurança estrutural ao longo do tempo. Por isso é importante ter um concreto com características específicas e cura adequada para que manifestações patológicas não apareçam na estrutura de concreto armado, que pode apresentar-se devido ao aparecimento de fissuras no concreto e posterior penetração de água no interior que acarretará na corrosão da armadura comprometendo o funcionamento da mesma, além de pôr em risco a vida dos usuários.

A vida útil de uma estrutura depende, dentre outros fatores, da forma como foi projetada, as características disponibilizadas pelo projeto e seu detalhamento tem uma atuação importante na durabilidade dessa estrutura caracteriza Helene *et al.*, (2011). Os problemas patológicos, salvo raras exceções, apresenta manifestação externa característica, onde a partir destas, pode-se deduzir sua natureza, origem e os mecanismos dos fenômenos envolvidos, bem como estimar suas prováveis consequências que só ocorrem após o início da execução e a última etapa da fase da produção.

A grande maioria dos problemas patológicos expõem manifestações particulares, que examinados pode-se julgar a natureza, a origem e os mecanismos dos fenômenos abrangidos, com o objetivo de se conseguir suas prováveis decorrências. Os sintomas, também chamados: lesões, danos, defeitos ou manifestações patológicas, podem ser avaliados e qualificados para nortear uma primeira apreciação, partindo de meticolosas notas visuais. As indicações mais frequentes de danos em edificações de concreto armado são: fissuras, eflorescências, flechas excessivas, manchas, corrosão de armaduras e ninhos de concretagem, segregação dos materiais constituintes do concreto (HELENE *et al.*, 2011).

### 3.6.1 Fissuras

As fissuras são caracterizadas por uma pequena abertura causada pela ruptura de um material ou elemento e representa a maior porcentagem de patologias para os concretos, segundo a NBR 9575 (2010) são classificadas de acordo com a sua abertura (em mm). As aberturas inferiores a 0,05 mm são chamadas de microfissuras, com até 0,5 mm são chamadas de fissuras e, por fim, as maiores de 0,5 mm e menores de 1,0 mm são chamadas de trincas.



**Figura 2:** Fissura no concreto. Fonte: <http://www.clubedoconcreto.com.br.html> (Acessado 10 de maio 2017)

O aparecimento de fissuras é instigado por tensões, essas tensões são originadas pelos elementos e componentes de uma edificação quando toleram variações térmicas, sazonais e diárias. Essas variações cogitam numa modificação dimensional dos materiais de construção (dilatação ou contração); os movimentos de dilatação e contração são limitados pelos múltiplos vínculos que abrangem os elementos e componentes (THOMAZ., 1989).

As fissuras podem ainda ocorrer por outras causas, como retração plástica térmica ou devido a reações químicas internas do concreto nas primeiras idades, devendo ser evitadas ou limitadas por cuidados tecnológicos, especialmente na definição do traço e na cura do concreto (NBR 6118, 2014)

Os fatores que mais originam as fissuras, são tipicamente ocasionados por: retração, variação de temperatura, esforços de tração compressão, flexão cortante, torção, ou então causadas por corrosão nas armaduras, recalque das fundações ou movimentações higroscópicas (CAMADURO *et al*, 2000). Além disso, fissuras causadas por recalques

em fundações incidem com mais constância quando as armaduras presentes nos elementos forem deficientes ou permanecerem mal posicionadas, são fissuras que sobrevêm em vigas e tem aberturas modificáveis.

Outra forma de fissura, é a retração plástica que ocorre antes do endurecimento do concreto e as duas estão coligadas com a exsudação. De acordo com o Manual Departamento Nacional de Estradas de Rodagem (DNER, 1996), as fissuras de retração plástica aparecem imediatamente depois do adensamento e acabamento da superfície horizontal do concreto. Ela é gerada pela breve perda da água de amassamento, que acontece por absorção exagerada das formas ou, sobretudo pela dissipação. Posteriormente o lançamento e a vibração do concreto, a areia e as pedras, com densidades maiores tendem a sedimentar dentro da pasta de cimento, com densidade mínima, originando então o chamado auto-adensamento dos sólidos. Parte da água (a que não está reagindo com o cimento), com a mais baixa densidade em meio os citados, sobe, e aflora na face da laje.



**Figura 3:** Fissuras por retração na fase plástica do concreto devido à perda rápida de água e ausência de cura. Fonte - <http://construcaomercado.pini.com.br> (Acessado 10 mai. 2017)

### ***3.7 Controle da fissuração***

Fissuração em elementos estruturais de concreto armado é inevitável, devido à grande variabilidade e à baixa resistência do concreto à tração; mesmo sob as ações de serviço (utilização), valores críticos de tensões de tração são atingidos. Visando obter



bom desempenho relacionado à proteção das armaduras quanto à corrosão e à aceitabilidade sensorial dos usuários, busca-se controlar a abertura dessas fissuras (NBR 6118, 2014)

Nas estruturas com armaduras ativas (concreto protendido), existe também, com menor probabilidade, a possibilidade de aparecimento de fissuras. Nesse caso as fissuras podem ser mais nocivas, pois existe a possibilidade de corrosão sob tensão das armaduras (NBR 6118, 2014)

### **3.5. Métodos de recuperação de estruturas**

Manutenção de uma estrutura é o conjunto de tarefas necessárias à garantia do seu desempenho satisfatório ao longo do tempo, ou seja, o conjunto de rotinas que tenham por finalidade o prolongamento da vida útil da obra, a um custo compensador. Em termos de manutenção fica clara a corresponsabilidade, pois proprietários, investidor e usuários sempre deverão estar dispostos a amparar os custos com o sistema de manutenção concebido pelos projetistas, que deverá ter sido respeitado e viabilizado pelo construtor. A base deste sistema, aliás, será o conjunto de inspeções rotineiras, em que o usuário será figura preponderante (SOUZA, 1998)

Os elementos utilizados em reparos vão desde materiais normalmente utilizados na etapa da construção até materiais específicos para reparo e com características específicas para cada tipo de reparo (BAUER, 2008).

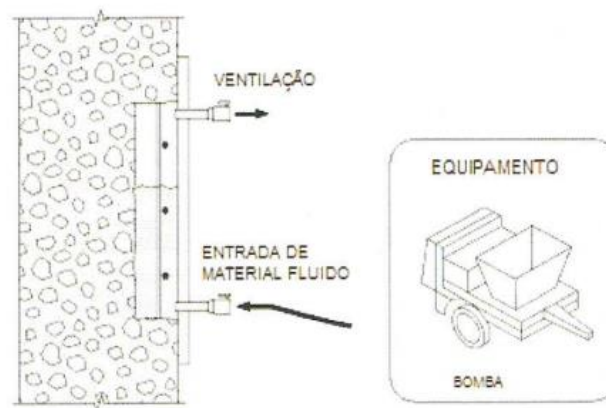
Nos Estados Unidos da América passa de 4 bilhões de dólares anualmente em termos de custos diretos de manutenção em pontes de concreto. E que gastam 45% do seu custo anual de manutenção construção na de estruturas de concreto existentes. Com a capacidade de auto-cura, em concreto, a formação e propagação de fissuras podem ser reduzidos e pode ser obtido um concreto com microestrutura densa. Como resultado, estruturas de concreto mais duráveis, o custo de manutenção pode ser reduzido (KHALIQ *et al*, 2016)

#### **3.8.1 Métodos convencionais**

Diferentes estratégias são usadas para retardar a propagação das aberturas no concreto levando a maior durabilidade. No entanto, a maioria das estratégias, como sistemas epóxi, resinas acrílicas e silicone com base em polímeros, envolvem o uso de

materiais que não são compatíveis com concreto, caro e perigoso principalmente ao ambiente (KHALIQ *et al*, 2016).

Para o tratamento convencional de uma estrutura, deve-se fazer um corte do contorno da abertura no concreto com espessura entre 0,5 e 1,0 cm, limpeza da superfície com jato de água fria sob alta pressão, jato de água quente sob alta pressão, remoção de óleos e graxas superficiais, montagem da forma e aplicação do microconcreto fluido (HELENE *et al*, 2011)



**Figura 4:** Tratamento de aberturas no concreto com aplicação do microconcreto fluido.  
Fonte: <http://www.reitec.com.br> (Acessado 10 mai. 2017)



**Figura 5:** Tratamento de aberturas no concreto com métodos convencionais. Fonte: <http://www.reitec.com.br> (Acessado 10 mai. 2017)

### 3.8.2 Processo de Auto-cura

Um dos materiais mais utilizados na construção civil é o concreto. No entanto, é bastante vulnerável a rachar devido a sua heterogeneidade (LI *et al.*, 2016), visto que as aberturas são um tipo de defeitos comum nas estruturas de concreto (ALGHAMRI *et al.*, 2017), a formação de rachaduras oferece um caminho simples para penetrar água e outras substâncias agressivas no interior da matriz de concreto (WANG *et al.*, 2012). Várias técnicas de reparação estão disponíveis para corrigir as rachaduras. Atualmente, manutenção e reparação de estruturas de concreto contam com programas de inspeção regular, que são onerosos e eles também dependem de uma combinação de ensaios não destrutivos e percepção humana (ALGHAMRI *et al.*, 2017). Há outras técnicas para reparar as rachaduras pelos materiais constituintes do próprio concreto chamado concreto auto-curável. (VIJAY *et al.*, 2017).

O conceito de bio-calcificação *in vitro* foi iniciado no início do século XX com a descoberta do papel de algumas bactérias marinhas na formação de calcita no mar surgindo então ao fenômeno da precipitação de carbonato de cálcio por bactérias marinhas. Em seguida clareou este conceito ao verificar que a calcificação é um processo rotineiro no solo e formação de calcita mostrou experimentalmente por algumas bactérias presentes no solo, como *Bacillus (Sporosarcina) pasteurii* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Estudos realizados na década de 90 por GOLLAPUDI *et al* 1998 pode demonstrar a aplicabilidade da *Sporosarcina (bacilo) pasteurii* para ligar as fissuras nas superfícies de pedra. E logo após o trabalho foi estendido para ensaiar a atividade da urease e verificar a deposição de calcita devido à atividade bacteriana por STOCK-FISCHER *et al* 1999. Que usou o termo bacteriana induzida por precipitação de calcita (MICP) pela primeira vez abordar este fenômeno. Ultimamente, a precipitação de calcita bacteriana induzida chegou a estabelecer-se como uma área de pesquisa para a integração em tempo real e otimização de componentes biológicos e engenharia do processo.

Bactérias são capazes de mediar a precipitação de minerais, com a mineralização biologicamente controlada como a formação de magnetita por bactérias, ou por mineralização biologicamente induzida, que são os processos dominantes entre bactérias. Sob condições apropriadas, a maioria das bactérias são capazes de induzir a precipitação de carbonato. Esse precipitado biogênico é ambientalmente amigável, mais durável e mais compatível com os materiais de construção; devido a isto, precipitação de carbonato induzido por microrganismos está sendo utilizada com o objetivo de aplicação na construção civil (WANG *et al.* 2015).

### **3.8.2.1 Biomineralização**

Biomineralização é a alteração química de um ambiente por atividade microbiana que resulta em precipitação de minerais (STOCKS-FISCHER *et al* 1999; BARKAY e SCHAEFER, 2001; PHILLIPS *et al* 2013). Na natureza, biomineralização é um fenômeno frequente, levando à formação de mais de 60 diferentes minerais biológicos. Cristais formados através da biomineralização consistem em minerais inorgânicos, mas eles podem conter também rastreamento elementos de compostos orgânico, que podem regular o processo de biomineralização (YOSHIDA *et al* 2010). Existem três diferentes mecanismos envolvidos na produção de biomineral:

- Mineralização biologicamente controlada consiste em atividades celulares que especificamente direta a formação de minerais (LOWENSTAM e WEINER 1989; BENZERARA *et al* 2011; PHILLIPS *et al*. 2013). Neste processo, os organismos controlam nucleação e crescimento de minerais. Os minerais são sintetizados diretamente em um local específico dentro ou na célula, mas apenas sob determinadas condições.
- Mineralização biologicamente influenciada é o processo pelo qual precipitação mineral passiva é causada pela presença de matéria orgânica superficial de células como substâncias poliméricas extracelulares associadas com biofilmes (BENZERARA *et al* 2011; PHILLIPS *et al* 2013).
- Mineralização biologicamente induzida é a modificação química de um ambiente por atividade biológica que resulta em supersaturação e a precipitação de minerais (LOWENSTAM e WEINER 1989; STOCKS-FISCHER *et al*, 1999; DE MUYNCK *et al* 2010; PHILLIPS *et al* 2013).

### **3.8.2.2 Precipitação de calcita bacterianamente induzida**

A precipitação de calcita bacterianamente induzida (MICP do inglês, Microbially Induced Calcite Precipitation) refere-se à formação de carbonato de cálcio de uma solução supersaturada devido à presença de suas células microbianas e atividades bioquímicas (BOSAK, 2011). Durante MICP, organismos são capazes de secretar um ou mais produtos metabólicos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) que reagem com íons ( $\text{Ca}^{2+}$ ) no ambiente resultando em subsequente precipitação de minerais.

Uma grande variedade de genótipos bacterianos é conhecida por possuir a capacidade para a formação de calcita sob condições adequadas a escolha da bactéria certa é muito importante para sucesso objetivo-tação de uma estratégia de bio-concreto. Dentre elas, algumas bactérias já foram testadas em relação a eficiência de calcificação para a aplicação na auto-cura de concreto. No entanto, nem todos podem ser utilizados para um papel na melhoria das características de argamassas de cimento ou remediação de fissuras. Argamassas de cimento caracterizam-se por pH superior a 11, baixa umidade, após a cura e a falta de aeração dentro de espaços vazios. Só bactérias cujas as células vegetativas e esporos podem suportar estas condições desafiadoras qualificariam para aplicação em tecnologia bio-argamassa. Alternativamente, genes relevantes de diferentes genótipos podem ser agrupados para construir uma estirpe de propósito especial. E matrizes de argamassa. Como tal, esta espécie parece ser o genótipo mais adequado para indução de calcificação em argamassas de cimento.

A atividade ureásica é provocada pela bactéria amplamente prevalente e aplicação desses organismos na melhoria e reparação de estruturas de cimento e pedras são a opção mais extensivamente estudada e seriamente considerada. Tendo evoluído em solo, estas bactérias podem funcionar sob uma ampla gama de níveis de umidade, temperatura e pH. Eles também oferecem a facilidade de crescimento *in vitro* e manipulação para a incorporação do material viável. Pelo contrário, outros microrganismos capazes de calcificação requerem condições especiais e específicas para o seu crescimento e atividade; e, portanto, pouca atenção tem sido dedicada para testá-las para aplicações em tempo real. Estudos estão sendo perseguidos vigorosamente para aplicar este processo nas áreas acima mencionadas de melhorar as características de argamassa e correção de rachaduras. Além destas duas grandes áreas, outros potenciais aplicativos deste fenômeno também têm sido sugeridos e testadas tais como a melhoria do solo, permeabilidade modificação de meios porosos, conservação de pedra, auto-cura, melhorar as propriedades de agregados grosseiro reciclado e muitos outros diversos campos (AL-SALLOUM *et al.* 2017).

Atualmente a atividade da urease é encontrada em uma ampla gama de microrganismos, mas algumas cepas produzem particularmente altos níveis de urease (Tabela 3). Por exemplo, *Sporosarcina pasteurii* (anteriormente *Bacillus pasteurii*) extraída de um solo não-patogênico e endósporo produzindo crescimento de bactérias com um pH ótimo 9.0 que pode tolerar condições extremas. Nesse sentido, o uso desta estirpe vem sendo estudada extensivamente para MICP (ACHAL e PAN 2014; ACHAL

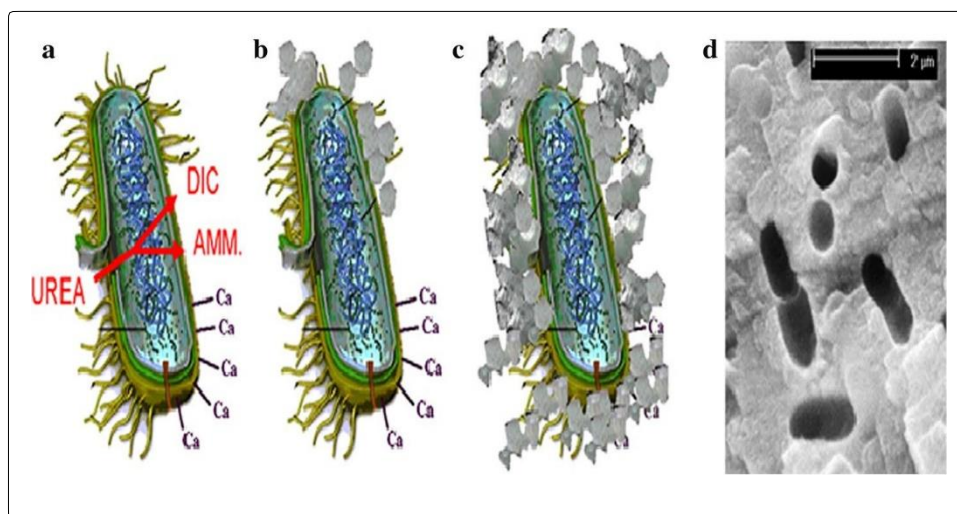
*et al* 2009; SARADA *et al*, 2009; OKWADHA e LI 2010; DHAMI *et al* 2013). No entanto, a precipitação de carbonato de cálcio por bactérias através de hidrólise da ureia é o método amplamente utilizado (DE MUYNCK *et al*. 2010).

O processo de precipitação de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) é um mecanismo simples e facilmente controlável do MICP que pode produzir altas concentrações de  $\text{CaCO}_3$  em curto período de tempo (DHAMI *et al*. 2013a). Urease influencia o processo químico associado com a formação de biomineral através de quatro diferentes parâmetros (HAMMES e VERSTRAETE 2002) tais como pH, concentrações de carbono inorgânico dissolvidos, concentrações de cálcio e a disponibilidade de sítios de nucleação. Os três primeiros parâmetros interferem na concentração de íons carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), enquanto o último parâmetro é muito importante para a formação de carbonato de cálcio estável e contínuo (PHILLIPS *et al*. 2013). No processo de biomineralização, bactérias servem como sítios de nucleação. Todos estes parâmetros afetam grandemente a atividade de ureolítica ou a formação de cristais de  $\text{CaCO}_3$ .

**Tabela 3:** Urease, produzindo bactérias de diversas fontes e quantidade de precipitação de atividade e calcita da urease. (ANBU *et al*, 2016).

| Bactéria                         | Local de isolamento                           | Atividade de urease | Precipitação de calcita   | Referência                    |
|----------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------------|
| <i>Bacillus sp.</i> CR2          | Mine tailing soil<br>Urumqi, China            | 432 U/mL            | 2.32 mg/cell mass<br>(mg) | Achal e Pan<br>(2014)         |
| <i>Sporosarcina pasteurii</i>    | Phenotypic mutant<br>strain                   | 550 U/MI            | –                         | Achal et al.<br>(2009a)       |
| <i>B. pasteurii</i> NCIM<br>2477 | Culture obtained<br>from NCIM, Pune,<br>India | 18 U/MI             | –                         | Sarada et al.<br>(2009)       |
| <i>K. flava</i> CR1              | Mining ore soil,<br>Urumqi, China             | 472 U/mL            | –                         | Achal et al.<br>(2011)        |
| <i>B. megaterium</i> SS3         | Calcareous soil,<br>Andhra Pradesh,<br>India  | 690 U/mL            | 187 mg/100 ml             | Dhami et al.<br>(2013b, 2014) |
| <i>B. thuringiensis</i>          | Calcareous soil,<br>Andhra Pradesh,<br>India  | 620 U/mL            | 167 mg/100 ml             | Dhami et al.<br>(2013b)       |

A superfícies da célula bacteriana tem carga negativa grupos que agem como catadores de cátions divalentes (por exemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), vinculando-os nas suas superfícies de célula em pH neutro, que fazem o local de nucleação ideal para deposição de calcita (FERRIS *et al.*, 1996; STOCKS-FISCHER *et al.*, 1999). No entanto, íons ( $\text{Ca}^{2+}$ ) podem vincular mais frequentemente na superfície celulares de bactérias carregadas negativamente do que ( $\text{Mg}^{2+}$ ) devido a terem maior poder de seletividade iônica (SANCHEZ-ROMAN *et al.*, 2007). Posteriormente, o cátion acoplado (íons metálicos) reage com ânions (carbonato), a forma de carbonato de cálcio em uma forma insolúvel (Figura 6). As células bacterianas são muito importantes para a precipitação do  $\text{CaCO}_3$ , porque as bactérias fornecem locais de nucleação heterogêneos e afetam os tipos específicos de minerais formados (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2012).

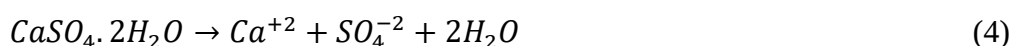


**Figura 6:** Ureólise conduzindo a precipitação de calcita. Fonte: DE MUYNCK *et al.*, 2010

A fotossíntese é a forma mais comum de precipitação microbiana de carbonato. Este processo baseia-se na utilização metabólica do  $\text{CO}_2$  dissolvido, que se equilibra com o  $\text{HCO}^-$  e  $\text{CO}$  ao redor da bactéria (Equação 1). Tal reação induz a uma mudança no equilíbrio do bicarbonato e subsequentemente um aumento no pH na maior parte do meio (Equação 2 e 3). (GONZÁLEZ *et al.*, 2014)



Outro tipo de processo que precipita carbonatos é aquele que envolve o ciclo do enxofre, especificamente a redução do sulfato. A reação começa com a dissolução do gipso:  $CaSO_4 \cdot 2H_2O / CaSO_4$  (Equação 4). Nestas circunstâncias, a matéria orgânica pode ser consumida pela bactéria sulfato redutora e o enxofre e o  $CO_2$  metabólico são liberados (Equação 5).



A precipitação, especificamente, do carbonato de cálcio ( $CaCO_3$ ) ocorre pela reação de equilíbrio apresentada na Equação 6.



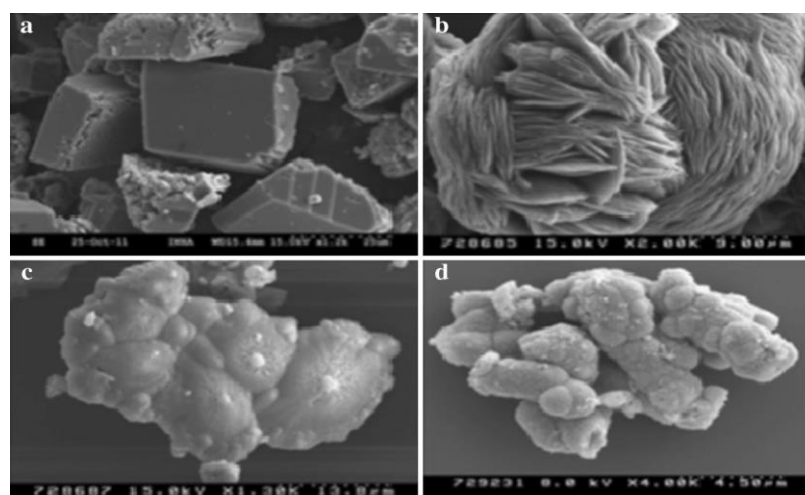
Além disso, GONZÁLEZ *et al* (2014), observaram que bactérias isoladas *Bacillus spp.*, são capazes de induzir a precipitação de carbonato de cálcio na adição de nutrientes, como cálcio, extrato de levedura e glicose que foram usados para estabilizar o solo. Dentro das propriedades do solo que se têm modificado, a partir das precipitações originadas pela adição do nutriente, são: a redução do índice de vazios, do limite de liquidez, do índice de plasticidade, da permeabilidade, do índice de colapso e da erodibilidade, o aumento da sucção e das resistências, à compressão simples e ao cisalhamento. O efeito destas variações se vê refletido na maior estabilidade estrutural dos grãos, no melhor desempenho dos agregados e na menor deformabilidade da massa de solo, apontando assim para a possibilidade de utilização da técnica de biomineralização na solução de problemas da engenharia.

Assim, espécies do grupo *Bacillus* são capazes de precipitar calcita por conversão de ureia em amônia e dióxido de carbono. A degradação bacteriana da ureia basicamente aumenta o pH e promove a deposição microbiana de dióxido de carbono como carbonato de cálcio em um ambiente rico de cálcio (GONZÁLEZ *et al*, 2014).



A precipitação de carbonato de cálcio induzida por bactérias tem sido proposta como uma técnica alternativa e ambiental para desenvolver um sistema de materiais cimentícios com auto-cura. Neste sistema, o agente de auto-cura é baseado em bactérias, que consiste nas bactérias formadoras de esporos de resistência alcaloide e um substrato específico devem ser adicionados aos materiais de cimento no processo de mistura. As bactérias podem formar esporos dormentes em ambientes extremos de materiais cimentícios. Quando o concreto apresenta aberturas, os esporos dormentes podem ser ativados pela água e oxigênio que entram através das rachaduras. Então, o substrato no concreto de matriz cimentícia poderia ser metabolizado por bactérias ativadas para produzir carbonato de cálcio precipitando após uma série de reações bioquímicas e atingir o objetivo de auto-cura de concreto (LUO *et al*, 2016)

Para um concreto realizar este processo faz necessário um agente de cura sendo um microrganismo este agente causador da cura que ficará intacto durante a mistura sendo ativado somente ao aparecer à abertura. Mediante a formação de fendas, o agente de cura ativa e preenche a abertura por precipitação de  $\text{CaCO}_3$ . Embora o fechamento da fenda possa ser caracterizado através de observações visuais, a propriedade funcional de um material de auto recuperação, ou seja, a capacidade de selar a abertura e recuperar a tensão de resistência do concreto devem ser investigados de forma diferentes (TZIVILOGLOU *et al*, 2016). Bem como, avaliar as diferentes formas dos cristais de carbonato conforme a Figura 7 onde indica que a formação de cristais pode ser oriunda de cloreto de cálcio, acetato do cálcio, lactato de cálcio, gluconato de cálcio.



**Figura 7:** Micrografias de varredura de elétrons mostrando os efeitos das fontes de cálcio diferentes sobre a forma dos cristais formados. Cloreto de cálcio (a), o acetato do cálcio (b), lactato de cálcio (c), gluconato de cálcio (d). Fonte: GOROSPE *et al*. 2013.

### 3.6. Indutores de bioprecipitação

O processo de auto-cura está diretamente relacionado com a produção de carbonato de cálcio, que depende de muitos fatores, incluindo o pH do carbono inorgânico dissolvido, concreto, sítios de nucleação e presença de íons de cálcio durante a mistura. Além disso, outras variáveis tais como tipo de bactérias, suas concentrações diferentes, vários procedimentos de cura e material utilizado para a incorporação de bactérias também contribuam para a auto-cura eficiente do concreto. Para a melhor ação em profundidade em matriz de concreto e para manter as bactérias prontamente disponíveis, estas bactérias junto com composto orgânico mineral precursor são incorporadas no concreto durante a fase de mistura, em vez de aplicação externa. Entre as diferentes bactérias capazes de cura das rachaduras e suas técnicas de incorporação no concreto utilizados para finalidade de auto-cura, há necessidade de identificar a eficácia das bactérias (KHALIQ *et al*, 2016).

Espécies específicas de bactérias são capazes de produzir diferentes quantidades, formas e tipos de cristais de carbonato, tais como calcita, aragonita e dolomita. Bactérias do gênero *Bacillus* têm a capacidade de precipitar  $\text{CaCO}_3$  quando incubadas em nutrientes, tais como extrato de levedura, glicose, acetato de cálcio e ureia, desta forma aumentando o número de cristais precipitados (VALENCIA-GONZÁLEZ., *et al* 2015). Portanto o uso de determinados compostos, que possam estabilizar ou como fonte controlada de nutrientes para o microrganismo, pode aumentar o poder de auto-cura do concreto. Neste sentido o uso de solventes eutéticos pode contribuir para estabilizar ou induzir o processo de auto-cura de concreto.

#### 3.6.1. Tipo de bactéria

O tipo de bactéria é essencial para a produção de capacidade da urease. Muitas bactérias produtoras de urease têm sido investigadas, incluindo *Aerobacter aerogenes*, *b. megaterium*, *b. subtilis*, *Bacillus* SP. CR2, *b. thuringiensis*, *halophila d.*, *Halmonas eurihalina*, *Helicobacter pylori*, *Kocuria flava* CR1, *L. sphaericus* CH5, *Methylocystis parvum*, *Myxococcus xanthus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas denitrificans*, *Spoloactobacillus* SP., *ginsengisoli* *Sporosar-cina* e *Sporosarcina pasteurii* (PEREZ-PEREZ *et al* 1994; RIVADENEYRA *et al* 1998; STOCKS-FISCHER *et al*, 1999; CHEKROUN *et al*, 2004; KARATAS *et al*, 2008;; ACHAL *et al*. 2011, 2012b; DHAMI *et al* 2013b, 2014; GOROSPE *et al* 2013; GANENDRA *et al* 2014; KANG *et al*. 2014). Grupo de *Bacillus* é um tipo comum de bactérias utilizadas para a produção de

precipitação urease e calcita. Por exemplo, *Sporosarcina pasteurii* o principal organismo usado para múltiplas aplicações tais como remediação de metais pesados e radionuclídeos, auto-cura no concreto e melhoria do solo (SARADA *et al.* 2009; GOROSPE *et al* 2013; LAUCHNOR *et al.* 2013; LI *et al* 2013), enquanto *b. megaterum* é usado para realçar a força de estruturas de concreto e durabilidade de materiais de construção (DHAMI *et al* 2014). *L. sphaericus* CH-5 e *K. flava* CR1 são utilizados para a remoção de cádmio e chumbo, respectivamente, do ambiente (KANG *et al.* 2014a).

### 3.6.2. Concentração de células de bactérias

Altas concentrações de células bacterianas (de  $10^6$  a  $10^8$  células) aumentam a quantidade de precipitação calcita pela MICP, através do aumento da concentração da urease para a hidrólise da ureia (OKWADHA e LI 2010). Portanto, a hidrólise da ureia tem uma relação direta com concentrações de célula bacterianas (NG *et al.* 2012). STOCKS-FISCHER *et al.* (1999) relatou que células bacterianas serviram como sítios de nucleação para a precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , porque a disponibilidade do local da nucleação é muito importante para precipitações de calcita (NG *et al.* 2012). STOCKS-FISCHER *et al.* (1999) comparou a eficiência de precipitação de  $\text{CaCO}_3$  bacteriana induzida com precipitação quimicamente induzida em pH 9.0. As células bacterianas fornecem os sítios de nucleação para a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  e criam um ambiente alcalino para a indução de maior crescimento de calcita (STOCKS-FISCHER *et al.*, 1999).

### 3.6.3. pH

O princípio de auto-cura microbiana do concreto é baseado na precipitação de carbonato pelas bactérias adicionadas no concreto junto com nutriente e indutores de precipitação durante o processo de mistura. Ao aparecer a abertura, bactérias em torno da superfície de concreto serão ativadas e irá precipitar  $\text{CaCO}_3$  e curar esta abertura. O pH no concreto é alto, em torno de 12.5 – 13, que é uma condição ruim para as bactérias visto que para a maioria das bactérias crescem melhor em uma faixa estreita de pH perto da neutralidade, entre pH 6,5 e 7,5. Além disso, a matriz de cimento gradualmente torna-se uma estrutura densa devido a hidratação contínua. A maioria dos poros é menor do que  $0,5\ \mu\text{m}$ , enquanto o tamanho das bactérias é na faixa de  $1\sim3\ \mu\text{m}$ . Portanto, há uma grande chance de que as bactérias dentro da matriz seriam espremidas e esmagadas (DICK *et al.*, 2006).

A precipitação de calcita é influenciada pelo pH porque a enzima urease só estará ativa em valores de pH específicos para a hidrólise da ureia. Desta maneira, o pH ótimo para urease é 8,0, valor que a atividade da enzima diminui (STOCKS-FISCHER *et al.* 1999; GOROSPE *et al.* 2013). Um pH elevado é muito importante para a produção de amônia por hidrólise de ureia. Bactérias aeróbias libertam CO<sub>2</sub> através de respiração celular, que é em paralelo por um aumento no pH devido à produção de amônia (NG *et al.* 2012). Se os níveis de pH, são baixos, o carbonato tende a dissolver-se, em vez de precipitar (LOEWENTHAL e MARAIS 1978). A maioria das precipitações de calcita ocorre sob condições alcalinas de pH 8,7 a 9,5 (STOCKS-FISCHER *et al.* 1999; FERRIS *et al.*, 2003), já as condições apropriadas para a aplicação na auto-cura do concreto bactérias produtoras de urease são em concentrações elevadas de sal inorgânico e pH acima de 8,5.

#### 3.6.4. Temperatura

Como outras reações enzimáticas, a catálise da ureia pela urease é dependente da temperatura. A temperatura ótima para a maioria dos intervalos de ureases está entre 20 a 37 ° C (MITCHELL e FERRIS 2005; OKWADHA e LI 2010) e a faixa ótima da reação enzimática depende das condições ambientais e concentração dos reagentes no sistema. MITCHELL e FERRIS (2005) referiram que a atividade da urease aumentou cerca de 5 vezes e 10 vezes quando a temperatura aumentou de 15 a 20 ° C e 10 a 20 ° C, respectivamente. FERRIS *et al.* (2003) investigou a taxa de cinética de urease e a dependência de temperatura de ureolítica precipitação de CaCO<sub>3</sub> por *b. pasteurii* a 10 e 20 ° C em de águas subterrâneas artificial. DHAMI *et al.* (2014) encontraram que a atividade de urease foi completamente estável a 35 ° C, mas quando a posição tem aumentado a 55 ° C, a atividade da enzima diminuiu quase 47%.

#### 3.6.5. Concentração de ureia e Ca<sup>+</sup>

A hidrólise da ureia pela urease não só aumenta o pH, mas também usá-la como uma fonte de nitrogênio e energia (MOBLEY e HAUSINGER, 1989; ACHAL *et al.* 2009). É possível que os microrganismos individuais possam produzir amônia como resultado da hidrólise enzimática da ureia para criar um microambiente alcalino em torno da célula e aumentar o pH, subsequentemente, induzindo a precipitação do CaCO<sub>3</sub> (STOCKS-FISCHER *et al.*, 1999).

Superfícies de células microbianas têm carga negativa e agem como catadores para cátions, particularmente  $\text{Ca}^{2+}$ , em ambientes aquáticos, vinculando-os nas suas superfícies de célula; nesse sentido, microrganismos atuam como locais ideais de nucleação de cristal (STOCKS-FISCHER *et al.* 1999). Portanto, a fonte de cálcio ideal e a concentração são importante para a precipitação de  $\text{CaCO}_3$ .

No entanto, altas concentrações de ureia e  $\text{CaCl}_2$  (acima de 0,5 M) diminuem a eficiência de precipitação de calcita (OKWADHA e LI 2010), entretanto há o aumento da eficiência em baixas concentrações (0,05-0,25 M). Na verdade, o  $\text{Ca}^{2+}$  não é provavelmente utilizado pelos processos metabólicos, mas acumula-se fora da célula, onde está prontamente disponível para a precipitação de  $\text{CaCO}_3$ . OKWADHA e LI (2010) informou que a quantidade de precipitação de  $\text{CaCO}_3$  depende da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  mais do que da concentração de ureia. HAMMES *et al.* (2003a) ao analisar a importância do  $\text{Ca}^{2+}$  para a atividade da urease constata essa atividade enzimática aumentada dez vezes na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  em comparação a ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ . Já a precipitação do cálcio por *Bacillus SP.* CR2 em caldo contendo ureia como nutriente. Entre as várias fontes de cálcio, cloreto de cálcio é melhor para a produção de calcita, bem como a maior atividade da urease (JULIO E PAN, 2014).

### **3.7. Aplicação do MICP**

O processo MICP é uma tecnologia eficaz e ecológica que pode ser aplicada para resolver vários problemas ambientais, incluindo remediação de metais pesados e radionuclídeos, bioconsolidação, biocimento, sequestro de  $\text{CO}_2$  e outras aplicações (DE MUYNCK *et al* 2010; MITCHELL *et al*, 2010; YOSHIDA *et al*, 2010; HAMDAN *et al* 2011; ACHAL *et al* 2012a, c).

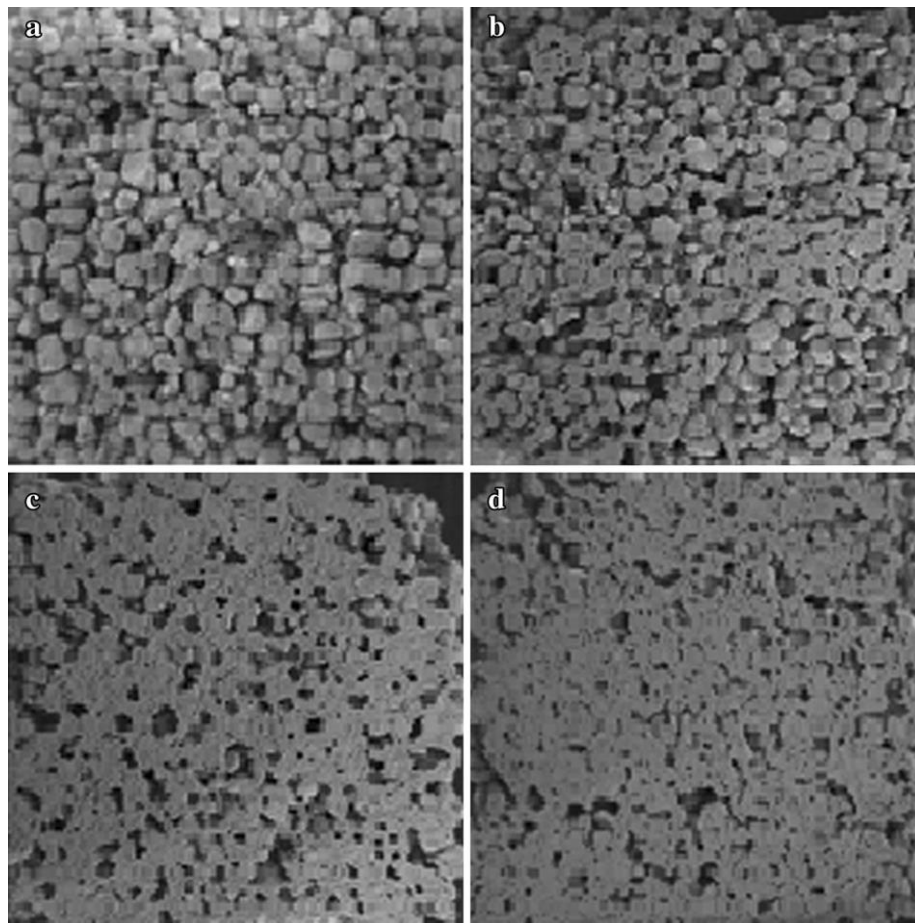
#### **3.7.1. Concentração de ureia e $\text{Ca}^{2+}$**

O cimento é amplamente utilizado como um material de construção para reforçar o solo (STABNIKOV *et al.* 2013). No entanto, a produção de cimento tem impactos ambientais durante todas as fases de fabricação. Além disso, a produção global de cimento é responsável por cerca de 5% do consumo total de energia industrial e 5% das emissões antropogênicas de  $\text{CO}_2$  (WORREL *et al.*, 2001).

Grout químico, que pode ser usado no lugar de cimento para fortalecer o solo, emprega silicato de sódio, cloreto de cálcio, hidróxido de cálcio, acrilatos e acrilamida para ligar a partículas do solo (IVANOV e CHU 2008). No entanto, esse método é caro e

tóxico para os seres humanos e o ambiente (DEJONG *et al.*, 2006; IVANOV e CHU 2008). Portanto, alternativas econômicas para reboco químico são necessárias. Biocimento é uma alternativa ao cimento e rejantes químicas (DE MUYNCK *et al.* 2010; STABNIKOV *et al.* 2011) que pode produzir materiais de construção via tratamento MICP para selar fissuras, melhorar a resistência e a durabilidade de materiais cimentícios (PHILLIPS *et al.* 2013; DHAMI *et al.* 2014).

Materiais de cimentação do solo incluem carbonatos, hidróxidos, fosfatos, silicatos e sulfetos (Figura 8) (IVANOV e CHU 2008). Carbonato de cálcio é usado principalmente em biocimentação porque ela é comumente encontrada na natureza. Biocimento pode melhorar a força de cisalhamento do solo através da produção de materiais de ligação-partículas de solo em resposta à introdução de bactérias e cimentação reagentes no solo (NG *et al.* 2012).



**Figura 8:** Digitalização de micrografia eletrônica mostrando o solo bioconsolidado de *L. sphaericus* WJ-8. (a) água, (b) media YAU, (c) célula vegetativa, (d) célula vegetativa e esporos. Fonte: GOROSPE *et al.* 2013.

Diferentes cepas bacterianas foram mostradas para produzir vários níveis de atividade da urease, variando de 2,2 a 20 mM de ureia hidrolisada/min (HARKES *et al.* 2010; STABNIKOV *et al.* 2013). Atividade da urease não deve ser muito alta ou muito baixa para uma biocimentação bem-sucedida porque a atividade da urease na faixa de 4,4 a 9,5 mM hidrolisado ureia/min. aumentou a força do solo biocimento. CHUNXIANG *et al.* (2009) relatam que agregados mais fortes de carbonato de cálcio formam a uma baixa taxa de hidrólise da ureia. Após o tratamento do MICP (por tijolos BHI curado), a absorção de água por tijolos curado em média foi inferior (-14%) do que o controle (25%) porque os poros estavam bloqueados por deposição de calcita, que impediu que água e outros poluentes penetrasse o corpo dos tijolos (SARADA *et al.*, 2009).

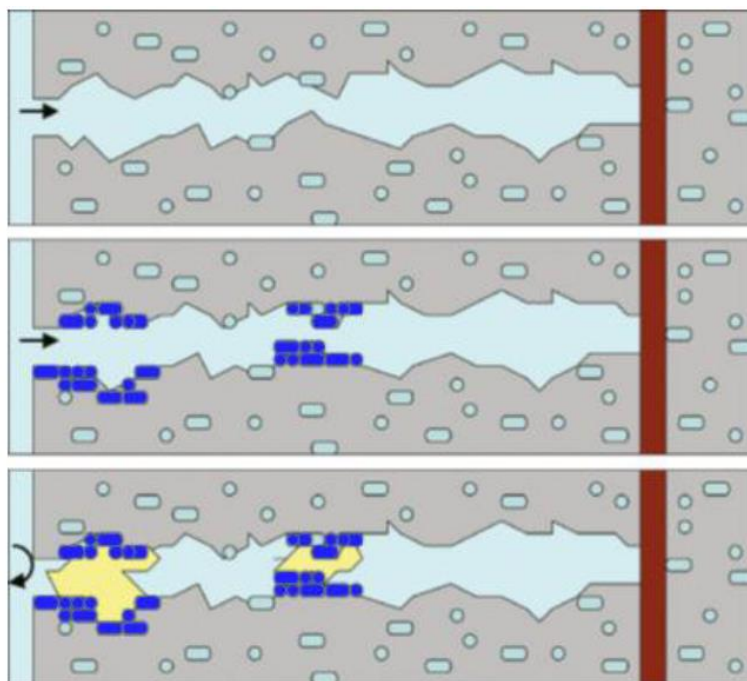
RAMACHANDRAN (2007) constatou que a incorporação de altas concentrações de células bacterianas na mistura de cimento reduziu a resistência à compressão devido à interferência da biomassa com a integridade da argamassa. No entanto, outros pesquisadores relataram que a resistência à compressão melhorada após o tratamento do MICP em relação a um controle (DE MUYNCK *et al.* 2008; CARVALHO LIMA *et al.* 2012).

A marcante presença de aparecimento de fissuras no concreto devido ao seu envelhecimento ou retração precisa de tratamento; no entanto, muitos pesquisadores têm relatado a remediação de rachaduras por MICP de *B. pasteurii* e outras espécies de *Bacillus* (RAMACHANDRAN *et al.* 2001; ACHAL *et al.* 2013). DEJONG *et al.* (2010) relataram uma redução do tamanho dos poros, porosidade e permeabilidade, bem como melhorar a rigidez e a força da matriz em resposta a MICP de meios porosos. BERNARDI *et al.* (2014) relatou a fabricação de bio-tijolos por MICP e comparou a eficácia de tijolos cal tratada e cimento convencional. Na verdade, o tipo de polimorfos de  $\text{CaCO}_3$  é importante para a construção como finalidade, porque tem alta estabilidade e consolida os efeitos (RODRIGUEZ-NAVARRO *et al.* 2003; GANENDRA *et al.* 2014).

O crescimento de *b. pasteurii* é afetado pelo pH muito elevado (acima de 12), particularmente no concreto, porque o pH ótimo para o melhor crescimento desta estirpe é 9.0. Para esta instância, BANG *et al.* (2001) investigou uma técnica de imobilização utilizando poliuretano (PU) para correção de problemas de rachaduras de concretos para proteger as células bacterianas do pH elevado do concreto. No entanto, durante a imobilização de células inteiras em PU, a viabilidade das células encapsuladas em polímero do plutônio é incerta (BANG *et al.* 2001). Não obstante, BACHMEIER *et al.* (2002) sugeriu que a enzima imobilizada poderia superar a perda da viabilidade das células inteira em PU e que a enzima imobilizada será ambientalmente mais segura do

que microrganismos imobilizados. MICP também está envolvido na proteção de superfícies de concreto contra a infiltração de substâncias deletérias (por exemplo, íons cloreto) (DE MUYNCK *et al* 2008).

Dentre os métodos possíveis para alcançar este objetivo é adicionar bactérias à mistura de concreto do gênero *Bacillus* que são capazes de precipitar carbonato de cálcio. Este tipo de bactéria forma esporos, permitindo-lhe sobreviver sem nutrientes e água por até centenas de anos. Portanto, incorporando nutrientes e esporos em matriz de concreto pode fazer o material auto-curar. Sempre que uma abertura se forma, a água ou o ar entrará na abertura, fazendo as bactérias germinar e começar a precipitar carbonato de cálcio. Desta forma, as aberturas serão fechadas e a entrada de água ou ar é impedida. Um esquema representação deste processo é mostrado na Figura 9 (DE KOSTER *et al.*, 2015)



**Figura 9:** Representação esquemática da cura por bactérias. Carbonato de cálcio (amarelo) é formado por bactérias (azul escuro) incorporadas ao concreto (cinza). As setas pretas representam o fluxo de água e a barra vermelha representa o reforço de aço.  
Fonte: DE KOSTER., 2015.



## Capítulo 4

### INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO 4

O capítulo 4 será apresentado em forma de artigo científico, pelo qual corresponde aos resultados referentes aos 2 anos de pesquisa associado a seleção e avaliação de cinco estirpes bacterianas para potencial aplicação para o processo de auto-cura de matrizes cimentícias. O artigo foi organizado conforme as normas propostas pelo periódico de publicação, dos quais os materiais e as referências bibliográficas foram adicionadas ao final do respectivo artigo intitulado “*Analysis of Bacillus strain in bioprecipitation protocol for self-healing of cementitious material*”.

ARTIGO

## **Analysis of *Bacillus* strain in bioprecipitation protocol for self-healing of cementitious material**

*Romario P. Santos<sup>1</sup>, Tatiane M. Ramos<sup>1</sup>, Brendo M. Borges<sup>1</sup>, Luciana M. Hollanda<sup>1,2</sup>,  
Álvaro S Lima<sup>1,2</sup>, Cleide M. F. Soares<sup>1,2</sup>, Ranyere L Souza<sup>1,2,\*</sup>*

<sup>1</sup> Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, 49032-490, Aracaju-SE, Brazil

<sup>2</sup> ITP, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Av. Murilo Dantas, 300 - Prédio do ITP, Farolândia,  
49032-490, Aracaju-SE, Brazil.

Submetido ao periódico **Bioresourc Technology**

\* To whom correspondence should be addressed:

Tel: +55 7932182115; Fax: +55 7932182190; e-mail address: ranyerels@hotmail.com

## **Abstract**

The self-healing process of concrete using bacteria is an innovative and alternative mechanism to solve the problematic cracks in concrete structures. The present study identified and evaluated five *Bacillus* strains collected from soil with a history of contamination with petroleum for application in the protocol of self-healing via  $\text{CaCO}_3$  bioprecipitation. Based on analyzes of 16S rDNA in conjunction with biochemical assays the results demonstrate that the strains are either *Bacillus cereus* or *thuringiensis*. The microorganism are able to produce urease activity of approximately  $2,379.02 \pm 1.35$  U/mL after 40 days when used glycerol as a carbon source. The cementitious molds with microorganism increased the compressive strength in approximately 14.2%. The  $\text{CaCO}_3$  bioprecipitated in cementitious molds was confirmed with FTIR together with ICP-OES.

**Keywords:** bioprecipitation, urease activity, concrete, resistance.

## 1. Introduction

Concrete structures inevitably suffer degradation and deterioration over time, becoming susceptible to the appearance of cracks when exposed to certain environmental conditions and/or external loads. This type of pathology is associated with mechanisms that cause defects in materials, which certainly compromise the integrity of structures with the formation of undesirable gases and the entry of water. Normally repair techniques rely on regular inspection programs, which are costly and depend on a combination of non-destructive testing and human perception (Alghamri et al., 2016; Bentz, 2008).

Currently one of the alternative processes to solve this pathology is to incorporate nutrients together with the bacteria capable of mediating the precipitation of minerals (microbially induced calcite precipitation - MICP), and thus promote a process of *in-situ* repair of cracks (Vijay et al., 2017). The bioprecipitated crystals may appear on the cell wall of the bacteria as spots or striae, which extend and linked until forming a rigid layer. Or in other cases, the solid particles form inside the cell and are subsequently excreted by the bacterial cell (Vijay et al., 2017). All these small particles form "biomineral" aggregates, environmentally correct, durable, and have been applied in the protection of the surface of building materials (De Muynck et al., 2008; Tiano et al., 2006), cementitious and repair of openings (Jonkers et al., 2010; Van Tittelboom et al., 2011; Wang et al., 2015).

Spore-forming ureolytic bacteria have high yields of calcium carbonate precipitation ( $\text{CaCO}_3$ ), which is the main crack curing product (Achal et al., 2015; Dick et al., 2006). Among the main microbial genres studied, *Bacillus* spp. (such as *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. amyloliquefacies*, *B. cereus*), *Pseudomonas* spp., *Variovorax* spp., *Micrococcus* spp., *Leuconostoc mesenteroides*, *Myxococcus xanthus*, *Sporosarcina*

*pasteurii*, *S. ureae*, *Escherichia coli*, *Beijerinckia indica* e *Penicillium chrysogenum* are those that show the greatest potential to  $\text{CaCO}_3$  bioprecipitation (Baskar et al., 2006). The bioprecipitation capacity is predicted by the presence of urea as the main source of energy (Achal et al., 2009a; Mobley & Hausinger, 1989). In the chemical equilibrium after the action of the urea enzyme, ammonia from urea hydrolysis is converted to ammonium, releasing hydroxide ions and increasing the microenvironmental pH value, which generates favorable conditions for a higher precipitation (Hammes & Verstraete\*, 2002). Thus, the feasibility of large-scale application of this technology may be associated with the catalytic capacity of the enzyme urease produced by the microorganisms. This gap offers an opportunity to find more applicable bacterial strains or find alternatives to improve them. In addition, it has recently been proposed that MCIP can be used to remove heavy metals from contaminated soils and even from waste water/water, which can make its production and research strategically promising (Torres-Aravena et al., 2018).

Therefore, the aim of this work was to identify and evaluate five new bacterial isolates for their potential application as a self-healing agent for cementitious matrices. Moreover, bacterial strains were induced in media with yeast extract and urea, and also evaluated with addition of glycerol, used as a production enhancer. In addition, the microorganisms were truly incorporated into the cementitious molds to be able to act as a self-healing agent and thus lead to the possibility of using microorganisms without the immobilization step.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Microorganisms**

Samples from the five bacterial strains coded as BIOPETRO (BP) I, II, III, IV and V, were isolated from oil-contaminated soil at the oil extraction field of Carmópolis-

Sergipe, Brazil. The samples were collected and maintained in test tubes in solid culture medium with nutrient agar and refrigerated at 4 ° C in the Food Research Laboratory (LPA) of the Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) (Aracaju-Sergipe, Brazil)..

## **2.2. Biochemical Identification of Strains**

All strains growing in Nutrient Agar (5.0 c peptone; 5.0 g/L sodium chloride; 3.0 g/L beef extract; 3.0 g/L yeast extract and 1.5 g/L bacteriological Agar) for 37 °C at 24 h. Next, the Gram staining (Smith & Hussey, 2005), catalase (Reiner, 2010), oxidase (Shields & Cathcart, 2010) and Hemolysis protocol (Buxton, 2005) was performed in accordance American Society for Microbiology (<http://www.asmscience.org/content/education/protocol?order=date>). Beside this, bacterial isolates were identified based on biochemical secondary tests (Wilson et al., 2018) using Bacitray System I, II and III (Laborclin, Brazil) and the positive and negative results analyzed with ABIS online system for *Bacillus* database identification ([http://www.tgw1916.net/bacteria\\_Bacillus\\_input.php](http://www.tgw1916.net/bacteria_Bacillus_input.php)).

## **2.3. Phylogenetic Identification of Strains**

### **2.3.1. DNA extraction**

Total genomic DNA extracted from all strains as described by Ausubel (1999). Inoculated a plate of nutrient agar with the BIOPETRO I, II, III, IV and V separately for 24 hours at 35 °C. After growth, resuspended the strains in 1 mL of saline solution, spin the culture in a microcentrifuge for 3 min at 13.000g, or until compact pellet form. Discard the supernatant, and resuspended the pellet in 1.0 mL of Lysis Buffer (20mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM EDTA, 75 mM NaCl, 10mM SDS) by repeated pipetting, store a 37 °C per 1 hour. Add 100 µg.mL<sup>-1</sup> proteinase K in 5mM SDS, mix thoroughly and incubate 1 h at 37°C. Add 0.1 mL of 5M NaCl, and mix thoroughly. Add 0.08 mL of CTAB/NaCl (100mM CTAB and 700 mM NaCl) solution pre-heated at 65 °C, mix

thoroughly, and incubate 10 min at 65 °C. Add 0.8 mL chloroform/isoamyl alcohol (24:1) mix thoroughly and centrifugate at 13.000 rpm for 5 min. Remove supernatant to a fresh microcentrifuge tube and add an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) mix and extract thoroughly, centrifugate at 13.000 rpm for 5 min. Transfer the supernatant to a fresh tube, add 0.6 vol isopropanol and shake the tube back and forth until a stringy white DNA precipitate becomes clearly visible, centrifugate at 13.000 rpm for 5 min and discard the supernatant. Add 0.5 mL of 70% ethanol cold and respin 5 min at 13.000g. Carefully remove the supernatant and briefly dry the pellet at ambient temperature or in a lyophilizer. Dissolve the pellet in 0.1 mL of deionized water.

### *2.3.2. Identification of 16S rDNA and phylogenetic analysis*

The DNA amplification of 16S rDNA gene sequence using universal primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). PCR reactions performed in 25.0 µL containing 1x GoTaq<sup>®</sup>G2 Green Master Mix 2x (PROMEGA, United States); 1.0 µM 27F; 1.0 µM 1492R and 250 ng of DNA template with PCR conditions: 95 °C for 5 min; 35 cycles of 94 °C for 1 min, 52 °C for 30 sec and 72 °C for 90 s; and 72 °C for 4 min. After PCR, the amplicon was visualized by electrophoresis in 1.2% agarose gel in 1x TBE buffer. Gels were stained with 10,000X Diamond<sup>™</sup> Nucleic Acid Dye (PROMEGA, UNITED STATES) and visualized on a transilluminator. The amplicons were purified using Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System and were sequenced commercially at Myleus Biotecnologia, Brazil. The fragments sequenced was invite by email and the contig with approximately 1300bp build in the trial version 2.1.8 of Chromas Pro Software (Techneselyum, USA) were compared with others contig with ClustalW2 to check the similarity among the sequences and the phylogenetic relationship was analyzed with MEGA 10.0 and the phylogenetic tree was constructed using Neighbor-Joining. Bootstrap

analyses were conducted using 2,000 resampling replicates (Levy et al., 2009; Matturro et al., 2018; Thankappan et al., 2018). The identification of the sequences was defined only for sequences with 100% similarity compared to the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) using Basic Alignment Search Tool software (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) (Martins et al., 2018). After sequencing the fragments were analyzed with the ARB software (Ludwig et al., 2004) using SILVA 16S rRNA SSU (Matturro et al., 2018; Pruesse et al., 2007).

## **2.4. Fermentative process**

### *2.4.1. Fermentative operational conditions*

Microbial growth and enzymatic production of bacterial strains were cultured in Erlenmeyer flasks containing 200 mL minimal medium of nutrient (YU), yeast extract (YE, 20 g/L, from HIMEDIA® Brazil) and urea (20 g/L, from QUIMEX® Brazil). All the isolates were evaluated with the YU and with the production enhancer, consisting of glycerol at 35 g/L (PA, from Dinamica Q.C. Ltda®). The medium were autoclaved at 121 °C for 20 min. The inoculum was prepared in the 10% (v/v) and maintained for 24 h for adaptation. The fermentation conditions were: pH 9.0; incubation temperature 30°C; and stirred speed (180 rpm) for 40 days previously established by Wang et al. (2012). For all cases, three independent experiments were performed. Culture growth was monitored by measuring cell counting in a Neubauer camera.

### *2.4.2. Urease activity*

The urease activity was determined using 0.5 mL aliquots of the fermented medium at different times (5 to 40 days) plus 0.1 mL of the Nessler reagent (tetraiodomercurate in an alkaline solution of potassium hydroxide) prepared according



to the recommendations of Sutormina (2004). The mixture was homogenized and then held for 10 min at 25 °C in the absence of light after the absorbance was measured on a UV-Vis spectrophotometer at wavelength 525 nm. The calibration curve was performed using ammonium sulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) as standard. All analyzes were performed in triplicate. A unit of urease activity is defined as the amount of enzyme required to release 1 µmol of ammonia per minute of reaction (U).

#### 2.4.3. *Cinetic parameters*

For a better interpretation of the process of producing urease activity by the bacterial isolates studied, some important parameters, such as specific cell growth rates ( $\mu_x$ , mg/g.day), product formation ( $\mu_p$ , U/mL.day) and the conversion factor ( $Y_{x/p}$ ) were calculated according to Eqs. 1-3, respectively.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (2)$$

$$Y_{x/p} = \frac{dX}{dP} \quad (3)$$

where:  $dX$  is the cell concentration (mg/g),  $dP$  is the product concentration (U/ml) and  $dt$  is the growth time (day).

### 2.5. *Bioprecipitation essays*

#### 2.5.1. *Preparation of cementitious molds*

The bacterial extract was added to the preparation of the cementitious molds (50 mm diameter x 100 mm height) to investigate their activity in situ (sample named MCB). As control, bacterial extract was not incorporated into the specimens (sample named MCC) under the same conditions as the preparation of cementitious molds. The

composition of the molds is shown in Table 1. All cementitious molds were made using the same cement (CP II-Z), fine aggregate and water as mentioned above. The composition of cementitious molds followed the conditions previously established by Wang et al. (2015). The molds after preparation were kept for 24 h at 25 °C and protected from weathering, after being demolded and kept submerged in water for 28 days to achieve curing time.

#### 2.5.2. *Compressive strength*

The compressive strength of the cementitious molds 50 mm in diameter and 100 mm in height were ruptured using a hydraulic press. The test load was applied continuously and without shocks with loading speed of 0.3 N/s as recommended by NBR 5739 (1994). For all cases, three independent experiments were performed after 28 days of mold curing.

#### 2.5.3. *Characterization of bioprecipitate*

Samples of the superficial layer (2 mm) of the cementitious molds were carefully collected (with the help of a metal spatula) in the fissured region. Approximately 0.5 g of collected sample were diluted in 15 mL of deionized water and filtered with 0.45  $\mu\text{m}$  membrane, then analyzed on an ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) for quantification of calcium ions  $[\text{Ca}]^{+2}$  present and expressed in mg/g of the template. The Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) of the precipitates was determined using Agilent Technologies Cary 630 FTIR instrument. The  $\text{CaCO}_3$  precipitation was confirmed by observation of peaks under  $650\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$  wave number.

### **3. Results and Discussions**

#### **3.1. Biochemical Identification of Strains**

After growing in Nutrient Agar the strains were classified in accordance of the biochemical tests using Gram staining (Smith & Hussey, 2005), catalase (Reiner, 2010), oxidase (Shields & Cathcart, 2010) and Bactray System. The results showed in Table 2 demonstrated that all strains were Gram-positive, Catalase positive, Oxidase negative,  $\beta$ -hemolysis positive and have the same profile for the biochemical tests realized with the Bactray System (American Society for et al., 1948). This biochemical profile is found by bacteria of the species *Bacillus thuringiensis* (Bt) and *Bacillus cereus* (Bc) that are biochemically indistinguishable (Guttmann & Ellar, 2000). *Bacillus cereus* group, which include *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* and *Bacillus mycoides*, are not distinguished phenotypically. In classical classification, *B. anthracis* can be separated from *B. cereus* based upon non-haemolytic activity, non-motility and the presence of two virulence plasmids coded for toxin and capsule. For *B. mycoides*, *rhizoid* growth is the definitive characteristic. Otherwise, *B. thuringiensis* can be separated from *B. cereus* by its ability to produce an insecticidal crystal or  $\delta$ -endotoxin inclusion inside the cell during sporulation (Chen & Tsen, 2002; Fiuza et al., 2017). Thus, only biochemical tests make it difficult to separate these two species.

### **3.2. Phylogenetic Identification of Strains**

After biochemical identification the genomic DNA was extracted from all strains and the 16S rDNA gene were amplified with specific primers. The results showed that all strains has the same 16S rDNA sequence and are identical in 100% of homology. The BIOPETRO has 99% in the homology with the 16s with the strains JX506728.1 (*Bacillus cereus* strain TJ); KT981877 (*Bacillus cereus* strain Suaeda B-001); KU218526.1 (*Bacillus cereus* strain NCIM 2217); KJ000208.1 (*Bacillus thuringiensis* strain VKK-GA2); KF741360.1 (*Bacillus thuringiensis* strain DSc5); KR814536.1 (*Bacillus thuringiensis* strain WB27) deposited in GenBank (Figure 1).

*Bacillus cereus* group (*B. cereus* sensu lato) contain Gram-positive, rod-shaped, spore-forming aerobic or facultative aerobes microorganisms that are widespread in various environments (Draganic et al., 2017). This group comprises eleven closely related species: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*, *B. toyonensis*, *B. gaemokensis*, *B. manliponensis*, and *B. bingmayongensis*. Although the 16S DNA sequences are almost identical between these species, they can be separated by the presence or absence of virulence plasmids (*B. anthracis* and *B. thuringiensis*), colonial morphology (*B. mycoides* and *B. pseudomycoides*), psychrophilic or thermotolerant ability (*B. weihenstephanensis* and *B. cytotoxicus*) and other ill-defined features (*B. cereus*, vomiting- and diarrheal-type food poisoning) (Draganic et al., 2017; Liu et al., 2015). To separate these two species in addition to the sequencing of the 16S other techniques are employed as: RAPD (Beric et al., 2009; Pinchuk et al., 2002), Rep-PCR (da Silva & Valicente, 2013), PFGE (Drean & Fox, 2015) and multilocus sequence analysis of the core genes (Draganic et al., 2017; Maiden, 2006).

Thus, the analysis of 16S in conjunction with the biochemical assays and results obtained in the SILVA platform (Table 3) demonstrate that the BIOPETRO lineages are either *B. cereus* or *thuringiensis*.

### **3.3. Fermentative process**

#### **3.3.1. Adaptation and selection of bacterial strain**

The adaptation and selection of the different bacterial strains were analyzed as a potential inducer of calcium carbonate bioprecipitation for the self-healing process in cementitious matrices. The strains of *Bacillus* were evaluated for their adaptation under microbial growth conditions. Figure 2a shows cell growth of bacterial strains (namely BP I, II, III, IV and V) using a minimal medium (YU) with YE + urea at pH 9.0, 30 °C and

180 rpm up to 40 days. Strains BP III and V showed better adaptation of the 5 strains of *Bacillus* studied. In this conditions, maximum cell growth was  $3.2 \times 10^7 \pm 7.5 \times 10^5$  cells/mL for BP III at the 26 day of fermentation, followed by strain BP V with cell growth of  $3.1 \times 10^7 \pm 6.2 \times 10^5$  cells/mL at the 29 day of fermentation. In Figure 2a, it is also possible to observe the microbial growth stages for strains III and V. The low concentration of cells up to the 10 day of fermentation indicates the period of adaptation of the microorganisms to the medium, known as the “lag” phase, after which the exponential growth phase is observed until the 26 and 29 day of fermentation (BP III and V, respectively) and after a steady period followed by the death or decline phase. The decline in cell growth may be due to a combination of factors such as the depletion of available nutrients; accumulation of products such as  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{OH}^-$ ; which can suppress microbial activity (Berg et al., 2002). BP I, II and IV strains showed low cell growth capacity ( $7.8 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^5$ ;  $8.1 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^5$ ,  $4.0 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^6$  cells/mL, respectively), indicating that under minimal nutrient conditions the strains have limitations on their growth and therefore may not be able to mediate an adequate bioprecipitation.

This same cell growth profile (for BP III and V, compared to the other isolates) was also observed when *Bacillus* were induced with the addition of glycerol (Figure 2b), thus constituting medium with excess carbon source. In general, all bacterial isolates were better adapted with the addition of glycerol when compared to the medium only with yeast-urea (Figure 2c). Thus, a growth of  $4.2 \times 10^7 \pm 5.7 \times 10^5$  cells/mL at the 35 day of fermentation for BP III was obtained, followed by BP V with cell growth of  $3.3 \times 10^7 \pm 8.8 \times 10^5$  cells/mL at the 29th day of fermentation (Figure 2b). These values are close to the values described in the literature (between  $10^6$  and  $10^8$  cells/mL), to mediate the

bioprecipitation of calcite, and that can even improve the compressive strength of cementitious molds (Khaliq & Ehsan, 2016; Okwadha & Li, 2010).

### 3.3.2. Enzymatic activity

The ability of the urease enzyme to induce  $\text{CaCO}_3$  deposition in an alkaline microenvironment can be measured by the decomposition of urea  $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$  into ammonium  $[\text{NH}_4]^+$  and the production of carbonate ion  $[\text{CO}_3]^{-2}$  (Eqs. 4 and 5), which in turn establishes the nucleation of the calcium ions bound to the outer surface of the cell, and then the formation of calcite is favorable according to Eqs. 6 and 7 (Anbu et al., 2016; Ferris et al., 1996).



Thus, urease activity was also evaluated for these bacterial isolates using minimal nutrient conditions consisting of YE + urea (Figure 3a) and also with addition of glycerol (Figure 3b).

In Figure 3 it is possible to observe that among the isolates, the medium prepared with BP III presented maximum enzymatic activity, both with the induction using only yeast + urea, as well as addition of glycerol, compared with the other isolates investigated. For all cases, the addition of glycerol induced an increase, in the range of 1.1 to 3.1 fold the ability to convert urea and ammonium, when compared to induction performed with YE + urea alone (Figure 3c). These results demonstrate the relevance of studies with the objective of optimizing the capacity of the conversion of substrates into products from bacterial isolates. In addition to the availability of essential nutrients contained in YE +

urea, such as vitamins, nitrogen, amino acids and carbon, the addition of carbon-rich glycerol, played an important role in supplementing the production of the enzyme urea. In addition, the use of glycerol has advantages because it is considered low cost and contributes to the destination of biodiesel production residues, since glycerol is the main by-product of the transesterification reaction of biodiesel (Rastegari et al., 2019).

Thus, the medium from the isolate BP III obtained maximum enzymatic activity of  $2,379.0 \pm 1.3$  U/mL. These conditions the application of this isolate with excellent potential to promote bioprecipitation in cementitious matrices. These data are promising when compared to the urea activity data described in the literature, some strains produce levels particularly 3-4 fold lower than those found in our work (Anbu et al., 2016).

Achal et al. (2009b) investigated the phenotypic mutants of *Sporosarcina pasteurii*, developed to increase the efficiency of this bacterium to produce more urease for maximum calcite formation. The results obtained showed the maximum urease activity of 550 U/ml, compared to the other isolates, including the wild type. Dhami et al. (2014), found the maximum extracellular urease activity of bacterial from *Bacillus megaterium* (SS3) after 96 h of 690 U/ml, using a complex medium (peptone, beef extract, yeast extract, sodium chloride, nickel chloride, and urea). Achal and Pan (2014) evaluated the activity of urease in media with calcium chloride, calcium nitrate. The maximum urease activity was 432 U/ml in the medium containing calcium chloride.

In order to characterize and thus predict enzymatic production on both bench scale and scale-up, the kinetic parameters of the fermentative process were determined such as product formation, microbial product specific velocity and conversion factor were determined and are presented in Table 4. Conversion factor ( $1.57 \times 10^5$ ) data in Table 4 show that there is ample evidence for the confirmation of BP III enzyme activity data (discussed in topic II) in YE + urea + glycerol medium.

### **3.4. Bioprecipitation assay**

#### **3.4.1. Potential compressive strength**

The low tensile strength of the concrete is one of the main causes of the formation of cracks in the concrete. The compressive strength results of the cementitious molds prepared without microorganisms (control), with culture medium containing YE + urea and culture medium with YE + urea + glycerol using the BP III isolate are shown in Figure 4. For the molds prepared with the increase of microorganisms, different microbial growth times 0, 7, 15, 20, 30 and 40 days were evaluated. The evaluation at different days during bacterial growth and urea enzyme production was a strategy to find better values of resistance to compression even in reduced times of microbial growth. All cementitious molds were evaluated after 28 days of curing. The horizontal line in Figure 4 indicates the compressive strength for the control sample ( $23.03 \pm 0.18$  MPa), without the incorporation of microorganism.

The effect of compressive strength incorporating the urea-induced BP III extract was higher than the control sample only after the 30 day of bacterial growth, with a 6.3% increase ( $24.49 \pm 0.13$  MPa) of the compressive strength. The samples induced with glycerol presented increase of resistance from the 7 day of bacterial growth and reached maximum value at the 40 day with increase of 16.63% ( $26.87 \pm 0.33$  MPa) in the resistance of the cementitious mold. These results can be understood by an improvement in the bonding between aggregate pulp associated with the formation of a less porous zone in the cementitious mold. These results were also observed by Luo and Qian (2016), When self-healing bacteria were used in cementitious molds, by which reduction of pore size was associated with increased compressive strength. Vashisht et al. (2018) demonstrated an improved compressive strength of 1.5 fold was observed in concrete samples amended with *Lysinibacillus* sp. over the concrete amended with *B.*



*megaterium* MTCC 1684 after 28 days of curing. Moreover, these results corroborate the data of enzymatic activity, presented in topic 3.3.2, that is, it is probable that the presence of the enzyme urease besides promoting the carbonate biodeposition in the mortar matrix, also induces a structural modification in the porosity distribution of the solid and consequently increased strength.

Therefore, this may be a promising alternative for the development of more resistant cementitious materials without the need for steps of immobilization of bacteria. Increasing the resistance during the material curing step (with MCIP) may precede the use of reduced amounts of material during application, as well as establishing greater resistance to cracking during the life of the product.

#### 3.4.2. Characterization of $\text{CaCO}_3$

After selection of the BP III bacterial strain, cementitious molds were prepared to evaluate its real capacity to precipitate  $\text{CaCO}_3$  and consequently to promote a process of self-healing of cracks. The samples were prepared according to Table 1 and the results shown in Figure 5 show the presence of carbonate crystals in cementitious samples containing the fermented extract of BP III isolate (MCB). Figure 5a (i) shows the control cementitious mold, without the presence of microorganism and in Figure 5a (ii) with the presence of microorganism (BP III), whereby formation of carbonate crystal on the surface of the mold is evidenced. In Figure 5b are shown two cracks filled with  $\text{CaCO}_3$  bioprecipitated by MCIP.

The bioprecipitation evidences shown in Figure 5 were submitted to ICP-OES analysis, since the presence of the  $[\text{Ca}]^{+2}$  ion in these molds may indicate the amount of bioprecipitated  $\text{CaCO}_3$ . Figure 6 shows the concentration of  $[\text{Ca}]^{+2}$  in the cementitious molds. The results suggest that the increase in the concentration of  $[\text{Ca}]^{+2}$  is in accordance with the transformation capacity of the urea in precipitated  $\text{CaCO}_3$  as predicted by Eqs.

6-7 (Anbu et al., 2016; Ferris et al., 1996). Therefore, considering that the molds were prepared with samples of BP III extract at specific microbial growth times (10, 15, 20, 30, and 40 days), these data agree with the data of the urea activity, discussed in the topic previous. The presence of microorganisms showed a concentration of  $[Ca]^{+2}$  always higher than 1.25 mg/g (10th day), with the presence of  $[Ca]^{+2} = 0.41$  mg/g), with a maximum concentration of 3.40 mg/g with samples prepared with BP III from the 40th day of fermentation.

In addition, Figure 7 shows the FTIR spectrum of the  $CaCO_3$  crystals predicted in samples prepared with BP III extract. The absorption bands of carbonate are predicted in four areas (Wang et al., 2010; Zhang et al., 2012), associated with a symmetrical stretch at  $1080\text{ cm}^{-1}$  (in our case with displacementitious to  $1082\text{ cm}^{-1}$ ), a off-plane inclination at  $870\text{ cm}^{-1}$  (in our case with displacementitious to  $872\text{ cm}^{-1}$ ), the doubly degenerates planar asymmetric stretching at  $1400\text{ cm}^{-1}$  (in our case with displacementitious to  $1405\text{ cm}^{-1}$ ), and a doubly degenerate planar bending at  $700\text{ cm}^{-1}$  (in our case with displacementitious to  $710\text{ cm}^{-1}$ ). Therefore, these are clear evidences of the bioprecipitation of  $CaCO_3$  in the cementitious molds.

#### 4. Conclusion

The present work reported the potential of new bacterial lineages characterized as *Bacillus cereus* or *thuringiensis*. The urease capacity for the five strains was strategically investigated for different fermentation times and with addition of glycerol. For all fermentations the kinetic parameters were determined. The best results of urease activity were BP III isolate using YE + urea and glycerol medium ( $\pm 2,379.02$  U/mL) with cell growth of  $4.23 \times 10^7$  cells/mL after 40 days of fermentation. Bioprecipitation of  $CaCO_3$  in

the cementitious molds was confirmed with FTIR together with ICP-OES, and an increase in compressive strength of 14.2% was verified when microorganism was used.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the support of FAPITEC/SE. The authors also thank financial support through the grant UNIT for the scholarship of T.M. Santos and B.M. Borges.

## References

- Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P.C., Reddy, M.S. 2009a. Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by *Sporosarcina pasteurii*. J Ind Microbiol Biot. **36**(3), 433-438.
- Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P.C., Reddy, M.S. 2009b. Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. J Ind Microbiol Biot. **36**(7), 981-988.
- Achal, V., Mukherjee, A., Kumari, D., Zhang, Q. 2015. Biomineralization for sustainable construction – A review of processes and applications. Earth-Sci Rev. **148**, 1-17.
- Achal, V., Pan, X. 2014. Influence of calcium sources on microbially induced calcium carbonate precipitation by *Bacillus* sp. CR2. Appl Biochem Biotech. **173**(1), 307-317.
- Alghamri, R., Kanellopoulos, A., Al-Tabbaa, A. 2016. Impregnation and encapsulation of lightweight aggregates for self-healing concrete. Constr Build Mater. **124**, 910-921.
- American Society for, M., Bergey, D.H., Breed, R.S., Hitchens, A.P., Murray, E.G.D. 1948. Bergey's manual of determinative bacteriology.
- Anbu, P., Kang, C.-H., Shin, Y.-J., So, J.-S. 2016. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. SpringerPlus. **5**(1), 250.
- Ausubel, F.M. 1999. Short Protocols in Molecular Biology. Current Protocols.
- Baskar, S., Baskar, R., Mauclair, L., McKenzie, J. 2006. Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: possible origin for stalactites in *Sahastradhara caves*. Curr Sci India, **90**(1), 58-64.
- Bentz, D.P. 2008. A review of early-age properties of cementitious-based materials. Cementitious Concrete Res. **38**(2), 196-204.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Stryer, L. 2002. Biochemistry. 5th edit, WH Freeman and Company New York.

- Beric, T., Urdaci, M., Stankovic, S., Knezevic-Vukcevic, J. 2009. RAPD analysis of genetic diversity and qualitative assessment of hydrolytic activities in a collection of *Bacillus* sp. isolate. Arch Biol Sci. **61**(4), 645-652.
- Buxton, R. 2005. Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols.
- Chen, M.L., Tsen, H.Y. 2002. Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and gyrB gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. J Appl Microbiol. **92**(5), 912-919.
- Da Silva, R.B., Valicente, F.H. 2013. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR. Springerplus, **2**, 641.
- De Muynck, W., Cox, K., De Belie, N., Verstraete, W. 2008. Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. Constr Build Mater. **22**(5), 875-885.
- Dhami, N.K., Reddy, M.S., 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., Verstraete, W. 2006. Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. Biodegradation, **17**(4), 357-367.
- Draganic, V., Lozo, J., Biocanin, M., Dimkic, I., Garalejic, E., Fira, D., Stankovic, S., Beric, T. 2017. Genotyping of *Bacillus* spp. isolate collection from natural samples. Genetika. **49**(2), 445-456.
- Drean, P., Fox, E.M. 2015. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Bacillus cereus* Group Strains. in: Methods in Molecular Biology. pp. 71-83.
- Ferris, F.G., Stehmeier, L.G., Kantzas, A., Mourits, F.M. 1996. Bacteriogenic Mineral Plugging. J Can Petrol Technol. **35**(08), 6.
- Fiuza, L.M., Polanczyk, R.A., Crickmore, N. 2017. *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of biocontrol. Springer.
- Guttmann, D.M., Ellar, D.J. 2000. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. FEMS Microbiol Lett. **188**(1), 7-13.
- Hammes, F., Verstraete, W. 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. Rev Environ Sci Biotechnol. **1**(1), 3-7.
- Jonkers, H.M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O., Schlangen, E. 2010. Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. Ecol Eng. **36**(2), 230-235.
- Khaliq, W., Ehsan, M.B. 2016. Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques. Constr. Build. Mater. **102**, 349-357.
- Levy, C.E., Pedro, R.J., Von Nowakowski, A., Holanda, L.M., Brocchi, M., Ramo, M.C. 2009. Arcanobacterium pyogenes sepsis in farmer, Brazil. Emerg. Infect. Dis. **15**(7), 1131-1132.

- Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J.P., Wang, M., Sun, Y., Wang, L., Shao, Z. 2015. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci. Rep.* **5**, 14082.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüssmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.-H. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32**(4), 1363-1371.
- Luo, M., Qian, C. 2016. Influences of bacteria-based self-healing agents on cementitious materials hydration kinetics and compressive strength. *Constr. Build. Mater.* **121**, 659-663.
- Maiden, M.C.J. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**(1), 561-588.
- Martins, M.C.d.F., Freitas, R.d., Deuvaux, J.C., Eller, M.R., Nero, L.A., Carvalho, A.F.d. 2018. Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. *Food Res. Int.* **108**, 295-300.
- Matturro, B., Pierro, L., Frascadore, E., Papini, M.P., Rossetti, S. 2018. Microbial community changes in a chlorinated solvents polluted aquifer over the field scale treatment with poly-3-hydroxybutyrate as amendment. *Front. Microbiol.* EndNote Data, v7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01664>.
- Mobley, H.L., Hausinger, R.P. 1989. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol Rev.* **53**(1), 85-108.
- NBR 5739. 1994. Concreto: ensaio de compressão de corpos-de-prova cilíndricos. *ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, Rio de Janeiro*.
- Okwadha, G.D.O., Li, J. 2010. Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. *Chemosphere.* **81**(9), 1143-1148.
- Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Sorokulova, I.B., Verneuil, B., Urdaci, M.C. 2002. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. *Res. Microbiol.* **153**(5), 269-276.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glockner, F.O. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* **35**(21), 7188-7196.
- Rastegari, H., Jazini, H., Ghaziaskar, H.S., Yalpani, M. 2019. Applications of Biodiesel By-products. in: *Biodiesel: From Production to Combustion*, (Eds.) M. Tabatabaei, M. Aghbashlo, Springer International Publishing. Cham, pp. 101-125.
- Reiner, K. 2010. Catalase Test Protocol.
- Shields, P., Cathcart, L. 2010. Oxidase Test Protocol.
- Smith, A.C., Hussey, M.A. 2005. Gram Stain Protocols.

- Sutormina, E.F. 2004. Spectrophotometric determination of ammonia and nitrogen oxides in the reaction products of ammonia oxidation. *J. Anal Chem.* **59**(4), 331-334.
- Thankappan, S., Kandasamy, S., Joshi, B., Sorokina, K.N., Taran, O.P., Uthandi, S. 2018. Bioprospecting thermophilic glycosyl hydrolases, from hot springs of Himachal Pradesh, for biomass valorization. *AMB Express*, **8**(1), 168.
- Tiano, P., Cantisani, E., Sutherland, I., Paget, J. 2006. Biomediated reinforcement of weathered calcareous stones. *J. Cult. Herit.* **7**(1), 49-55.
- Torres-Aravena, Á.E., Duarte-Nass, C., Azócar, L., Mella-Herrera, R., Rivas, M., Jeison, D. 2018. Can microbially induced calcite precipitation (MICP) through a ureolytic pathway be successfully applied for removing heavy metals from wastewaters? *Crystals*. **8**(11), 438.
- Van Tittelboom, K., Adesanya, K., Dubruel, P., Van Puyvelde, P., De Belie, N. 2011. Methyl methacrylate as a healing agent for self-healing cementitious materials. *Smart Mater. Struct.* **20**(12), 125016.
- Vashisht, R., Attri, S., Sharma, D., Shukla, A., Goel, G. 2018. Monitoring biocalcification potential of *Lysinibacillus* sp. isolated from alluvial soils for improved compressive strength of concrete. *Microbiol. Res.* **207**, 226-231.
- Vijay, K., Murmu, M., Deo, S.V. 2017. Bacteria based self healing concrete – A review. *Constr. Build. Mater.* **152**, 1008-1014.
- Wang, J., Mignon, A., Snoeck, D., Wiktor, V., Boon, N., De Belie, N. 2015. Application of modified-alginate encapsulated carbonate producing bacteria in concrete: a promising strategy for crack self-healing. *Front. Microbiol.* EndNote Data, v7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01088>.
- Wang, J., Van Tittelboom, K., De Belie, N., Verstraete, W. 2012. Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete. *Constr. Build. Mater.* **26**(1), 532-540.
- Wang, Y., Moo, Y.X., Chen, C., Gunawan, P., Xu, R. 2010. Fast precipitation of uniform CaCO<sub>3</sub> nanospheres and their transformation to hollow hydroxyapatite nanospheres. *J. Colloid Interf. Sci.* **352**(2), 393-400.
- Wilson, D.J., Middleton, J.R., Adkins, P.R.F., Goodell, G.M. 2018. Test agreement among biochemical methods, MALDI-TOF and 16S rRNA sequencing for the identification of microorganisms isolated from bovine milk. *J. Clin. Microbiol. JCM*. 01381-18.
- Zhang, Z., Xie, Y., Xu, X., Pan, H., Tang, R. 2012. Transformation of amorphous calcium carbonate into aragonite. *J. Cryst. Growth*. **343**(1), 62-67.

## Figure Captions

**Figure 1.** Evolutionary relationships of taxa. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Nei M., 1987). The optimal tree with the sum of branch length = 0.00804727 is shown. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Tamura-Nei method (Tamura & Nei, 1993) and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 11 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 1381 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018).

**Figure 2.** Evolution of cell growth from isolates (  $\rightarrow$  BP I  $\bullet$  BP II  $\blacktriangle$  BP III  $\diamond$  BP IV  $\boxminus$  BP V ) over 40 days, at 30 °C, pH 9 and 180 rpm in medium with: (a) YE + urea; (b) YE + urea + glycerol; (c) comparison between the maximum values of cells per mL for each isolate from *Bacillus* sp.

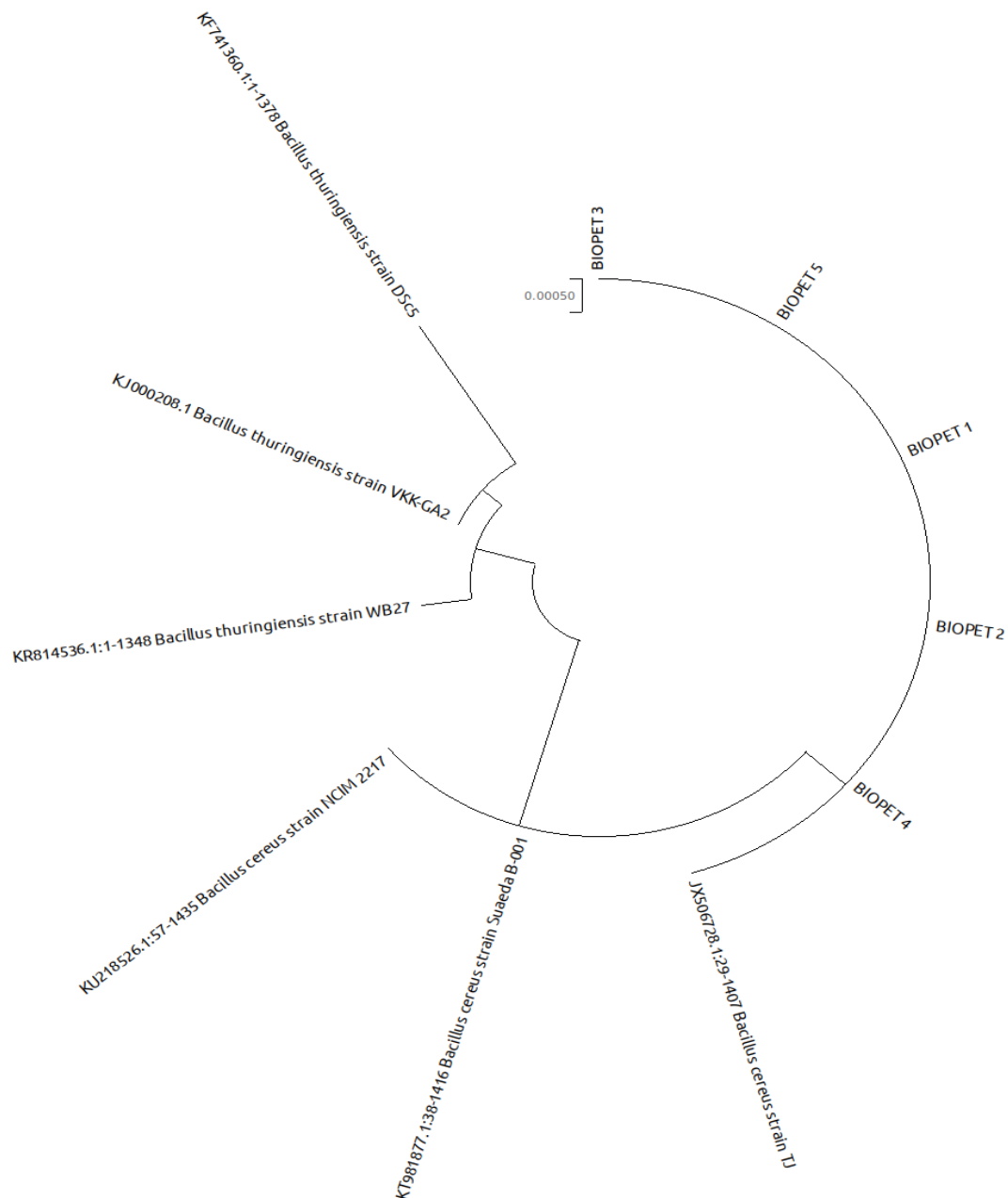
**Figure 3.** Evolution of urease activity from isolates (  $\rightarrow$  BP I  $\bullet$  BP II  $\blacktriangle$  BP III  $\diamond$  BP IV  $\boxminus$  BP V ) over 40 days, at 30 °C, pH 9 and 180 rpm in medium with: (a) YE + urea; (b) YE + urea + glycerol; (c) comparison between the highest values of urease activity for each isolate from *Bacillus* sp.

**Figure 4.** Resistance to compression of the cementitious samples in the presence of BP III fermentative extract induced with YE + urea and YE + urea + glycerol in different times of bacterial growth.

**Figure 5.** Image of cementitious molds. a) *i* - control mold, *ii* - mold with fermented extract with BP III; b) MCB mold with crack closure after 28 days of curing.

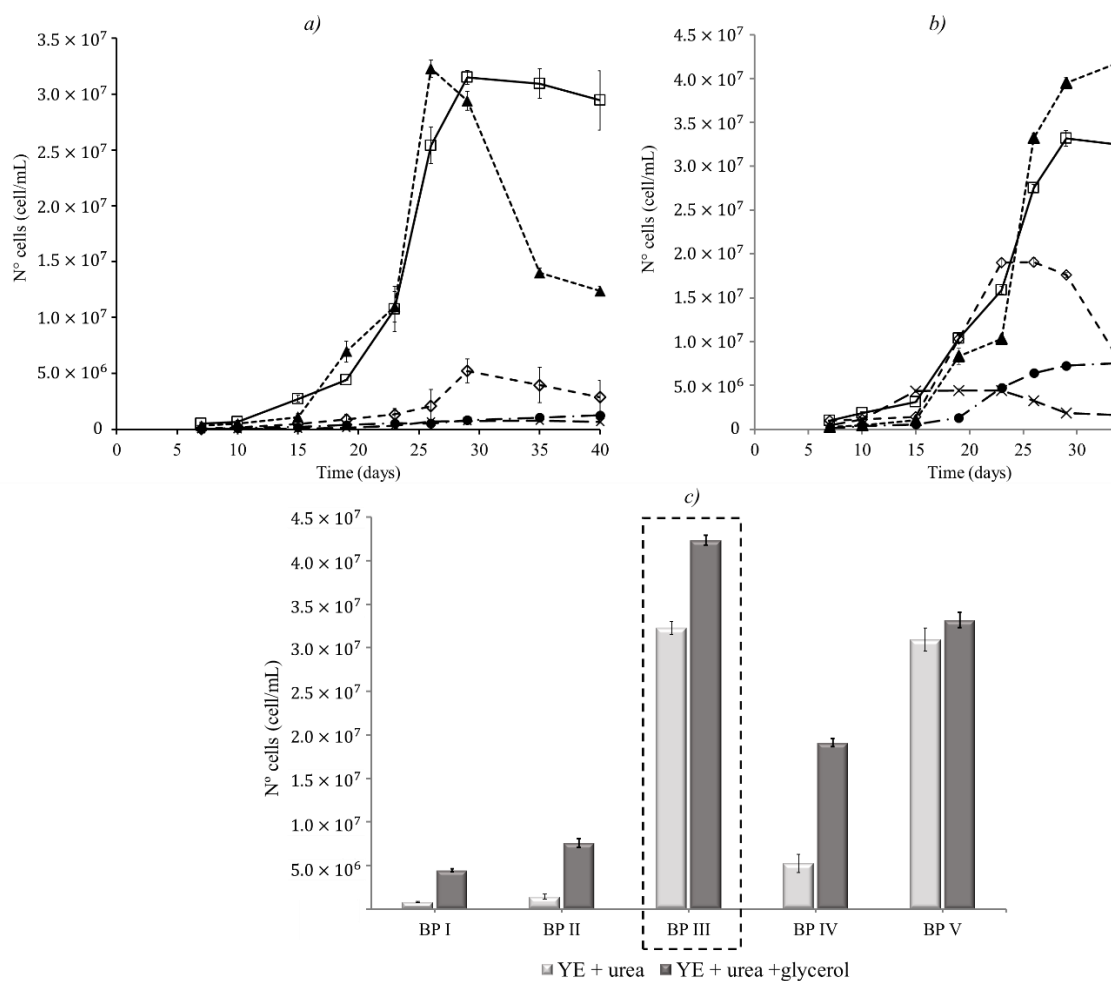
**Figure 6.** Comparison between urease activity from BP III isolate (dashed line) and concentration of  $[Ca]^{+2}$  (bars) ion contained in cementitious samples after 28 days of curing.

**Figure 7.** FTIR spectrum of the surface of molds prepared with microorganism (MCB).

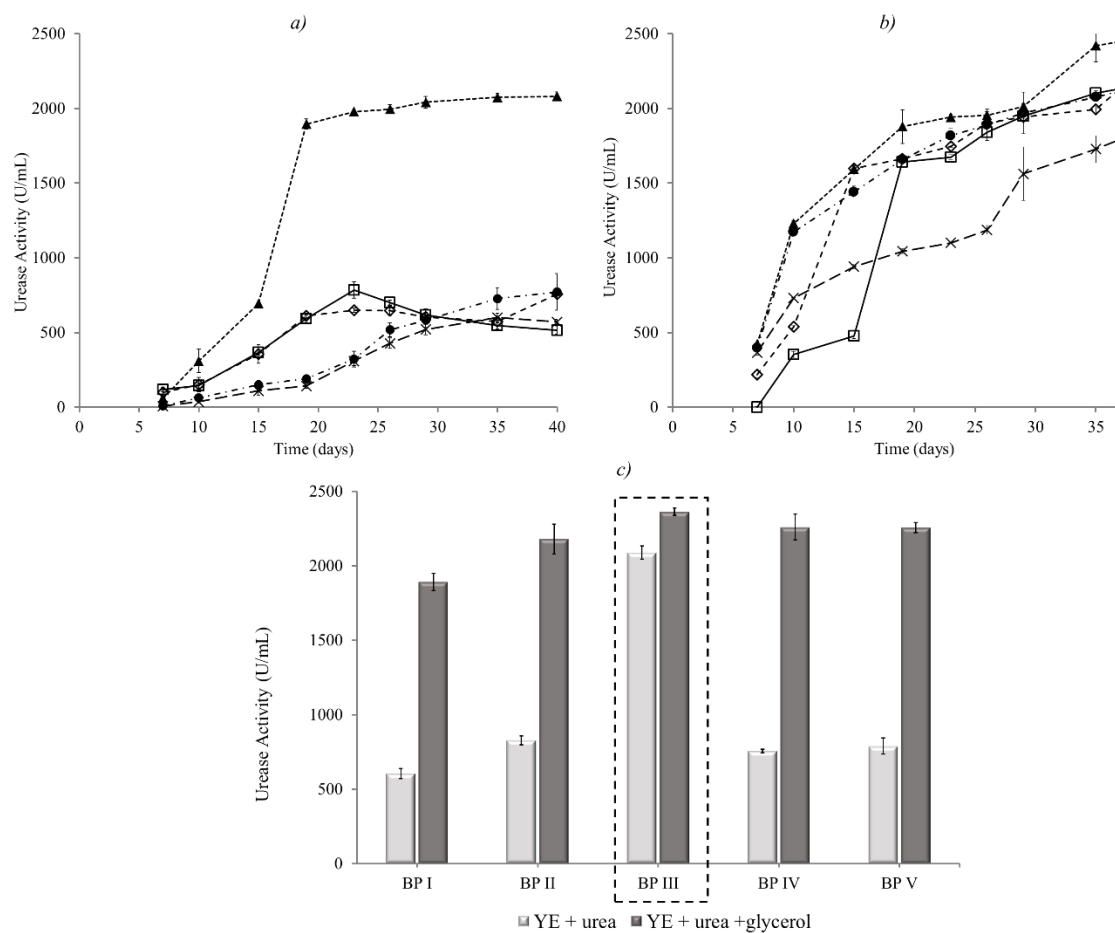


**Figure 1.** Evolutionary relationships of taxa. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Nei M., 1987). The optimal tree with the sum of branch length = 0.00804727 is shown. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Tamura-Nei method (Tamura & Nei, 1993) and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 11 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 1381 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018).

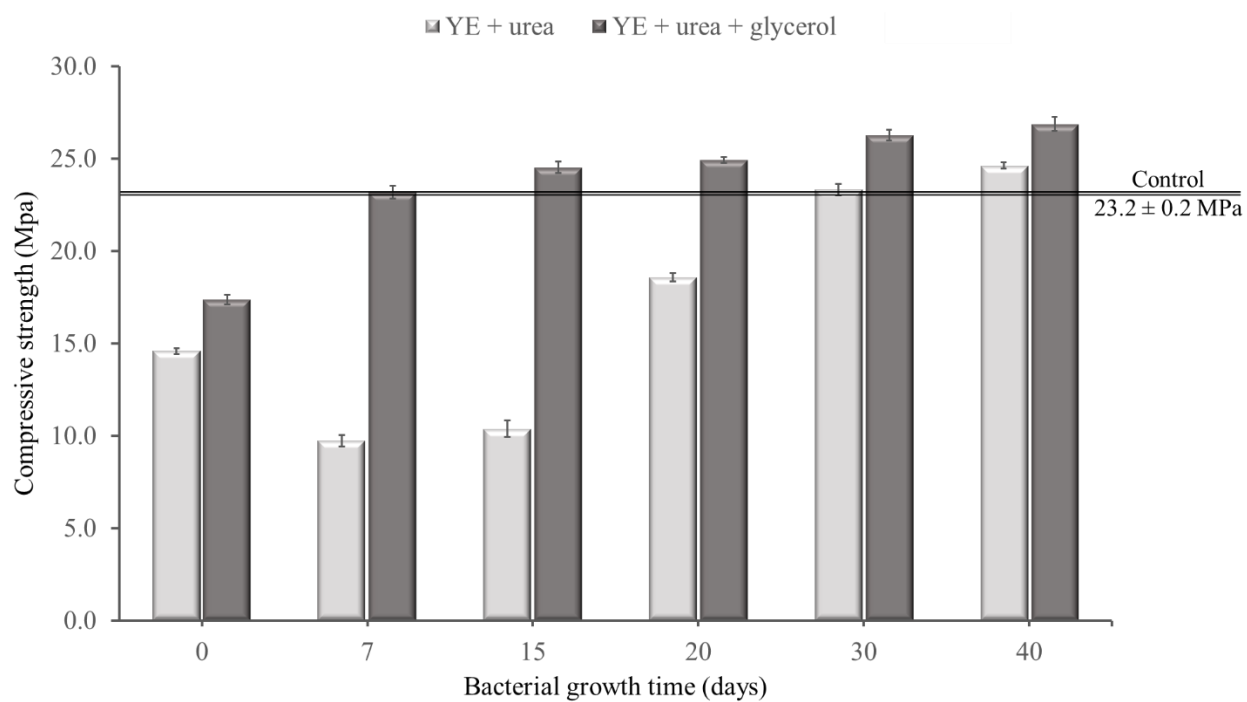




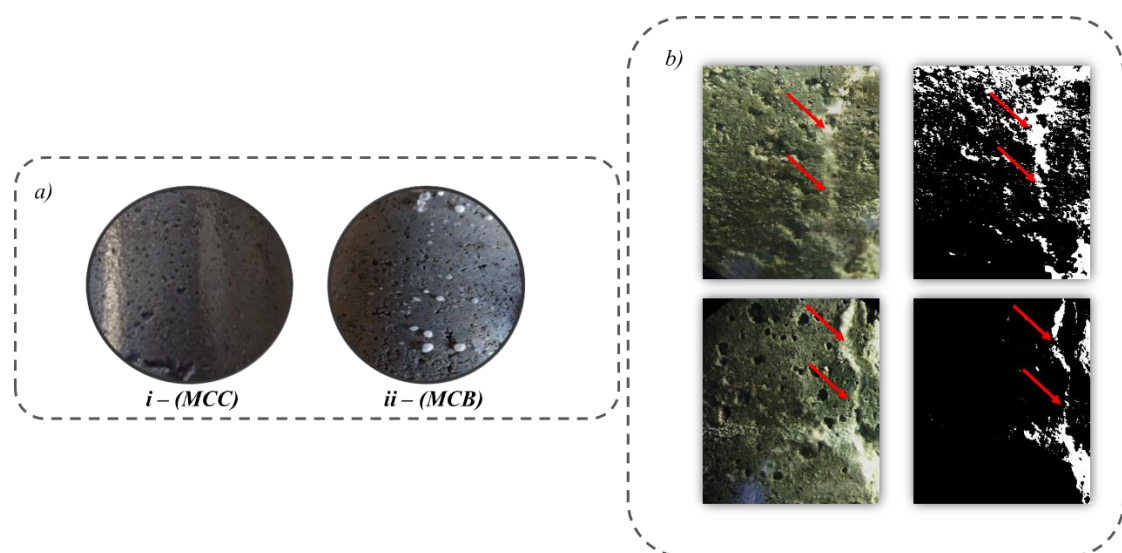
**Figure 2.** Evolution of cell growth from isolates (  $\times$  BP I  $\bullet$  BP II  $\blacktriangle$  BP III  $\diamond$  BP IV  $\square$  BP V ) over 40 days, at 30 °C, pH 9 and 180 rpm in medium with: (a) YE + urea; (b) YE + urea + glycerol; (c) comparison between the maximum values of cells per mL for each isolate from *Bacillus* sp.



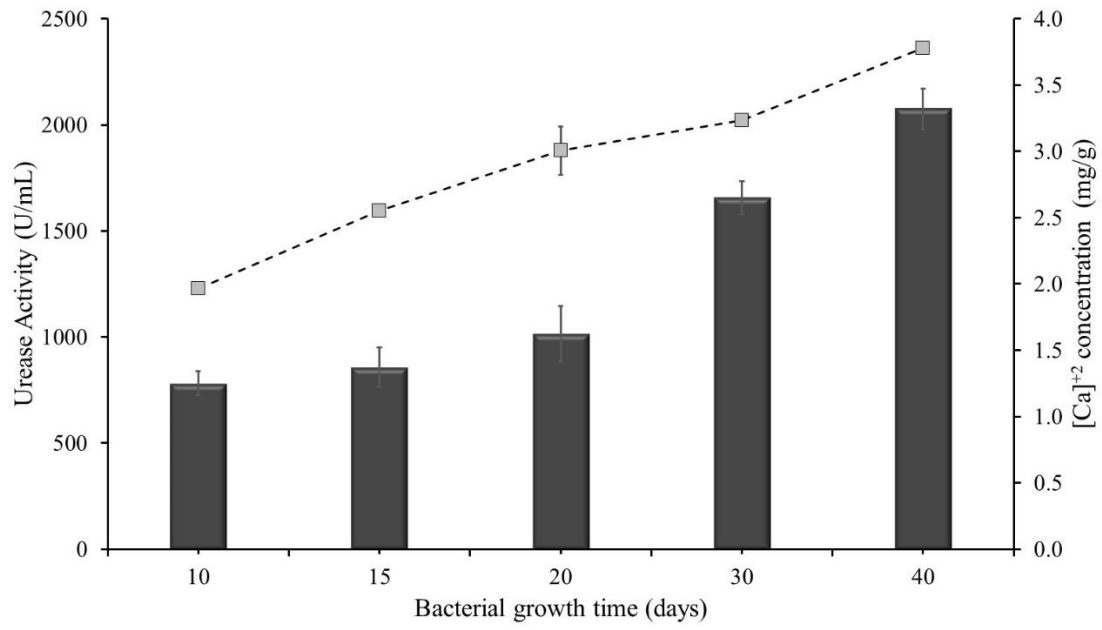
**Figure 3.** Evolution of urease activity from isolates (  $\times$  BP I  $\bullet$  BP II  $\blacktriangle$  BP III  $\diamond$  BP IV  $\square$  BP V ) over 40 days, at 30 °C, pH 9 and 180 rpm in medium with: (a) YE + urea; (b) YE + urea + glycerol; (c) comparison between the highest values of urease activity for each isolate from *Bacillus* sp.



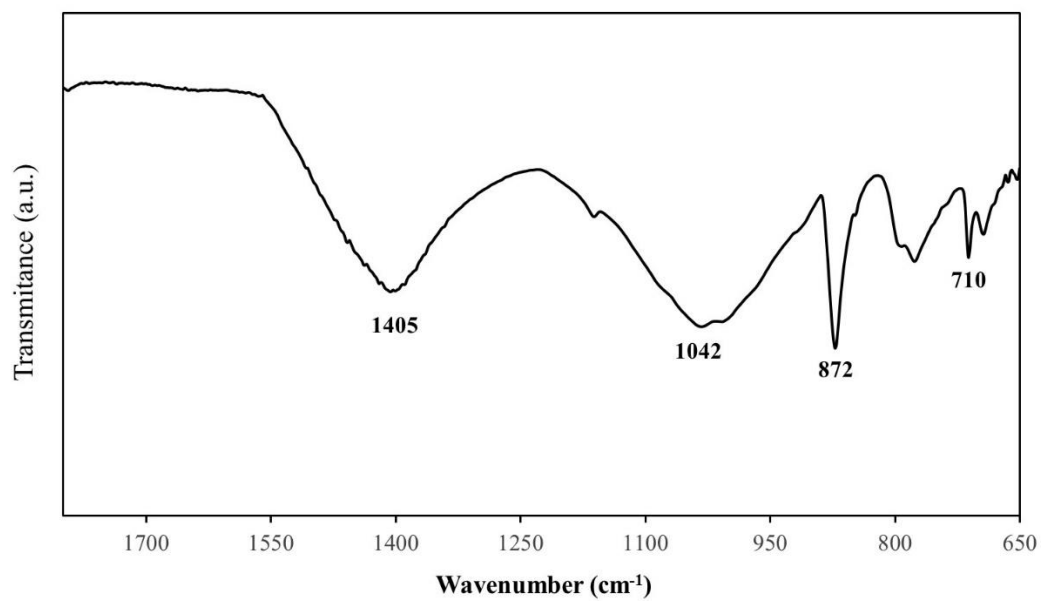
**Figure 4.** Resistance to compression of the cementitious samples in the presence of BP III fermentative extract induced with YE + urea and YE + urea + glycerol in different times of bacterial growth.



**Figure 5.** Image of cementitious molds. a) *i* - control mold, *ii* - mold with fermented extract with BP III; b) MCB mold with crack closure after 28 days of curing.



**Figure 6.** Comparison between urease activity from BP III isolate (dashed line) and concentration of  $[Ca]^{+2}$  (bars) ion contained in cementitious samples after 28 days of curing.



**Figure 7.** FTIR spectrum of the surface of molds prepared with microorganism (MCB).

## Table Captions

**Table 1.** Composition of cementitious molds without the presence of microorganisms – MCC, and with the presence of the fermented extract - MCB.

**Table 2.** Results of biochemical tests and bacitracin system used for bacterial identification.

**Table 3.** Analysis of the sequence of the gene 16S rDNA with the least common ancestor (LCA) method based on the taxonomies hosted by SILVA.

**Table 4.** Kinetic parameters of the fermentative process of the bacterial isolates (BP) through the urease activity in media with YE + urea and YE + urea + glycerol at pH 9.0, 180 rpm and 30°C for 40 days.

**Table 1.** Composition of cementitious molds without the presence of microorganisms - MCC and with the presence of the fermented extract - MCB.

| <b>Mold</b> | <b>Cementitious<br/>(g)</b> | <b>Fine<br/>aggregate<br/>(g)</b> | <b>YE (g)</b> | <b>Urea (g)</b> | <b>Water<br/>(g)</b> | <b>Fermented<br/>extract (g)</b> |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------|-----------------|----------------------|----------------------------------|
| MCC         | 80                          | 240                               | -             | -               | 40                   | -                                |
| MCB         | 80                          | 240                               | 0.68          | 3.2             | 36.8                 | 3.2                              |



**Table 2.** Results of biochemical tests and bacitracin system used for bacterial identification.

| Biochemical Tests and Bacitracin System                        |                               | Strains                                                                                       |             |              |             |            |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|-------------|------------|
|                                                                |                               | Biopetro I                                                                                    | Biopetro II | Biopetro III | Biopetro IV | Biopetro V |
| Gram-positive staining                                         |                               | +                                                                                             | +           | +            | +           | +          |
| Growth on usual media                                          |                               | +                                                                                             | +           | +            | +           | +          |
| Esculin hydrolysis                                             |                               | +                                                                                             | +           | +            | +           | +          |
| Starch Hydrolysis                                              |                               | +                                                                                             | +           | +            | +           | +          |
| Catalase                                                       |                               | +                                                                                             | +           | +            | +           | +          |
| Oxidase                                                        |                               | -                                                                                             | -           | -            | -           | -          |
| Urease                                                         |                               | -                                                                                             | -           | -            | -           | -          |
| Bacitracin I and III System                                    | Beta-galactosidase (ONPG)     | -                                                                                             | -           | -            | -           | -          |
|                                                                | Arginine dihydrolase (ADH)    | +                                                                                             | +           | +            | +           | +          |
|                                                                | Lysine decarboxylase (LDC)    | +                                                                                             | +           | +            | +           | +          |
|                                                                | Ornithine decarboxylase (ODC) | -                                                                                             | -           | -            | -           | -          |
|                                                                | Urease (URE)                  | +                                                                                             | +           | +            | +           | +          |
|                                                                | Voges-Proskauer test (VP)     | +                                                                                             | +           | +            | +           | +          |
|                                                                | Indol Production (IND)        | -                                                                                             | -           | -            | -           | -          |
|                                                                | Citrate utilization (CIT)     | +                                                                                             | +           | +            | +           | +          |
| Bacitracin II System                                           | Arabinose                     | -                                                                                             | -           | -            | -           | -          |
|                                                                | Inositol                      | -                                                                                             | -           | -            | -           | -          |
|                                                                | Mannose                       | -                                                                                             | -           | -            | -           | -          |
|                                                                | Maltose                       | +                                                                                             | +           | +            | +           | +          |
|                                                                | Raffinose                     | -                                                                                             | -           | -            | -           | -          |
|                                                                | Rhamnose                      | -                                                                                             | -           | -            | -           | -          |
|                                                                | Salicin                       | -                                                                                             | -           | -            | -           | -          |
|                                                                | Sorbitol                      | -                                                                                             | -           | -            | -           | -          |
|                                                                | Saccharose                    | +                                                                                             | +           | +            | +           | +          |
| ABIS online system for <i>Bacillus</i> database identification |                               | <i>Bacillus thuringiensis</i> ~ similarity 93.5%<br><i>Bacillus cereus</i> ~ similarity 88.8% |             |              |             |            |

**Table 3.** Analysis of the sequence of the gene 16S rDNA with the least common ancestor (LCA) method based on the taxonomies hosted by SILVA.

| Job_ID | Sequence identifier | Identity | lca_tax_greengenes                                                                    |
|--------|---------------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 595069 | BIOPET_1            | 99.928   | <i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Bacillaceae;g__Bacillus;</i> |
| 595071 | BIOPET_2            | 100.000  | <i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Bacillaceae;g__Bacillus;</i> |
| 595072 | BIOPET_3            | 99.930   | <i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Bacillaceae;g__Bacillus;</i> |
| 595074 | BIOPET_4            | 100.000  | <i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Bacillaceae;g__Bacillus;</i> |
| 595073 | BIOPET_5            | 99.930   | <i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Bacillaceae;g__Bacillus;</i> |

**Table 4.** Kinetic parameters of the fermentative process of the bacterial isolates (BP) through the urease activity in media with YE + urea and YE + urea + glycerol at pH 9.0, 180 rpm and 30°C for 40 days.

| Nutrient source      | Strain (BP) | Product formation (U/mL.day) | Specific microbial speed (day <sup>-1</sup> ) | Specific speed of product (dia <sup>-1</sup> ) | Conversion factor    |
|----------------------|-------------|------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------|
| YE + urea            | I           | 19,32                        | 5,19x10 <sup>-2</sup>                         | 7,96x10 <sup>-4</sup>                          | 1,90x10 <sup>2</sup> |
|                      | II          | 28,48                        | 4,43x10 <sup>-2</sup>                         | 7,31x10 <sup>-5</sup>                          | 1,25x10 <sup>3</sup> |
|                      | III         | 85,08                        | 4,03x10 <sup>-2</sup>                         | 4,11x10 <sup>-6</sup>                          | 1,26x10 <sup>4</sup> |
|                      | IV          | 23,40                        | 4,85x10 <sup>-2</sup>                         | 1,54x10 <sup>-5</sup>                          | 8,74x10 <sup>3</sup> |
|                      | V           | 22,95                        | 5,16x10 <sup>-2</sup>                         | 2,88x10 <sup>-6</sup>                          | 3,48x10 <sup>4</sup> |
| YE + urea + glycerol | I           | 43,74                        | 2,00x10 <sup>-2</sup>                         | 1,11x10 <sup>-5</sup>                          | 1,61x10 <sup>3</sup> |
|                      | II          | 52,39                        | 5,20x10 <sup>-2</sup>                         | 1,59x10 <sup>-5</sup>                          | 5,71x10 <sup>3</sup> |
|                      | III         | 62,63                        | 4,89x10 <sup>-2</sup>                         | 1,07x10 <sup>-6</sup>                          | 1,57x10 <sup>5</sup> |
|                      | IV          | 70,94                        | 3,97x10 <sup>-2</sup>                         | 3,69x10 <sup>-6</sup>                          | 1,30x10 <sup>4</sup> |
|                      | V           | 84,47                        | 3,86x10 <sup>-2</sup>                         | 3,42x10 <sup>-6</sup>                          | 1,74x10 <sup>4</sup> |

## Capítulo 5

### CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou um potencial de diferentes estirpes bacterianas para o processo de auto-cura de concreto via bioprecipitação bacteriana de carbonato de cálcio. Este processo alternativo de recuperação é baseado na manifestação patológica de aberturas em concreto que deteriora e prejudica a vida útil de estruturas.

O potencial de novas linhagens bacterianas caracterizadas como ou *Bacillus cereus* ou *thuringiensis*. A capacidade de urease para as cinco linhagens foram investigadas estrategicamente para diferentes tempos fermentação e com adição de glicerol como impulsionador de produção. Para todas as fermentações foram determinados os parâmetros cinéticos. Os melhores resultados de atividade de urease obtidos foram com o isolado BP III utilizando meio com YE + ureia e glicerol ( $2379,02 \pm 1,35$  U/mL) com crescimento celular de  $4.23 \times 10^7$  cell/mL após 40 dias de fermentação. A bioprecipitação de  $\text{CaCO}_3$  nos moldes cimentícios foi confirmada com FTIR em conjunto com ICP-OES, e um aumento da resistência à compressão de 14,2% foi verificada nos moldes preparados com o isolado BP III.

Portanto, a capacidade de indução destas estirpes, especialmente a BP III foi positivamente influenciada pela presença de glicerol, que ser um importante alternativa para aplicação de glicerina oriunda da produção de biodiesel. Assim, a bioprecipitação de carbonato de cálcio utilizando bactérias isoladas podem fornecer um potencial de auto-cura de concreto em matrizes cimentícias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ACHAL, Varenayam; PAN, Xiangliang. Influence of calcium sources on microbially induced calcium carbonate precipitation by *Bacillus* sp. CR2. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 173, n. 1, p. 307-317, 2014.
- ACHAL, V. et al. Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 36, n. 7, p. 981-988, 2009.
- ALGHAMRI, R.; KANELLOPOULOS, A.; AL-TABBAA, A. Impregnation and encapsulation of lightweight aggregates for self-healing concrete. *Construction and Building Materials*, v. 124, p. 910-921, 2016.
- AL-SALLOUM, Yousef *et al.* Bio-induction and bioremediation of cementitious composites using microbial mineral precipitation—A review. *Construction and Building Materials*, v. 154, p. 857-876, 2017.
- ANBU, Periasamy *et al.* Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *Springerplus*, v. 5, n. 1, p. 250, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Cimento Portland Comum. NBR 5732. Rio de Janeiro, 1991.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Cimento Portland de alto forno. NBR 5735 Rio de Janeiro, 1991.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Concreto — Procedimento para moldagem e cura de corpos de prova. NBR 5738 Rio de Janeiro, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Concreto para fins estruturais. NBR 8953 Rio de Janeiro, 1992.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Impremeabilização - seleção e projeto, NBR 9575, ABNT, Rio de Janeiro, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Projeto e execução de obras em concreto armado - Procedimento, NBR 6118, ABNT, Rio de Janeiro, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 5739: Concreto: ensaio de compressão de corpos-de-prova cilíndricos. Rio de Janeiro, 1994.

- BACHMEIER, Keri L. *et al.* Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology*, v. 93, n. 2, p. 171-181, 2002.
- BANG, Sookie S.; GALINAT, Johnna K.; RAMAKRISHNAN, V. Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. *Enzyme and microbial technology*, v. 28, n. 4-5, p. 404-409, 2001.
- BARKAY, Tamar; SCHAEFER, Jeffra. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, n. 3, p. 318-323, 2001.
- BAUER, L. A. F.(1987) *Materiais de Construção 1. Livros Técnicos e Científicos* Editora, 5ª Edição, Rio de Janeiro – Brasil., 2008.
- BASKAR, S., BASKAR, R., MAUCLAIRE, L., MCKENZIE, J. Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: possible origin for stalactites in Sahastradhara caves, Dehradun, India. *Current science*, 90, 58-64, 2006.
- BENZERARA, Karim *et al.* Significance, mechanisms and environmental implications of microbial biomineralization. *Comptes Rendus Geoscience*, v. 343, n. 2-3, p. 160-167, 2011.
- BERNARDI, D. *et al.* Bio-bricks: Biologically cemented sandstone bricks. *Construction and Building Materials*, v. 55, p. 462-469, 2014.
- CHEKROUN, Kaoutar Ben *et al.* Precipitation and growth morphology of calcium carbonate induced by *Myxococcus xanthus*: implications for recognition of bacterial carbonates. *Journal of Sedimentary Research*, v. 74, n. 6, p. 868-876, 2004.
- BOSAK, Tanja. Calcite precipitation, microbially induced. In: *Encyclopedia of Geobiology*. Springer Netherlands, 2011. p. 223-227.
- CAMADURO, J. R.; ISMAEL, W.; ZATT, P. J. R. Um estudo sobre fissuras em concreto armado. Maringá, PR. 6p. *Encontro Tecnológico da Engenharia Civil e Arquitetura de Maringá*. Maringá, 2000.
- CARVALHO, R. C.; FIGUEIREDO FILHO, J. R. Cálculo e detalhamento de estruturas usuais de concreto armado, Editora Udufscar, São Carlos, 2015.

- CHUNXIANG, Qian *et al.* Corrosion protection of cement-based building materials by surface deposition of  $\text{CaCO}_3$  by *Bacillus pasteurii*. *Materials Science and Engineering: C*, v. 29, n. 4, p. 1273-1280, 2009.
- DHAMI, Navdeep Kaur; REDDY, M. Sudhakara; MUKHERJEE, Abhijit. Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites. *J. Microbiol. Biotechnol*, v. 23, n. 5, p. 707-714, 2013.
- DEJONG, Jason T.; FRITZGES, Michael B.; NÜSSLEIN, Klaus. Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, v. 132, n. 11, p. 1381-1392, 2006.
- DE KOSTER, S. A. L. *et al.* Geopolymer Coating Of Bacteria-Containing Granules For Use In Self-Healing Concrete. *Procedia Engineering*, v. 102, p. 475-484, 2015.
- DE MUYNCK, Willem; DE BELIE, Nele; VERSTRAETE, Willy. Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecological Engineering*, v. 36, n. 2, p. 118-136, 2010.
- DEPARTAMENTO NACIONAL DE ESTRADAS DE RODAGEM. Diretoria de desenvolvimento tecnológico. Divisão de capacitação tecnológica. Manual de implantação básica. 2 ed. Rio de Janeiro, 1996.
- DICK, J.; DE WINDT, W.; DE GRAEF, B.; SAVEYN, H.; VAN DER MEEREN, P.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation* 17, 357-367, 2006.
- FERRIS, F. G. *et al.* Bacteriogenic mineral plugging. *Journal of Canadian Petroleum Technology*, v. 35, n. 08, 1996.
- FERRIS, F. G. *et al.* Kinetics of calcite precipitation induced by ureolytic bacteria at 10 to 20 C in artificial groundwater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 68, n. 8, p. 1701-1710, 2004.
- PHILLIPS, Adrienne J. *et al.* Engineered applications of ureolytic biomineralization: a review. *Biofouling*, v. 29, n. 6, p. 715-733, 2013.
- GANENDRA, Giovanni *et al.* Formate oxidation-driven calcium carbonate precipitation by *Methylocystis parvus* OBBP. *Applied and environmental microbiology*, v. 80, n. 15, p. 4659-4667, 2014.

- GONZÁLEZ, Y.V., SANTANA, Â.P., DE CARVALHO, J.C., Bactérias Nativas Indutoras De Precipitação De Minerais De Carbonato De Cálcio Em Solos Tropicais. 2014.
- HAMMES, F., BOON, N., DE VILLIERS, J., VERSTRAETE, W., SICILIANO, S.D. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Applied and environmental microbiology*, 694901-4909, 2003.
- HAMMES, Frederik; VERSTRAETE, Willy. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in environmental science and biotechnology*, v. 1, n. 1, p. 3-7, 2002.
- HARKES, Marien P. *et al.* Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement. *Ecological Engineering*, v. 36, n. 2, p. 112-117, 2010.
- HELENE, P., TUTIKIAN, B.. Dosagem dos concretos de cimento Portland. *Concreto: Ciência e Tecnologia*, v. 1, p. 415-51, 2011.
- IVANOV, Volodymyr; CHU, Jian. Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 7, n. 2, p. 139-153, 2008.
- JONKERS, H.M., THIJSEN, A., MUYZER, G., COPUROGLU, O., SCHLANGEN, E., Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecological Engineering* 36, 230-235, 2010.
- KANG, Chang-Ho *et al.* Bioremediation of Cd by microbially induced calcite precipitation. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 172, n. 6, p. 2907-2915, 2014.
- KARATAS, Ismail; KAVAZANJIAN, E.; RITTMANN, Bruce E. Microbially induced precipitation of calcite using *Pseudomonas denitrificans*. In: *Proc. of 1st Int. Conf. on Bio-Geo-Civil Engineering*, 23–25 June 2008, Delft, The Netherlands. 2008. p. 58-66.
- KHALIQ, Wasim; EHSAN, Muhammad Basit. Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques. *Construction and Building Materials*, v. 102, p. 349-357, 2016.



- LAUCHNOR, Ellen G. *et al.* Bacterially induced calcium carbonate precipitation and strontium coprecipitation in a porous media flow system. *Environmental science & technology*, v. 47, n. 3, p. 1557-1564, 2013.
- LOWENSTAM, Heinz Adolf; WEINER, Stephen. *On biomineralization*. Oxford University Press on Demand, 1989.
- LOEWENTHAL, R. E.; MARAIS, GvR. *Carbonate Chemistry of Aquatic Systems: Theory and Application*, volume 1, chapter 3. Ann Arbor Science, Ann Arbor (second printing, 1978).
- LUO, Mian; QIAN, Chunxiang. Influences of bacteria-based self-healing agents on cementitious materials hydration kinetics and compressive strength. *Construction and Building Materials*, v. 121, p. 659-663, 2016.
- MEHTA, P. K.; MONTEIRO, P. J. M; CARMONA FILHO, A. *Concreto: estrutura, propriedades e materiais*. Pini, 1994.
- MITCHELL, Andrew C.; FERRIS, F. Grant. The coprecipitation of Sr into calcite precipitates induced by bacterial ureolysis in artificial groundwater: temperature and kinetic dependence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 69, n. 17, p. 4199-4210, 2005.
- MUHAMMAD, Nasiru Zakari *et al.* Tests and methods of evaluating the self-healing efficiency of concrete: A review. *Construction and Building Materials*, v. 112, p. 1123-1132, 2016.
- NG, Wei-Soon; LEE, Min-Lee; HII, Siew-Ling. An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, v. 62, p. 723-729, 2012.
- OKWADHA, George DO; LI, Jin. Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. *Chemosphere*, v. 81, n. 9, p. 1143-1148, 2010.
- PEREZ-PEREZ, Guillermo I.; GOWER, Candida B.; BLASER, Martin J. Effects of cations on *Helicobacter pylori* urease activity, release, and stability. *Infection and immunity*, v. 62, n. 1, p. 299-302, 1994.

- QIAN, Chunxiang *et al.* Theory of Microbial Carbonate Precipitation and Its Application in Restoration of Cement-based Materials Defects. Chinese Journal of Chemistry, v. 28, n. 5, p. 847-857, 2010.
- RAMAKRISHNAN, V. Performance characteristics of bacterial concrete—a smart biomaterial. In: Proceedings of the First International Conference on Recent Advances in Concrete Technology. 2007. p. 67-78.
- RIVADENEYRA, M. A. *et al.* Biomineralization of carbonates by *Halomonas eurihalina* in solid and liquid media with different salinities: crystal formation sequence. Research in Microbiology, v. 149, n. 4, p. 277-287, 1998.
- SÁNCHEZ-ROMÁN, Mónica *et al.* Biomineralization of carbonate and phosphate by moderately halophilic bacteria. FEMS Microbiology Ecology, v. 61, n. 2, p. 273-284, 2007.
- SOUZA, V. C. M., RIPPER T. P., Recuperação e Reforço de Estruturas de Concreto [Livro]. - São Paulo : PINI, 1998.
- STOCKS-FISCHER, Shannon; GALINAT, Johnna K.; BANG, Sookie S. Microbiological precipitation of  $\text{CaCO}_3$ . Soil Biology and Biochemistry, v. 31, n. 11, p. 1563-1571, 1999.
- THOMAZ, E. Trincas em Edifícios: causas, prevenção e recuperação. São Paulo: Pini, EPUSP, IPT, 1989.
- TIANO, P. *et al.* Biomediated reinforcement of weathered calcareous stones. Journal of Cultural Heritage, v. 7, n. 1, p. 49-55, 2006.
- TZIVILOGLOU, E. *et al.* Bacteria-based self-healing concrete to increase liquid tightness of cracks. Construction and Building Materials, v. 122, p. 118-125, 2016.
- YOSHIDA, Naoto; HIGASHIMURA, Eiji; SAEKI, Yuichi. Catalytic biomineralization of fluorescent calcite by the thermophilic bacterium *Geobacillus thermoglucosidasius*. Applied and environmental microbiology, v. 76, n. 21, p. 7322-7327, 2010.
- VALENCIA G. Y. Influência da biomineralização nas propriedades físico-mecânicas de um perfil de solo tropical afetado. 2011.

- VALENCIA-GONZÁLEZ, Yamile; CARVALHO-CAMAPUM, José de; LARA-VALENCIA, Luis Augusto. Influence of biomineralization on a profile of a tropical soil affected by erosive processes. *Dyna*, v. 82, n. 192, p. 221-229, 2015.
- VAN TITTELBOOM, Kim *et al.* Methyl methacrylate as a healing agent for self-healing cementitious materials. *Smart Materials and Structures*, v. 20, n. 12, p. 125016, 2011.
- VIJAY, K., MURMU, M., DEO, S. V. (2017). Bacteria based self healing concrete—A review. *Construction and Building Materials*, 152, 1008-1014.
- WANG, Jianyun *et al.* Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete. *Construction and building materials*, v. 26, n. 1, p. 532-540, 2012.
- WANG, Jianyun *et al.* Application of modified-alginate encapsulated carbonate producing bacteria in concrete: a promising strategy for crack self-healing. *Frontiers in microbiology*, v. 6, 2015.
- WIKTOR, V.; JONKERS, H. M. Determination of the crack self-healing capacity of bacterial concrete. *Concr Sol*, p. 331-334, 2012.
- ZHANG, Qinghua *et al.* Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, v. 41, n. 21, p. 7108-7146, 2012.