Influência da deposição de CaCO_3 oriundos de bactérias *Bacillus* em matrizes de argamassas – introdução a biocicatrização

Pelegrinello, Mateus ¹; Carneiro, Ana Flávia Baú ²

¹ Mateus Pelegrinello, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, mateus@gmx.com.br

² Ana Flávia Baú Carneiro, Universidade Federal do Paraná, ana.bau@ufpr.br

Resumo: A indústria da construção civil é um dos setores mais poluentes do planeta. A tecnologia empregada no aprimoramento das características físicas e químicas dos concretos e argamassas aparenta não estar em sinergia com as questões ecológicas que a sociedade enfrenta. Considerando essas diretrizes, torna-se evidente a chamada biotecnologia, que engloba a utilização de microrganismos no melhoramento das propriedades dos materiais oriundos do cimento. A presente pesquisa tem como objetivo avaliar o uso da bactéria *Bacillus subtilis* na capacidade de precipitar carbonato de cálcio a partir de um nutriente precursor em argamassas. A metodologia dessa pesquisa consistiu na preparação de um meio líquido utilizando o *Bacillus subtilis* com nutrientes necessários para o desenvolvimento onde foram imersos corpos de prova de argamassa com diferentes composições. Após 7 dias embebidos na solução, foram analisadas a influência do tratamento biológico sobre a resistência mecânica por meio do ensaio de resistência à compressão axial, sobre a modificação na porosidade pelo método de absorção de água e sobre a cristalização das matrizes cimentícias pela técnica de microscopia eletrônica de varredura. Observou-se que o tratamento com a bactéria proporcionou benefício em alguns casos, a exemplo de um aumento de até 54% na resistência à compressão em 4 composições. Notou-se também pouca influência na modificação da porosidade, mesmo apresentando precipitação de carbonatos de cálcio na superfície das amostras.

Palavras-chave: Biotecnologia, Bioconsolidação, *Bacillus subtilis*, Carbonato de Cálcio, Sustentabilidade.

Abstract: The construction industry is one of the most polluting sectors on the planet. The technology employed in the improvement of the physical and chemical features of concretes and mortars appears not to be in synergy with the ecological matters confronted by society. Considering these guidelines, the biotechnology, which utilizes microorganisms to improve the properties of cement-based products/materials, becomes evident. The following research aims to evaluate the outcome of the use of the bacteria *Bacillus subtilis*, whose capacity to deposit calcium carbonate implies the biocalcification of cementitious materials. The methodology of this research consisted of the preparation of a liquid media, incorporating *Bacillus subtilis* with the necessary nutrients, where the mortar samples with different compositions and carbonation stages were immersed. After 7 days embedded in the solution, the influence of the biological treatment over the mechanical resistance, the modification in the porosity and the cristalization of the mortars were analysed by the compression test, the water absorption test and the scanning electron microscope (SEM) respectively. It was observed that the bacteria treatment did provide benefits in some cases, following the example of up to 54% increase in the resistance in 4 compositions. It was also noted that the porosity was barely influenced, although cementation of calcium carbonate was detected on the surface.

Keywords: Biotechnology. Bioconsolidation. *Bacillus subtilis*. Calcium Carbonate. Sustainability.

1. Introdução

Os materiais cimentícios têm se mostrado adequados para utilização em sistemas construtivos, principalmente pelo comportamento adaptável e pela facilidade de emprego. Apesar desses benefícios, as patologias são muito comuns, principalmente as fissuras. A peça fissurada pode entrar em contato com água, sulfatos, cloretos, ácidos, dióxido de carbono, dentre outros, acelerando a degradação do material [1].

Para minimizar a entrada de elementos agressivos na superfície e aumentar a durabilidade, são feitos tratamentos de superfície, geralmente com polímeros orgânicos como: epóxi, acrílicos e poliuretanos. A biotecnologia surge como alternativa a estes materiais, pois além de apresentar toxicidade reduzida em relação aos polímeros sintéticos, aumenta a durabilidade dos materiais cimentícios por meio da biomineralização.

Na biomineralização, o uso de bactérias na matriz cimentícia induz a precipitação de carbonato de cálcio (CaCO_3) na superfície e nos poros do material a fim de diminuir a permeabilidade e a biodeterioração [2]. Para isso, as bactérias têm sido empregadas de duas formas: por meio da produção de esporos, que produzem CaCO_3 por reação química, ou pela deposição da membrana celular da bactéria ureolítica, que produz CaCO_3 a partir da hidrólise da ureia. Essa formação de cristais preencherá as fissuras do material, resultando na menor absorção de água e no aumento da resistência mecânica à compressão [3]. Sua aplicação vem sendo estudada para a restauração de esculturas e melhoramento de propriedades de matrizes cimentícias [4].

Neste trabalho, pretende-se avaliar a influência do uso de bactéria na biocalcificação de diferentes composições de matrizes cimentícias por meio da precipitação de carbonato de cálcio visando o aumento da durabilidade.

2. Referencial teórico

2.1 Biomineralização

A biomineralização é a alteração química de um ambiente por atividade microbológica que resulta na precipitação de minerais [5-7]. Esse é um processo comum na natureza no qual organismos vivos formam precipitados minerais [8].

A carbonatogênese é um exemplo de biomineralização que induz a precipitação de carbonatos, sendo derivada das reações químicas entre íons específicos ou compostos metabolizados por um organismo [9]. Nos materiais cimentícios, o uso de bactérias induz a precipitação de carbonato de cálcio na superfície e nos poros do material, sendo esse processo denominado de biocalcificação. Na biocalcificação, a precipitação do CaCO_3 ocorre pela união entre os cátions de cálcio (Ca^{2+}) e os íons carbonato (CO_3^{2-}), sendo a solubilidade do produto formado altamente dependente do pH [9].

Segundo Pacheco-Torgal e Labrincha [10] as principais bactérias utilizadas na biocalcificação são do gênero *Bacillus* cujo metabolismo baseia-se na uréase, na

qual uma enzima transforma a ureia em gás carbônico e amônia (Fig. 1). Os íons cálcio na solução são atraídos para a parede celular bacteriana devido à carga negativa que essa apresenta. Após a adição de ureia para as bactérias ocorre a liberação de dióxido de carbono e amônia.

Figura 1: Precipitação de CaCO_3 a partir da uréase [10, p. 1137]

A atividade da uréase e do teor de CaCO_3 precipitado são baseados em alguns fatores micro ambientais, como a espécie e quantidade de bactérias, pH, temperatura e concentração de ureia e cálcio [11-13].

2.2 Aplicações em matrizes cimentícias

As bactérias têm sido utilizadas a fim de aumentar a durabilidade dos materiais cimentícios por duas maneiras: a biodeposição, ou seja, pela formação de uma película protetora na superfície, que aumenta a resistência à compressão e diminui a permeabilidade do sistema; e pela biocimentação por meio da produção de um ligante induzido biologicamente [3]. O uso desses microrganismos está associado principalmente à precipitação de carbonato de cálcio, que auxilia no preenchimento de microporos e fissuras.

O desenvolvimento de uma bactéria nas matrizes cimentícias é a etapa mais crítica do processo, pois a alta alcalinidade do meio é um aspecto restritivo para a sobrevivência do microrganismo [2]. Para contornar este problema, autores estudam a encapsulação das bactérias em sílica gel e poliuretano para protegê-la do elevado pH da matriz [14].

Diversos trabalhos destinados à restauração de monumentos históricos [4, 15] e tratamento de fissuras de até 0,4 mm de abertura [16] vêm sendo realizados, incluindo diferentes espécies de bactérias. Entretanto, a aplicação de bactérias em materiais cimentícios ainda não é capaz de substituir integralmente os tratamentos convencionais, à base de polímeros, e necessita de mais estudos para viabilizar sua utilização [10,17].

3. Programa experimental

3.1 Argamassas

As argamassas foram moldadas utilizando-se CPV – ARI (Votoran); cal hidratada CH III (Itaú); aditivo incorporador de ar (*MasterAir®701*, Basf); e areia de origem natural quartzosa, com massa unitária igual a 1500 kg/m^3 e massa específica de $2,75 \text{ g/cm}^3$.

Para a elaboração das matrizes foram utilizadas duas relações água/cimento: 0,50 e 0,75, na proporção 1:3 (ligante:areia) em massa. Três composições foram escolhidas: argamassa de referência constituída por cimento e areia; argamassa mista constituída de cimento, cal e areia; e argamassa de referência com adição de 0,3% de aditivo incorporador de ar em relação à massa de cimento. Os traços das argamassas bem como o teor de aditivo e a relação água/cimento são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Traço das argamassas estudadas, teor de aditivo e relação água cimento

Argamassa	Traço em massa (cimento:cal:areia)	Aditivo	a/c
A	1:00:03	-	0,50
B	1:01:06	-	0,50
C	1:00:03	0,3% ⁽¹⁾	0,50
X	1:00:03	-	0,75
Y	1:01:06	-	0,75
Z	1:00:03	0,3% ⁽¹⁾	0,75

⁽¹⁾ Em relação a massa de cimento, conforme recomendação do fabricante

As argamassas foram preparadas em misturador de bancada (HOBART N 50). Os materiais sólidos foram previamente homogeneizados e o aditivo, quando utilizado, foi adicionado na água antes da mistura. Após a mistura, determinaram-se a densidade e o teor de ar das argamassas conforme os procedimentos estabelecidos pela NBR 13278 [18] e foram moldados 12 corpos de prova cilíndricos de 20 mm de diâmetro e 40 mm de altura por composição, totalizando 72 amostras. Após a desmoldagem, os corpos de prova foram colocados em embalagem plástica com umidade relativa igual a 100% durante 11 dias e depois secos em estufa ventilada a 100°C por 24 horas.

3.2 Cultura e aplicação do *Bacillus subtilis*

Utilizou-se o meio sólido com ágar para fazer culturas puras da bactéria liofilizada e após o crescimento bacteriano, foi feita cultura em meio líquido. A concentração de bactérias utilizada para o meio precursor foi de 10^5 bactérias/ml de solução. Para a preparação do meio de cultura bacteriano foi escolhido o B4 modificado, proposto por Zamarréño *et al.* [19], com o $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (acetato de cálcio) como mineral precursor. Os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 20 min.

Tendo finalizado o preparo do meio de cultura, as amostras foram colocadas em um recipiente preenchido com o inóculo bacteriano no período de 7 dias para incorporação dos microrganismos nas matrizes cimentícias. Foram elaborados em torno de 4 litros de meio aquoso para imersão dos seis corpos de prova de cada formulação, separadas em recipientes de vidro individuais (Fig. 2). Findo o tempo de imersão, os corpos de prova foram colocados em estufa por 24h com temperatura de 100°C.

Figura 2: Matrizes submersas na solução de *Bacillus subtilis* + nutrientes + $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$

3.3 Ensaios realizados

Foram realizados ensaios 108 dias após a moldagem para determinação da porosidade e de resistência à compressão, conforme recomendações da NBR 9778 [20] e NBR 7215 [21]. Após obtenção dos resultados mecânicos, as amostras que apresentaram melhor desempenho foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a fim de verificar o tamanho e a morfologia dos cristais precipitados. Foram recortados fragmentos da parte externa das amostras cilíndricas já fraturadas para análise, onde supostamente seria observada maior atividade das bactérias. As amostras tiveram sua superfície recoberta com ouro antes do ensaio. O microscópio utilizado foi o EVO MA15 da marca Carl Zeiss. Para detecção de raios X e análise química elementar das amostras foi utilizado o detector do Sistema de Energia Dispersiva (EDS) Oxford X-Mas de 20 mm².

4. Apresentação e análise dos resultados

4.1 Porosidade das argamassas

Os resultados de porosidade obtidos para as argamassas são apresentados na Figura 3.

Figura 3: Gráfico de porosidade das argamassas antes e após o tratamento

Entre as argamassas com relação a/c igual a 0,5, a argamassa mista (B) apresentou os maiores valores de porosidade. Houve redução de porosidade com o tratamento nas amostras de argamassas mista (B) e com incorporador de ar (C), sendo mais significativa a redução nas argamassas com aditivo (31%). Observa-se que o aumento da relação a/c ocasionou aumento da porosidade em todas as argamassas estudadas, sendo as mistas (B e Y) as com os maiores valores. Observou-se redução de 6% na porosidade com o tratamento nas argamassas com incorporador de ar (Z), um pouco acima das argamassas mistas (Y) que reduziram 5,6%. No caso das argamassas de cimento, houve aumento de 5,8% da porosidade com o tratamento.

4.2 Resistência à compressão axial

Os resultados de resistência à compressão obtidos aos 108 dias para as argamassas são apresentados na Figura 4.

Figura 4: Gráfico de resistência à compressão axial das amostras aos 108 dias

Observou-se um aumento na resistência à compressão na argamassa de cimento com relação a/c de 0,50 e também na argamassa com aditivo incorporador de ar de mesmo teor, que chegou a 32% de aumento. A argamassa mista apresentou redução de 17% da resistência com o tratamento.

A argamassa de cimento com relação a/c de 0,75 tratada obteve o maior valor de resistência à compressão entre as amostras de mesmo teor, com um aumento de 54% se comparada à amostra não tratada. A argamassa com aditivo também apresentou aumento significativo de resistência com o tratamento, chegando a 50% de melhora, enquanto a argamassa mista teve aumento de 24%.

4.3 Análise de imagens

Nas argamassas com relação a/c de 0,50 observou-se a presença de cristais semelhantes a etringita (agulhas aciculares) e silicatos de cálcio hidratados (C-S-H), compostos típicos dos produtos hidratados do cimento (Fig. 3a). As matrizes da argamassa de cimento tipo X não tratadas, cuja relação água/cimento é 0,75, apresentaram, de acordo com a morfologia, cristais similares a portlandita e vaterita (Fig. 5b).

Figura 5: Análise de MEV para argamassas não tratadas A (a) e X (b)

Após o tratamento com a bactéria, a argamassa tipo X aparentemente produziu carbonatos de cálcio sobre a superfície, como pode ser observado na Figura 6. Os resultados da espectrometria por dispersão de energia (EDS) realizada em dois pontos da amostra, indicam a precipitação de CaCO_3 e C-S-H no ponto 2.

Figura 6: Análise de MEV e resultado da análise de EDS para argamassa X tratada

As amostras de argamassa mista com a/c igual a 0,75 (tipo Y) sem tratamento com bactérias apresentaram possíveis cristais de carbonato de cálcio. A análise de EDS realizada em diferentes pontos da argamassa com aditivo de mesmo teor (tipo Z) também sem tratamento apontou possíveis cristais de CaCO_3 morfologicamente semelhantes a vaterita e calcita em sua estrutura mineral (Fig. 7).

Figura 7: Análise de EDS da argamassa Z não tratada e resultados obtidos

Os corpos de prova da argamassa tipo Z tratados revelaram prováveis cristais precipitados de forma irregular e variada (Fig. 8). Com base nos resultados de EDS da amostra Z tratada pela bactéria é possível sugerir a presença de silicatos de cálcio hidratados e carbonato de cálcio.

Figura 8: Análise de MEV para argamassa Z tratada e resultados obtidos no EDS

Cabe salientar que, para se afirmar precisamente os efeitos dos *Bacillus subtilis*, seria mais adequado realizar outros testes importantes como a análise das fases por difração de raios X (DRX) com o intuito de afirmar a estrutura cristalina dos sólidos encontrados no microscópio eletrônico de varredura (MEV).

5. Conclusões

A utilização da biocalcificação de matrizes cimentícias na engenharia de materiais exige a integração de especialistas de diferentes áreas do conhecimento para que seja possível a compreensão dos processos que envolvem a ação das bactérias como a precipitação dos minerais e os efeitos sobre as propriedades dos materiais submetidos ao tratamento.

O intuito desse trabalho era investigar a precipitação de CaCO_3 pela bactéria *Bacillus subtilis*, em argamassas de diferentes composições (cimento, cal e incorporador de ar) e relações água-cimento (0,50 e 0,75). Com base nos resultados pode-se concluir que a leve redução de porosidade com o tratamento nas amostras

mista e com incorporador de ar de ambas as relações a/c foi estatisticamente irrelevante. As matrizes com incorporador de ar com relação a/c igual a 0,50 apresentaram acréscimo de 32% na resistência à compressão após o tratamento com a bactéria. Para a relação a/c igual 0,75 houve aumento de 50% na resistência das amostras com aditivo e 54% nas argamassas de cimento após o tratamento.

Com base na análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDS) foi possível verificar uma provável precipitação do carbonato de cálcio de forma heterogênea nas argamassas tratadas com a bactéria *Bacillus subtilis*. Embora não tenha modificado significativamente a porosidade da maioria das amostras, observou-se aumento de mais de 50% na resistência mecânica das mesmas após o tratamento.

A partir dos resultados obtidos, pode-se inferir que o aumento da relação a/c e a utilização de aditivo incorporador de ar podem, aparentemente, potencializar o efeito das bactérias sobre a resistência à compressão e porosidade das amostras. É preciso destacar que na maioria dos casos, se considerado o desvio padrão, os resultados se tornam estatisticamente iguais. Portanto, novas análises são necessárias para afirmar se existem modificações com maior precisão. Se houvesse continuidade da investigação, talvez fosse possível aprimorar o entendimento da possível precipitação dos *Bacillus*.

6. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a UTFPR pelo apoio financeiro e disponibilização da estrutura de laboratórios, a Profa. Dra. Márcia Aiko Shirakawa do Laboratório de Microestrutura e Ecoeficiência da USP pelo suporte técnico e orientações sobre a cultura das bactérias, ao Laboratório de Biotecnologia e Microbiologia da UTFPR pelo tratamento das culturas, disponibilização dos laboratórios e auxílio no manejo.

7. Referências

- [1] Mehta, P.K.; Monteiro, P.J.M. (2014) *Concreto: estrutura, propriedades e materiais*. São Paulo: Pini.
- [2] Ramachandran, S.K.; Ramakrishnan, V.; Band, S.S. (2001) Remediation of concrete using microorganisms. *Amer. Concr. Institute Materials Journal*, 98:3-9.
- [3] De Muynck, W.; Cox, K.; De Belie, N.; Verstraete, W. (2008) Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Construction and Building Materials*, 22:875-885.
- [4] Tiano, P.; Biagiotti, L.; Mastromei, G. (1999) Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 36:139-145.
- [5] Stocks-Fischer, S.; Galinat, J.; Bang, S. (1999) Microbiological precipitation of CaCO_3 . *Soil Biology & Biochemistry*, 21:1563-1571.
- [6] Barkay, T.; Schaefer, J. (2001) Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current Opinion in Microbiology*, 4:318-323.

- [7] Phillips, A.J.; Gerlach, R.; Lauchnor, E.; Mitchell, A.C.; Cunningham, A.B.; Spangler, L. (2013) Engineered applications of ureolytic biomineralization: a review. *Biofouling*, 29:715-633.
- [8] Soto, A. (2003) *Introducción a los biominerales y biomateriales*. Tese (doutorado), Universidad de Chile.
- [9] Lee, Y.N. (2003) Calcite production by *Bacillus amyloliquefacies* CMB01. *Journal of Microbiology*, 41:345-1141.
- [10] Pacheco-Torgal, F.; Labrincha, J.A. (2013) Biotech cementitious materials: some aspects of innovative approach for concrete with enhanced durability. *Construction and Building Materials*, 40:1136-1141.
- [11] Hammes, F.; Verstraete, W. (2002) Key roles and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Environmental Science & Bio/Technol*, 1:3-7.
- [12] Mortensen, B.M.; Haber, M.J.; Dejong, J.T., Caslake, L.F.; Nelson, D.C. (2011) Effects of environmental factors on microbial induced calcium carbonate precipitation. *Journal of Applied Microbiology*, 111:338-349.
- [13] Ng, S.W.; Lee, M.L.; Hii, S.L. (2012) An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement. *Intern Journal of Civil and Environmental Engineering*, 6:188-194.
- [14] Wang, J.; Tittelboom, K.V.; De Belie, N.D.; Verstraete, W. (2012) Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete. *Construction and Building Materials*, 26:532-540.
- [15] Métayer-Levrel, G. L.; Castanier, S.; Orial, G.; Loubière, C.; Perthuisot, J. P. (1999) Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sedimentary Geology*, 126: 25-34.
- [16] Tittelboom, K. V.; De Belie, N.; De Muynck, W.; Verstrate, W. (2010) Use of bacteria to repair cracks in concrete. *Cem and Concrete Research*, 40: 157-166.
- [17] Anbu, P.; Kang, C.; Shin, Y.; So, J. (2016) Formation of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *SpringerPlus*, 5:520, 2016.
- [18] NBR 13278 (2005) Argamassa para assentamento e revestimento de paredes e tetos – Determinação da densidade de massa e do teor de ar incorporado. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, Rio de Janeiro, Brasil.
- [19] Zamarreño, D.V.; Inkpen, R.; May, E. (2009) Carbonate crystals precipitated by freshwater bacteria and their use as a limestone consolidant. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:5981-5990.
- [20] NBR 9778 (2009) Argamassa e concreto endurecidos – Determinação da absorção de água, índice de vazios e massa específica. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, Rio de Janeiro, Brasil.
- [21] NBR 7215 (2003) Cimento Portland – Determinação da resistência à compressão. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, Rio de Janeiro, Brasil.