Avaliação da influência da adição de nutrientes no processo de autocicatrização de fissuras em materiais a base de cimento a partir do emprego da bactéria *Bacillus subtilis* (AP 91)

P. Ghellere^{1,2 *}, S. Lenz¹, M. R. Z. Passarini², A. C. P. Dos Santos¹; E. Possan¹

*Polyana Ghellere: p_ghellere@hotmail.com

¹ Departamento de Construção Civil, Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, Brasil

² Laboratório de Biotecnologia Ambiental, Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, Brasil

RESUMO

Este estudo avalia a influência da incorporação de nutrientes (extrato de levedura e acetado de cálcio) e do tipo de cura no processo de autocicatrização em amostras a base de cimento, empregando esporos da bactéria *Bacillus subtilis* (AP91) na água de amassamento. Para cinco argamassas (1:3:0,48) e três tipos de cura (submersa, úmida com e sem aspersão de esporos bacterianos), foram produzidas amostras de 4x4x16 cm fissuradas e não fissuradas, para análise da autocicatrização e propriedades mecânicas, respectivamente. As fissuras foram monitoradas em estereomicroscópio aos 7, 14, 21 e 28 dias. Os resultados indicam que a adição da bactéria, com ou sem nutrientes, favoreceu a precipitação de CaCO_3 , promovendo fechamento pontual ou contínuo de fissuras e microfissuras, sendo mais favorável na cura úmida sem aspersão de esporos. Dessa forma, a autocicatrização biológica apresenta-se como uma ferramenta promissora em termos de manutenção de manifestações patológicas.

Palavras-chave: Autocura; agentes biológicos; carbonato de cálcio; materiais a base de cimento.

ABSTRACT

This study considers the influence of the nutrient's incorporation (yeast extract and calcium acetate) and the cure type in the self-healing process of cement-based samples, using spores of the bacterium *Bacillus subtilis* (AP91) in the mixing water. 4x4x16 cm samples of five mortars (1: 3: 0.48) and three types of curing (submerged; wet with and without sprinkling of bacterial spores), cracked and non-cracked, were produced for the analysis of self-healing and mechanical properties. Cracks were monitored in a stereo microscope at 7, 14, 21 and 28 days. The results indicate the bacteria addition, with or without nutrients, improved the precipitation of CaCO_3 , promoting punctual or continuous closure of cracks and micro-cracks, being more favorable in wet curing without spore sprinkling. Thus, biological self-healing presents itself as a promising tool in terms of maintaining pathological manifestations.

Key words: Self-healing; biological agents; calcium carbonate; cement-based materials.

RESUMEN

Este estudio evalúa la influencia de la incorporación de nutrientes (extracto de levadura y acetato de calcio) y del tipo de curado en el proceso de autocurado en muestras cementantes, utilizando esporas de la bacteria *Bacillus subtilis* (AP91) en el agua de amasado. Para cinco morteros (1: 3: 0.48) y tres tipos de curado (sumergido; húmedo con y sin aspersión de esporas bacterianas), se produjeron muestras de 4x4x16 cm agrietadas y no agrietadas para el análisis de autocuración y propiedades mecánicas, respectivamente. Las grietas fueron monitoreadas al microscopio a los 7, 14, 21 y 28 días. Los resultados indican que la adición de las bacterias, con o sin nutrientes, favoreció la precipitación de CaCO_3 , promoviendo el cierre puntual o continuo de grietas y microgrietas, siendo más favorable en curado húmedo sin aspersión de esporas. Así, el autocurado biológico se presenta como una herramienta promissora en términos de mantenimiento de manifestaciones patológicas.

Palabras clave: Autocurado; agentes biológicos; carbonato de calcio; materiales a base de cemento.

1. INTRODUÇÃO

As fissuras são manifestações patológicas muito comuns no concreto, sendo ocasionadas por vários fatores, como sobrecargas, deformações devido a diferenças de temperatura, recalque diferencial, retração, além de reações expansivas. As fissuras podem ocasionar a redução da durabilidade, pois facilitam a entrada de água e/ou outros agentes agressivos que podem levar as armaduras à corrosão, desencadeando problemas estruturais às edificações de concreto armado. Na ausência de tratamentos rápidos e apropriados, o problema das fissuras pode evoluir, levando à necessidade de reparos onerosos, tanto sob o ponto de vista financeiro, como sustentável, dada a necessidade de utilização de mais materiais/recursos no processo (Van Tittelboom *et al.*, 2010).

Estão em crescimento/desenvolvimento estudos que buscam encontrar soluções para correção de fissuras, de modo a tornar o concreto mais durável e sustentável, com menores investimentos ao longo do ciclo de vida, fazendo com que novas tecnologias sejam desenvolvidas. Uma das alternativas promissoras é a autocicatrização do concreto (Wiktor and Jonkers, 2011; Schwantes-Cezario, Nogueira and Toralles, 2017; Gulin, 2019). A autocicatrização do concreto ocorre naturalmente quando a água penetra nas fissuras e hidrata as porções remanescentes de cimento anidro (nominada de autocicatrização autógena). Este preenchimento é atribuído, quase que exclusivamente, à formação de carbonato de cálcio (CaCO_3), porém de forma limitada (Repette, 2011). Sendo assim, explorar o uso de algum material que precipite CaCO_3 em maior quantidade pode ser altamente vantajoso.

Neste sentido, existem agentes biológicos, especialmente bactérias, capazes de precipitar CaCO_3 em seus processos metabólicos. A aplicação destes organismos em materiais cimentícios pode proporcionar o fechamento de fissuras reduzindo a porosidade e propiciando o aumento da resistência à compressão e da vida útil (De Belie and De Muynck, 2009; Wiktor and Jonkers, 2011; Gulin, 2019).

A incorporação desses agentes biológicos em materiais a base de cimento pode ocorrer basicamente de três maneiras: adicionados à água de amassamento; imersão das amostras em solução bacteriana; ou, por aspersão de solução em amostras já fissuradas (Vijay, Murmu and Deo, 2017). Quando incorporadas à água de amassamento, as bactérias podem ser aplicadas diretamente na matriz a base de cimento com ou sem formação de esporos (Jonkers *et al.*, 2010), encapsuladas em materiais porosos como argila (Lucas *et al.*, 2018) e perlita (Alazhari *et al.*, 2018), ou hidrogel (Wang *et al.*, 2018) e sílica gel (Wang *et al.*, 2012). Jonkers e Thijssen (2010) sugerem, ainda, a adição das bactérias em matrizes com ar incorporado.

Na autocicatrização biológica, o CaCO_3 é precipitado metabolicamente por bactérias inseridas no material cimentício. Para que este processo ocorra, devem também ser inseridos nutrientes, como o extrato de levedura, que servirão como fonte de energia para o desenvolvimento microbiano. Também, é importante a adição de fontes de cálcio, como acetato e/ou lactato de cálcio, precursores da precipitação de CaCO_3 (Wang *et al.*, 2018).

Apesar da grande variedade de bactérias existentes, nem todas são apropriadas para incorporação em matrizes cimentícias, onde tem-se um ambiente altamente alcalino, sem nutrientes e com oxigênio apenas nos poros e superfície, de modo a dificultar o crescimento bacteriano (Van Tittelboom *et al.*, 2010). Sendo assim, é fundamental para a sobrevivência das bactérias nestes ambientes, que elas sejam capazes de formar esporos (estruturas extremamente resistentes), de modo a garantir a sobrevivência destes agentes à ação da mistura mecânica e às condições ambientais adversas de concretos e argamassas (Jonkers *et al.*, 2010). Exemplos de bactérias que se encaixam neste contexto e que atendem à essas condições, são as do gênero *Bacillus* (Schwantes-Cezario, Nogueira and Toralles, 2017).

A incorporação de elementos (químicos, minerais, biológicos, etc.) na matriz cimentícia pode influenciar nas propriedades dos materiais a base de cimento (Monteiro, 2014). Dessa forma, com a adição de bactérias, seus precursores e nutrientes, faz-se necessário um estudo de como os mesmos atuarão, para garantir que as estruturas não percam qualidade, e atinjam o desempenho e durabilidade necessários (Schwantes-Cezario, Nogueira and Toralles, 2017).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo analisar a influência da adição de esporos da linhagem *Bacillus subtilis* AP91 e seus nutrientes (extrato de levedura e acetato de cálcio), nas propriedades mecânicas de argamassas (resistência à tração na flexão e resistência à compressão) e na autocicatrização das fissuras submetidas a diferentes condições de cura (submersa, e úmida com aspersão e sem aspersão de esporos).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi dividido em três etapas principais. Na primeira etapa foi realizado o cultivo, esporulação e quantificação dos esporos da bactéria *B. subtilis* (AP91); na segunda foi realizado a produção e cura das argamassas a base de cimento; e na terceira foi realizado os ensaios experimentais referentes a análise das fissuras e as propriedades mecânicas das argamassas.

2.1 Microrganismo e condição de crescimento

A linhagem *B. subtilis* (AP91), disponibilizada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), foi usada neste estudo devido sua capacidade comprovada de precipitar CaCO_3 (Schwantes-Cezario *et al.*, 2017). Para verificar a precipitação de carbonato de cálcio a *B. subtilis* (AP91) foi inoculada e cultivada em placas de Petri contendo meio B4 (4g L^{-1} de extrato de levedura, 14g L^{-1} de ágar bacteriológico, 2,5 mL L^{-1} de solução de vermelha fenol, 12,5 mL L^{-1} de glicose a 40% e 25 mL L^{-1} de acetato de cálcio a 10%) com o indicador de pH vermelho de fenol em três condições diferentes: (a) padrão B4; (b) ácido B4, tamponado a pH 7,0; e (c) alcalina B4, tamponada a pH 8,2. O pH de cada meio de cultivo foi mantido tamponando utilizando tris 1,2% (p/v). As placas foram incubadas na estufa (BOD) a 37 °C durante 7 dias (Marvasi *et al.*, 2010; Marvasi, Davila-Vazquez and Martinez, 2013).

Após o crescimento, a linhagem foi inoculada e cultivada em tubos Falcon de 15 mL contendo meio de cultura Mueller Hinton (MH) líquido, constituído por 17 g L^{-1} de peptona de caseína, 2 g L^{-1} de peptona de carne e 1,5 g L^{-1} de amido, com pH final 7,3 $\pm$ 0,1. Em seguida foram colocadas no agitador Shaker por 66 horas a uma rotação de 130 rpm e uma temperatura média de 37 °C. Após o período de agitação, a solução com as bactérias foi lavada para remover o meio de cultura e obter uma solução mais concentrada de bactérias. Para isto, o meio de cultura foi centrifugado em tubos

Falcon durante 20 minutos a uma rotação de 3600 rpm, onde o sobrenadante foi removido e substituído por uma solução salina de NaCl a 0,85%. O procedimento foi repetido duas vezes ($n = 2$). Em seguida, a solução salina contendo bactérias foi armazenada por dois dias à temperatura de 8 °C para induzir a formação de esporos (Schwantes-Cezario *et al.*, 2018).

A quantificação dos esporos bacterianos cultivados em meio de cultura MH foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro com leitura a 600 nm. Para o teste foram utilizadas duas alíquotas de 1 mL (Khaliq and Ehsan, 2016), o controle com solução salina a 0,85% e as bactérias crescidas em solução de MH, diluída em solução salina a 0,85%. A concentração de bactérias no meio foi calculada pela equação (1) aplicada por Ramachandran; Ramakrishnan; Bang (2001).

$$Y = (8,59 \times 10^7) \times (X^{1,3627}) \quad (1)$$

onde: X = absorvência (a); Y = concentração de esporos por mL.

O procedimento foi realizado três vezes adotando o valor médio da concentração de bactérias (Kim *et al.*, 2013). A partir da concentração encontrada, os cálculos de diluição foram feitos para atingir uma concentração de 10^6 esporos mL^{-1} . A diluição foi feita em água destilada. A suspensão com esporos bacterianos foi subsequentemente mantida em geladeira a 4 °C até ser utilizada na mistura do material cimentício (Jonkers *et al.*, 2010).

2.2 Argamassa

As amostras de argamassa (Tabela 1) foram produzidas utilizando os seguintes materiais: cimento Portland de alta resistência inicial (CPV ARI), agregado fino (areia natural), água, esporos de *B. subtilis* (B) diluídos em água, acetato de cálcio (A) e extrato de levedura (E). Os esporos das bactérias, em uma concentração de 10^6 esporos mL^{-1} , o acetato de cálcio e o extrato de levedura foram adicionados na água de mistura em diferentes combinações, dessa forma produzindo cinco variações de argamassas. A proporção de cimento-areia utilizada foi de 1:3, em massa, e a relação água-cimento (a/c) foi de 0,48 (Tabela 2).

Tabela 1 – Nomenclatura das argamassas

Nomenclatura	Composição
R	Argamassa de referência produzida com cimento, areia e água
B	Argamassa com adição de esporos na água de mistura
B+A	Argamassa com adição de esporos + acetato de cálcio na água de mistura
B+E	Argamassa com adição de esporos + extrato de levedura na água de mistura
B+A+E	Argamassa com adição de esporos + acetato de cálcio + extrato de levedura na água de mistura

Tabela 2 – Proporção de mistura das argamassas com agentes biológicos

Argamassas	Quantidade de materiais (g)			Esporos <i>B. subtilis</i> mL^{-1}	Nutrientes (%)	
	Cimento	Areia	Água		A*	B**
R	900	2700	432	-	-	-
B	900	2700	432	10^6	-	-
B+A	900	2700	432	10^6	1	-
B+E	900	2700	432	10^6	-	1
B+A+E	900	2700	432	10^6	1	1

*Concentração de acetato de cálcio em relação a concentração de cimento (Jonkers *et al.*, 2010).

**Concentração de extrato de levedura em relação a concentração de cimento (Jonkers *et al.*, 2010).

O procedimento de mistura das argamassas foi realizado com misturador portátil, onde primeiro foram adicionados os componentes secos (cimento, areia, acetato de cálcio e extrato de levedura) misturando-os manualmente. Depois, a água com a solução de esporos foi sendo adicionada aos

poucos, seguida de nova mistura manual. Por fim, a mistura foi homogeneizada mecanicamente por um minuto, depois misturada manualmente para raspar a argamassa aderida na superfície lateral do balde e novamente misturada mecanicamente por mais dois minutos.

Foram produzidas amostras de argamassas com e sem armadura (4,8 mm de diâmetro e 15 cm de comprimento, posicionada a 1 cm da base) usando moldes prismáticos de 4x4x16 cm de acordo com a NBR 13279 (2005). As amostras foram desmoldadas após 48 horas e armazenadas no laboratório em cura úmida envoltas por uma manta de drenagem de solo sob condições de temperatura e umidade não controladas. As amostras de argamassa com armadura (usadas para análise da recuperação de fissuras) foram submetidas a cura úmida por 7 dias (até a idade de abertura das fissuras). As amostras de argamassa sem armadura (usadas para a avaliação da resistência à tração na flexão de 3 pontos e à compressão) foram submetidas a cura úmida por 28 dias. O procedimento de fissuração consistiu na aplicação, constante e lenta, de carga em amostras de argamassa com armadura após 7 dias de cura até o surgimento da primeira fissura sendo descarregada em seguida, por meio do ensaio de tração na flexão de 3 pontos utilizando uma prensa hidráulica (Figura 1).

Figura 1 – Ensaio de tração na flexão de 3 pontos

Após a fissuração, as amostras foram submetidas a três condições diferentes de cura: submersa em água; úmida envolta em manta de drenagem com e sem aspersão de solução com esporos (Tabela 3). A solução com esporos foi aspergida uma vez por semana, ao longo de 7, 14, 21 e 28 dias para o monitoramento do preenchimento das fissuras.

Tabela 3 - Programa experimental

Grupo	CPs	Número de CPs quanto ao tipo de cura			Ensaio mecânico (dias)*	Monitoramento das fissuras (dias)**
		Submersa	Úmida sem aspersão	Úmida com aspersão		
REF	NA	-	3	-	28	-
	A	1	1	1	-	0, 7, 14, 21, 28
B	NF	-	3	-	28	-
	NA	1	1	1	-	0, 7, 14, 21, 28
B+A	NA	-	3	-	28	-
	A	1	1	1	-	0, 7, 14, 21, 28
B+E	NA	-	3	-	28	-
	A	1	1	1	-	0, 7, 14, 21, 28
B+A+E	NA	-	3	-	28	-
	A	1	1	1	-	0, 7, 14, 21, 28

Onde: CPs: corpos de prova; NA: não armado; A: armado; B: bactéria *B. subtilis*; A: acetato de cálcio; E: extrato de levedura

* Data para realização dos ensaios de resistência à tração na flexão de 3 pontos e à compressão.

** Datas para realização do monitoramento das fissuras.

2.3 Métodos experimentais

2.3.1 Análise das fissuras

O monitoramento visual das fissuras durante o período de cura, aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias após fissuração, foi realizado por imagens obtidas em um Estereomicroscópio Óptico (da marca Zeiss Discovery.V12) com lentes Zeiss PlanApo S 1.0x FWD de 60 mm, ligado a uma câmera Zeiss AxioCam 105 com ampliação de até 100x e rodando o software AxioVision SE64.

As análises visuais do preenchimento das fissuras foram realizadas sempre com o mesmo fragmento central, de 1,4 cm de comprimento, de cada amostra de argamassa (Figura 2). Foram analisadas três amostras de cada grupo de argamassa ($n = 3$), onde cada amostra foi submetida a diferentes condições de cura (submersa, úmida sem aspersão de esporos e úmida com aspersão de esporos).

Figura 2 – Seguimento da fissura analisado

Os ensaios de resistência à tração na flexão de 3 pontos e à compressão foram realizados com amostras prismáticas de argamassa sem armadura de 4x4x16 cm com 28 dias de idade ($n = 3$ e 6, respectivamente) de acordo com a NBR 13279 (2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Análise das fissuras

As imagens obtidas no monitoramento das fissuras para os três processos de cura em estudo são mostradas nas Tabelas 4, 5 e 6. Como pode-se observar as fissuras apresentam espessuras diferentes, com valores que variam de 0,17 a 0,88 mm, isso se deve a dificuldade encontrada durante o ensaio de fissuração para produzir fissuras de tamanhos similares. Para minimizar as diferentes larguras entre as fissuras a autora Hollmann (2020) recomenda a fissuração de um número grande de amostras, a fim de possibilitar a seleção daquelas que apresentam fissuras com espessuras similares.

Durante a análise do fechamento das fissuras, observou-se que o tamanho inicial da largura da fissura teve influência no processo de biorecuperação das mesmas. Amostras com fissuras de pequenas aberturas (inferior a 0,25 mm) tiveram mais sucesso no processo de aut cicatrização, para o período avaliado. Estudos realizados por Xu e Yao (2014) afirmam que as larguras das fissuras de 0,1 a 0,4 mm foram parcialmente seladas, por precipitados minerais formados pelo metabolismo bacteriano. Luo, Qian e Li (2015) afirmam que as fissuras com larguras médias de 0,1-0,3 mm e 0,3-0,5 mm foram quase totalmente curadas ($\geq 85\%$ e 50 a 70% de reparo, respectivamente), e 0,5-0,8 mm foram parcialmente curadas ($\leq 30\%$ de reparo).

Outro fator observado que influenciou no processo de recuperação das fissuras foi o tipo de cura que as amostras foram submetidas. Amostras submetidas à cura submersa (Tabela 4) e amostras submetidas à cura úmida, sem aspersão de esporos (Tabela 5) apresentaram maiores taxa de sucesso na precipitação de cristais na região fissurada.

Tabela 4 – Monitoramento por imagem das fissuras em cura submersa (ampliação de 8x em estereomicroscópio óptico com câmera acoplada)

Grupo	Tempo de cura (dias)				
	0	7	14	21	28
Referência (REF)
Bactéria (B)
Bactéria + Acetado de Cálcio (B+A)
Bactéria + Extrato de Levedura (B+E)
Bactéria + Acetado de Cálcio + Extrato de Levedura (B+A+E)

Na Tabela 4, constatou-se a precipitação de carbonato de cálcio nas amostras produzidas somente com esporos bacterianos (B), com esporos mais acetato de cálcio (B+A) e com esporos mais acetato de cálcio mais extrato de levedura (B+A+E) quando submetidas a cura submersa.

Nas amostras submetidas à cura úmida sem aspersão de esporos (Tabela 5), constatou-se CaCO_3 precipitado nas amostras produzidas somente com esporos bacterianos (B), com esporos mais extrato de levedura (B+E) e com esporos mais acetato de cálcio mais extrato de levedura (B+A+E). Já nas amostras submetidas à cura úmida com aspersão de esporos (Tabela 6), a precipitação de carbonato foi observada na amostra produzida com esporos mais extrato de levedura (B+E).

Tabela 5 – Monitoramento por imagem das fissuras em cura úmida sem aspersão de esporos (ampliação de 8x em estereomicroscópio óptico com câmera acoplada)

Grupo	Tempo de cura (dias)				
	0	7	14	21	28
Referência (REF)
Bactéria (B)
Bactéria + Acetato de Cálcio (B+A)
Bactéria + Extrato de Levedura (B+E)
Bactéria + Acetato de Cálcio + Extrato de Levedura (B+A+E)

A visualização do fechamento das fissuras por meio da precipitação de cristais pode ser mais bem observada nos detalhes mostrados nas Figuras 3, 4 e 5, em que se observam cicatrizações pontuais e/ou contínuas. A recuperação da fissura nas amostras submetidas à cura submersa (Figura 3) ocorreu na região de microfissuras de forma pontual para a amostra B e contínua para a B+A.

Tabela 6 – Monitoramento por imagem das fissuras em cura úmida com aspersão de esporos (ampliação de 8x em estereomicroscópio óptico com câmera acoplada)

Grupo	Tempo de cura (dias)				
	0	7	14	21	28
Referência (REF)
Bactéria (B)
Bactéria + Acetato de Cálcio (B+A)
Bactéria + Extrato de Levedura (B+E)
Bactéria + Acetato de Cálcio + Extrato de Levedura (B+A+E)

Na amostra B+A+E verifica-se uma redução da abertura da fissura aos 28 dias, com precipitação de cristas na região de fissura de forma pontual e contínua. Para a cura úmida, sem aspersão de esporos (Figura 4), observa-se que a precipitação de carbonato ocorreu de forma contínua na região de microfissuras nas amostras B e B+E, e na amostra B+A+E ocorreu na região de fissura de forma pontual e na região de microfissura de forma contínua. Em relação à cura úmida, com aspersão de esporos (Figura 5), verifica-se que a precipitação de carbonato ocorreu na região de fissura de forma pontual e na região de microfissura de forma contínua na amostra B+E.

Tanto nas amostras submetidas à cura submersa quanto nas amostras submetidas a cura úmida, sem aspersão de esporos, o melhor resultado em relação à recuperação das fissuras foi obtido quando adicionado três componentes juntos: bactéria como agente autocicatrizante; acetato de cálcio como

fonte de cálcio na precipitação de cristais; e, extrato de levedura como fonte de nutriente para o crescimento da bactéria na matriz cimentícia. Os estudos desenvolvidos por Lucas et al. (2018) e Jang et al. (2020), relatam um ganho de eficiência na cicatrização de fissuras ao adicionar na mistura do concreto uma combinação de três componentes, bactéria do gênero *Bacillus*, lactato de cálcio e extrato de levedura, em comparação com o concreto sem adição destes componentes.

Figura 3 – Detalhe da região recuperada de amostras submetidas à cura submersa (ampliação de 30x)

Figura 4 – Detalhe da região recuperada de amostras submetidas à cura úmida sem aspersão de esporos (ampliação de 30x)

Figura 5 – Detalhe da região recuperada de amostras submetidas à cura úmida com aspersão de esporos (ampliação de 30x)

Já entre as amostras submetidas a cura úmida com aspersão de esporos, o melhor resultado em relação à recuperação das fissuras foi obtido quando adicionado dois componentes em conjunto: bactéria como agente autocicatrizante; e, extrato de levedura como fonte de nutriente para o crescimento da bactéria na matriz cimentícia. Segundo estudos desenvolvidos por Naguyen et al. (2019), as amostras de concreto produzidos com a adição de bactéria *B. subtilis* combinado com peptona e extrato de levedura na mistura apresentaram maior eficiência de cura das fissuras em comparação a amostras de concreto controle.

O processo de autocicatrização das fissuras por meio da biodeposição de CaCO_3 por bactérias é influenciado pela presença destes microrganismos e dos nutrientes na região da fissura (Wiktor and Jonkers, 2011). Sendo assim, algumas fissuras talvez não tenham apresentado precipitação de carbonato de cálcio, devido à ausência ou insuficiência de microrganismos e/ou nutrientes no local na região fissurada. Isso se deve à distribuição dos microrganismos e/ou nutrientes não ocorrer de forma homogênea durante a produção das amostras de argamassa, dificultando a análise dos resultados. Outra questão a ser considerada é a não ativação dos esporos bacterianos no período de estudo, que é influenciada pela temperatura do ambiente ideal que varia de 20 °C a 37 °C (Arunachalam *et al.*, 2010), pela disponibilidade de umidade (De Koster *et al.*, 2015) e de oxigênio (Bhaskar *et al.*, 2017) nas fissuras, e pelo pH ideal da matriz cimentícia em torno de 9 (Pacheco-Torgal and Labrincha, 2013).

Ainda, a análise do fechamento das fissuras deve levar em consideração a abertura inicial da fissura. Segundo Jonkers et al. (2010) o uso de bactérias na biodeposição de CaCO_3 resultará no reparo autônomo de fissuras com larguras menores que 1 mm. Estudos realizados por Vashisht e Shukla (2020) comprovaram por análise visual a autocura de macro fissuras com larguras de até 0,48 mm.

3.2 Propriedades mecânicas das argamassas

Em relação a resistência à tração na flexão observa-se na Figura 6 que as amostras de controle (B, B+A, B+E e B+A+E) apresentaram valores de resistência maiores que a amostra de referência. Entre as amostras de controle o melhor resultado (6,95 MPa) foi apresentado pela argamassa com esporos e extrato de levedura (B+E) adicionados à mistura, correspondendo a um incremento de resistência à tração de 27% em relação à de referência. Já em relação a resistência à compressão, observa-se que as amostras de controle (B, B+A e B+E) apresentaram valores de resistência inferiores à amostra de referência. Entre as argamassas avaliadas o melhor resultado (31,86 MPa) foi apresentado pela argamassa com esporos mais acetato de cálcio mais extrato de levedura (B+A+E) adicionados à mistura. A resistência à compressão desta mistura foi similar à de referência (0,28% inferior), estando na faixa de variação típica do ensaio.

Figura 6 – Efeito da linhagem *B. subtilis* AP91 nas propriedades mecânicas após 28 dias de cura

Nain et al. (2019) relatam que a resistência à tração do concreto produzido com adição combinada de bactéria *B. subtilis* e caldo nutriente composto por peptona, cloreto de sódio, extrato de levedura e extrato de carne, apresentou melhores resultados em comparação ao concreto controle. Estudos realizados por Jonkers et al. (2010), demonstraram que as amostras de pasta cimento produzidas com adição de bactérias *Bacillus pseudofirmus*, acetato de cálcio e extrato de levedura, separadamente, apresentaram menores valores de resistência à compressão em comparação com a amostra de pasta cimento controle. Outra pesquisa desenvolvida por Pei et al. (2013) obteve valores inferiores de resistência à compressão de argamassa produzidas com bactéria *Bacillus subtilis*, ureia e cloreto de Ca cominados, em comparação com a argamassa controle. A incorporação de compostos orgânicos e inorgânicos, como o extrato de levedura e o acetato de cálcio, respectivamente, ao concreto é um pré-requisito para a autocura, porém ambos podem resultar em perda indesejável da resistência (Ramachandran, Ramakrishnan and Bang, 2001; Jonkers and Schlangen, 2007).

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostram que a adição da bactéria *B. subtilis*, com ou sem adição de nutrientes (acetato de cálcio + extrato de levedura) isolados ou combinados à matriz cimentícia, propiciou a precipitação de carbonatado de cálcio (CaCO_3), promovendo fechamento pontual ou contínuo de fissuras e microfissuras. Amostras produzidas com a combinação dos três componentes (esporos + acetato de cálcio + extrato de levedura) incorporados apresentaram os melhores resultados em relação à cicatrização das fissuras.

Constatou-se que a abertura inicial da fissura da amostra tem influência neste processo. Foi observada, aos 28 dias de análise, a formação de cristais de forma pontual em fissuras de maior dimensão e contínua na região de microfissuras.

Para os três tipos de cura empregados (submersa, úmida com e sem aspersão de esporos), constatou-se a precipitação de carbonatos na região fissurada. A incorporação de esporos bacterianos (*B. subtilis*) e nutrientes (acetato de cálcio e extrato de levedura) em amostras submetidas à cura úmida, sem aspersão de esporos, apresentaram os melhores resultados em relação à cicatrização das fissuras.

A aplicação da bactéria com acetato de cálcio e extrato de levedura, até 1% em relação à massa de cimento, resultou em ganho de resistência à tração na flexão. Já a aplicação de esporos bacterianos isolados (B) ou em combinação com acetato de cálcio e extrato de levedura (B+A+E) em até 1% de cada em relação à massa de cimento, não resultou em perda significativa de resistência à compressão das amostras. Já a aplicação da bactéria com acetato de cálcio (B+A) e/ou extrato de levedura (B+E) resultou em perdas indesejadas de resistência à compressão.

A biorecuperação de materiais a base de cimento é um tema de pesquisa recente e desafiador, exigindo estudos interdisciplinares e complexos. A viabilidade desta solução tecnológica ainda requer estudos, pois ainda existem muitas variáveis (tipo e quantidade de bactéria, tipo e quantidade de nutrientes, tipo de cura, condições adequadas para a ativação dos esporos) que interferem na precipitação de CaCO_3 e que suas influências não são claras.

5. AGRADECIMIENTOS

Os autores agradecem à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) por disponibilizar a linhagem da bactéria *B. subtilis* (AP91) para o desenvolvimento desta pesquisa. Ao LADEMA, ao laboratório de Biodiversidade da Unila e à Fundação Araucária pelo suporte à pesquisa experimental. À Unila pela bolsa de mestrado e fomento à pesquisa pelo edital PRPPG Nº 137.

6. REFERÊNCIAS

- Alazhari, M. *et al.* (2018) ‘Application of expanded perlite encapsulated bacteria and growth media for self-healing concrete’, *Construction and Building Materials*, 160, pp. 610–619. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2017.11.086.
- Arunachalam, K. D. *et al.* (2010) ‘Studies on the characterisation of Biosealant properties of *Bacillus sphaericus*’, *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2(3), pp. 270–277.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (2005) ‘NBR 13279 Argamassa para assentamento e revestimento de paredes e tetos - Determinação da resistência à tração na flexão e à compressão’, *Associação Brasileira de Normas Técnicas*, pp. 1–9.
- De Belie, N. and De Muynck, W. (2009) ‘Crack repair in concrete using biodeposition’, *Concrete Repair, Rehabilitation and Retrofitting II - Proceedings of the 2nd International Conference on Concrete Repair, Rehabilitation and Retrofitting, ICCRRR*, 2, pp. 291–292. doi: 10.1201/9781439828403.ch107.
- Bhaskar, S. *et al.* (2017) ‘Effect of self-healing on strength and durability of zeolite-immobilized bacterial cementitious mortar composites’, *Cement and Concrete Composites*, 82, pp. 23–33. doi: 10.1016/j.cemconcomp.2017.05.013.
- Gulin, L. B. (2019) *Viabilidade do Uso de Sílica de Sílica Gel na Imobilização da Bactéria Bacillus subtilis para Materiais Cimentícios Autocicatrizantes*. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Hollmann, C. F. (2020) *Avaliação da influência de aditivos cristalizantes na resistência à penetração de íons cloreto em concretos fissurados*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Jang, I. *et al.* (2020) ‘Effects of spray-dried co-cultured bacteria on cement mortar’, *Construction and Building Materials*, 243, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2020.118206.
- Jonkers, H. M. *et al.* (2010) ‘Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete’, *Ecological Engineering*, 36(2), pp. 230–235. doi: 10.1016/j.ecoleng.2008.12.036.

- Jonkers, H. M. and Schlangen, E. (2007) 'Self-healing of cracked concrete: A bacterial approach', *Proceedings of the 6th International Conference on Fracture Mechanics of Concrete and Concrete Structures*, 3, pp. 1821–1826.
- Jonkers, H. M. and Thijssen, A. (2010) 'Bacteria Mediated of Concrete Structures', *2nd International Symposium on Service Life Design for Infrastructure 4-6 October 2010, Delft, The Netherlands*, (October), pp. 833–840.
- Khaliq, W. and Ehsan, M. B. (2016) 'Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques', *Construction and Building Materials*, 102, pp. 349–357. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2015.11.006.
- Kim, H. K. *et al.* (2013) 'Microbially mediated calcium carbonate precipitation on normal and lightweight concrete', *Construction and Building Materials*, 38, pp. 1073–1082. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2012.07.040.
- De Koster, S. A. L. *et al.* (2015) 'Geopolymer coating of bacteria-containing granules for use in self-healing concrete', *Procedia Engineering*, 102, pp. 475–484. doi: 10.1016/j.proeng.2015.01.193.
- Lucas, S. S. *et al.* (2018) 'Study of self-healing properties in concrete with bacteria encapsulated in expanded clay', *Science and Technology of Materials*, 30, pp. 93–98. doi: 10.1016/j.stmat.2018.11.006.
- Luo, M., Qian, C. X. and Li, R. Y. (2015) 'Factors affecting crack repairing capacity of bacteria-based self-healing concrete', *Construction and Building Materials*, 87, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2015.03.117.
- Marvasi, M. *et al.* (2010) 'Physiological requirements for carbonate precipitation during biofilm development of *Bacillus subtilis* mutant Massimiliano', *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Ecology*, 71, pp. 341–350. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00805.x.
- Marvasi, M., Davila-Vazquez, Y. C. and Martinez, L. C. (2013) 'Laboratory Activity to Effectively Teach Introductory Geomicrobiology Concepts to Non-Geology Majors', *Journal of Microbiology e Biology Education*, 14(2), pp. 206–212. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/jmbe.v14i2.578>.
- Monteiro, P. K. M. e P. J. M. (2014) *Concreto: Microestrutura, Propriedades e Materiais*. 2nd edn. São Paulo: IBRACON.
- Nain, N. *et al.* (2019) 'Enhancement in strength parameters of concrete by application of *Bacillus* bacteria', *Construction and Building Materials*, 202, pp. 904–908. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2019.01.059.
- Nguyen, T. H. *et al.* (2019) 'Bacterial self-healing of concrete and durability assessment', *Cement and Concrete Composites*, 104, pp. 1–15. doi: 10.1016/j.cemconcomp.2019.103340.
- Pacheco-Torgal, F. and Labrincha, J. A. (2013) 'Biotech cementitious materials: Some aspects of an innovative approach for concrete with enhanced durability', *Construction and Building Materials*, 40, pp. 1136–1141. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2012.09.080.

- Pei, R. *et al.* (2013) ‘Use of bacterial cell walls to improve the mechanical performance of concrete’, *Cement and Concrete Composites*, 39, pp. 122–130. doi: 10.1016/j.cemconcomp.2013.03.024.
- Ramachandran, S. K., Ramakrishnan, V. and Bang, S. S. (2001) ‘Remediation of concrete using micro-organisms’, *ACI Materials Journal*, 98(1), pp. 3–9. doi: 10.14359/10154.
- Repetto, W. L. (2011) ‘Concretos para fins especiais e de última geração’, in ISAIA, G. C. (ed.) *Concreto: Ciência e Tecnologia*. 1°. São Paulo: IBRACON, p. 1968.
- Schwantes-Cezario, N. *et al.* (2017) ‘Bioprecipitation of calcium carbonate induced by *Bacillus subtilis* isolated in Brazil’, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 123, pp. 200–205. doi: 10.1016/j.ibiod.2017.06.021.
- Schwantes-Cezario, N. *et al.* (2018) ‘Crack filling in concrete by addition of *Bacillus subtilis* spores – Preliminary study’, *DYNA (Colombia)*, 85(205), pp. 132–139. doi: 10.15446/dyna.v85n205.68591.
- Schwantes-Cezario, N., Nogueira, G. S. F. and Toralles, B. M. (2017) ‘Biocimentação de compósitos cimentícios mediante adição de esporos de *Bacillus subtilis* AP91’, *Revista de Engenharia Civil IMED*, 4(2), pp. 142–158. doi: <https://doi.org/10.18256/2358-6508.2017.v4i2.2072>.
- Van Tittelboom, K. *et al.* (2010) ‘Use of bacteria to repair cracks in concrete’, *Cement and Concrete Research*, 40(1), pp. 157–166. doi: 10.1016/j.cemconres.2009.08.025.
- Vashisht, R. and Shukla, A. (2020) ‘Potential application of bacteria to improve the self-healing and strength of concrete’, *Journal of Building Pathology and Rehabilitation*, 5(10), pp. 1–13. doi: 10.1007/s41024-020-0073-5.
- Vijay, K., Murmu, M. and Deo, S. V. (2017) ‘Bacteria based self healing concrete – A review’, *Construction and Building Materials*, 152, pp. 1008–1014. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2017.07.040.
- Wang, J. *et al.* (2012) ‘Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete’, *Construction and Building Materials*, 26(1), pp. 532–540. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2011.06.054.
- Wang, J. *et al.* (2018) ‘A chitosan based pH-responsive hydrogel for encapsulation of bacteria for self-sealing concrete’, *Cement and Concrete Composites*, 93, pp. 309–322. doi: 10.1016/j.cemconcomp.2018.08.007.
- Wiktor, V. and Jonkers, H. M. (2011) ‘Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete’, *Cement and Concrete Composites*, 33(7), pp. 763–770. doi: 10.1016/j.cemconcomp.2011.03.012.
- Xu, J. and Yao, W. (2014) ‘Multiscale mechanical quantification of self-healing concrete incorporating non-ureolytic bacteria-based healing agent’, *Cement and Concrete Research*, 64, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.cemconres.2014.06.003.