



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
TECNOLOGIA, INFRAESTRUTURA E
TERRITÓRIO (ILATIT)**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA CIVIL (PPG ECI)**

**SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CaCO_3 NA
RECUPERAÇÃO DE FISSURAS DOS MATERIAIS A BASE DE CIMENTO**

POLYANA GHELLERE

Foz do Iguaçu
2021



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
TECNOLOGIA, INFRAESTRUTURA E
TERRITÓRIO (ILATIT)**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA CIVIL (PPG ECI)**

**SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CaCO_3 NA
RECUPERAÇÃO DE FISSURAS DOS MATERIAIS A BASE DE CIMENTO**

POLYANA GHELLERE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Engenharia Civil.

Orientador: Profa. Dra. Edna Possan
Coorientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

Foz do Iguaçu
2021

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

G412s

Ghellere, Polyana.

Seleção e avaliação de bactérias produtoras de CaCO_3 na recuperação de fissuras dos materiais a base de cimento / Polyana Ghellere. - Foz do Iguaçu, 2021.

115 f.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território, Pós-Graduação em Engenharia Civil.

Orientador: Edna Possan.

Coorientador: Michel Rodrigo Zambrano Passarini.

1. Materiais cimentícios - fissuras - cicatrização. 2. Biodeposição de CaCO_3 . I. Possan, Edna, Orient. II. Passarini, Michel Rodrigo Zambrano, Coor. III. Título.

CDU: 691.32

Dedicado primeiramente a Deus, aos Professores Edna e Michel, que me orientaram, ajudaram e tornaram possível a realização desse ideal tão sonhado. Em especial, à minha família e ao meu esposo.

AGRADECIMENTO (S)

Aproveito a oportunidade de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A DEUS por me iluminar em todas as minhas escolhas e decisões quanto a pesquisa de mestrado, também por ter me dado saúde, força, fé e perseverança para enfrentar todas as dificuldades e seguir em frente.

A toda minha família, pais Marli e Jorge, irmãos Daiana e Henrique e sobrinhos Júlia, Eduard e Davi, que sempre me apoiaram e incentivaram, compreendendo minhas alterações de humor durante toda a realização da Dissertação.

Ao meu esposo Guilherme pelo apoio e compreensão durante os anos de pesquisa.

Aos meus amigos queridos pela compreensão por minha ausência durante os anos do mestrado.

Aos meus colegas de turma e estudos pela paciência e ajuda para com todas as dificuldades que me auxiliaram no decorrer do curso.

A engenheira civil técnica do laboratório de materiais da Unila Dalila Netto Sella que se disponibilizou a fazer os ensaios para a pesquisa durante a quarentena causada pela pandemia COVID19.

A todos os professores pela dedicação e incentivo que tiveram para passar seus conhecimentos, tanto teóricos como profissionais, com muita responsabilidade. Em especial a orientadora professora Dra. Edna Possan e ao coorientador professor Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

A cicatrização das fissuras presentes nos materiais cimentícios, por meio da bioprecipitação de carbonato de cálcio (CaCO_3), realizada por agentes biológicos (bactérias e fungos), vem se tornando uma alternativa biotecnológica para a recuperação de edificações. Neste contexto, a presente pesquisa objetivou selecionar bactérias e avaliar sua capacidade de reparação de fissuras em materiais cimentícios devido à biodeposição de CaCO_3 . A metodologia foi dividida em três partes. Na primeira foi realizada a seleção de bactérias potencialmente produtoras de carbonato de cálcio, por meio do isolamento de exemplares presentes em amostras coletadas de estruturas cimentícias reais e da visualização da precipitação de CaCO_3 em meio de cultivo contendo indicadores de pH, comparando-as com a bactéria *Bacillus subtilis* já empregada na literatura. Na segunda etapa, foi realizada a produção de amostras prismáticas (4x4x16 cm) e cilíndricas (5x10 cm) de argamassa, com a proporção de 1:3 (cimento:areia) e relação a/c de 0,48, com adição de 10^5 esporos bacterianos mL^{-1} e 1% em relação à massa de cimento de extrato de levedura e acetato de cálcio. Os esporos foram aplicados de três formas distintas: (i) água de mistura (AM), (ii) aspersão (ASP) e (iii) água de mistura e aspersão (AM-ASP), sobre as fissuras realistas. Na terceira etapa, foi realizada a avaliação do potencial de reparação de fissuras em matrizes a base de cimento pelos 5 diferentes agentes biológicos selecionados na etapa 1, durante 120 dias. Foram conduzidas análises de imagem do estereomicroscópio, análise da presença do carbonato de cálcio utilizando o ensaio de termogravimetria (TG), avaliação da composição mineralógica do precipitado utilizando o ensaio de difração de raio-X (DRX) e resistência à compressão em amostras cilíndricas não fissuradas. No processo de seleção, constou-se a existência de 5 diferentes bactérias produtoras de CaCO_3 quando em meio padrão e alcalino. Estas bactérias quando aplicadas na forma de esporos à matriz cimentícia apresentam um bom desempenho na biodeposição de carbonato de cálcio, para os três tipos de aplicação testados. As bactérias B1, B2 e B4 quando aplicadas na água de mistura e na água de mistura com aspersão foram as que mais se destacaram, sendo do gênero *Bacillus subtilis*, *B. subtilis* e *B. cereus*, respectivamente. Para o período avaliado, amostras com fissuras de pequenas aberturas (inferior a 0,43 mm) tiveram mais sucesso no processo de autocicatrização, sendo representadas pelas amostras ASP-B3, AM-B2, ASP-B2, AM-ASP-B1 e AM-B4, com valores de fissuras recuperadas de 0,43 mm, 0,29 mm, 0,25 mm, 0,24 mm e 0,20 mm, respectivamente. Quando avaliadas quanto ao potencial de recuperação de fissuras a amostra AM-ASP-B1 apresentou o melhor comportamento onde 100% das regiões das fissuras apresentaram precipitação de carbonato de cálcio. Acerca da resistência à compressão, aos 120 dias as amostras com bactérias B1 e B4 apresentaram os melhores resultados, 41,38 MPa e 41,51 MPa, respectivamente. Verificou-se que a utilização de bactérias do gênero *Bacillus* como agentes de autocicatrização biológica em matrizes cimentícias pode ser uma solução promissora para a minimização de manifestações patológicas decorrentes de fissuras.

Palavras-chave: Materiais cimentícios. *Bacillus*. Fissuras. Cicatrização. Biodeposição de CaCO_3 .

ABSTRACT

The healing of cracks presents in cementitious materials, through the bioprecipitation of calcium carbonate (CaCO_3), carried out by biological agents (bacteria and fungi), has become a biotechnological alternative for the recovery of buildings. In this context, the present research aimed to select bacteria and evaluate their ability to repair cracks in cementitious materials due to CaCO_3 biodeposition. The methodology was divided into three parts. In the first one, the selection of bacteria potentially producing calcium carbonate was carried out, through the isolation of specimens present in samples collected from real cementitious structures and the visualization of CaCO_3 precipitation in a culture medium containing pH indicators, comparing them with the *Bacillus subtilis* bacteria already used in the literature. In the second stage, prismatic (4x4x16 cm) and cylindrical (5x10 cm) samples of mortar were produced, with a ratio of 1:3 (cement:sand) and w/c ratio of 0.48, with the addition of 10^5 bacterial spores mL^{-1} and 1% in relation to the cement mass of yeast extract and calcium acetate. The spores were applied in three different ways: (i) mixing water (AM), (ii) spraying (ASP) and (iii) mixing and spraying water (AM-ASP), onto realistic cracks. In the third step, the assessment of the potential for repairing cracks in cement-based matrices by the 5 different biological agents selected in step 1 was carried out, during 120 days. Stereomicroscope image analysis, analysis of the presence of calcium carbonate using thermogravimetry (TG), evaluation of the mineralogical composition of the precipitate using X-ray diffraction (XRD) and compressive strength in non-cylindrical samples were conducted. In the selection process, the existence of 5 different bacteria producing CaCO_3 was found in standard and alkaline media. These bacteria, when applied in the form of spores to the cement matrix, present a good performance in the biodeposition of calcium carbonate, for the three types of application tested. *Bacillus* B1, B2 and B4, when applied in the mixing water and in the mixing water with spray, were the ones that stood out the most, being from the genus *Bacillus subtilis*, *B. subtilis* and *B. cereus*, respectively. For the period evaluated, samples with cracks with small openings (less than 0.43 mm) were more successful in the self-healing process, being represented by samples ASP-B3, AM-B2, ASP-B2, AM-ASP-B1 and AM -B4, with recovered crack values of 0.43 mm, 0.29 mm, 0.25 mm, 0.24 mm and 0.20 mm, respectively. When evaluated for the potential of crack recovery, sample AM-ASP-B1 showed the best behavior where 100% of the crack regions showed calcium carbonate precipitation. Regarding compressive strength, at 120 days the samples with bacteria B1 and B4 showed the best results, 41.38 MPa and 41.51 MPa, respectively. It was found that the use of *Bacillus* genus bacteria as biological self-healing agents in cementitious matrices can be a promising solution for minimizing pathological manifestations resulting from cracks.

Key words: Cement materials. *Bacillus*. Cracks. Healing. CaCO_3 biodeposition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismos de autocicatrização de fissuras: a) Autógeno (carbonatação) e b) Autônomo (conversão de sais de cálcio/hidrólise da ureia).....	26
Figura 2 – Esdósporo da bactéria <i>B. subtilis</i>	29
Figura 3 – Fluxograma da metodologia da pesquisa.....	46
Figura 4 – Pontos de coleta das amostras: a) amostra 1: Piezômetro PS-F-021; b) amostra 2: Dreno de concreto DM-F-702; c) amostra 3: Dreno de concreto DCC-F-081; d) amostra 4: Dreno de concreto DJC-F-009; e) amostra 5: Fissura no concreto	48
Figura 5 – Isolamento das Bactérias associadas a Barragem de Itaipu	50
Figura 6 – Meios de cultivo utilizados no ensaio de alteração do pH	52
Figura 7 – Cultivo das Bactérias e Produção de esporos.....	53
Figura 8 – Granulometria da areia natural.....	57
Figura 9 – Produção e cura das amostras de argamassa	59
Figura 10 – Ensaio de tração na flexão de 3 pontos	61
Figura 11 – Equipamentos usados na visualização das amostras	62
Figura 12 – Segmento da fissura analisado	62
Figura 13 – Instrumentos e amostras coletadas para a Análise Termogravimétrica (TGA)	64
Figura 14 – Equipamento de ensaio do módulo de elasticidade dinâmico pela Técnica de Excitação por Impulso.....	66
Figura 15 – Suporte de amostra com os dispositivos de captação de som e pulsação para afeição do MED pela Técnica de Excitação por Impulso	66
Figura 16 – Crescimento bacteriano e mudança de cor por alteração de pH	71
Figura 17 – Cristais precipitados visualizados no Estereomicroscópio	74
Figura 18 – Árvores filogenéticas baseada na sequência do gene 16S rRNA dos isolados potencialmente produtores de CaCO_3	78
Figura 19 – Detalhamento da precipitação de cristais das amostras AM-B2 e AM-B5	81
Figura 20 – Detalhamento da precipitação de cristais da amostra ASP-B3	83
Figura 21 – Processo esquemático de recuperação de fissura por biodeposição de carbonato e cálcio em matrizes cimentícias	86
Figura 22 – Porcentagem de precipitação ao longo do tempo	87
Figura 23 – Curva termogravimétrica e Derivada da perda de massa para amostras com bactérias adicionadas à a) água de mistura (AM) b) Água de aspersão (ASP) c) Água de mistura e de aspersão (AM-ASP).....	89
Figura 24 – Difratoograma do material precipitado na superfície das fissuras das amostras.....	92
Figura 25 – Resistência à compressão axial em amostras não fissuradas	94
Figura 26 – Módulo de elasticidade dinâmico em amostras fissuradas com bactérias adicionadas a) à água de mistura b) por aspersão e c) água de mistura e aspersão	96
Figura 27 – Módulo de elasticidade dinâmico em amostras fissuradas em função do método de adição de diferentes bactérias após 120 dias de hidratação.....	97

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Programa experimental da aplicação das bactérias em argamassa	58
Quadro 2 – Procedimento de análise da cicatrização	63
Quadro 3 – Quantidade de bactérias isoladas da barragem de Itaipu	68
Quadro 4 – Bactérias que apresentaram crescimento após reativação	69
Quadro 5 – Técnica de coloração de verde malaquita	69
Quadro 6 – Crescimento bacteriano e mudança de cor por alteração de pH.....	72
Quadro 7 – Concentração de esporos mL ⁻¹	76
Quadro 8 – Diluição da concentração de esporos mL ⁻¹	77
Quadro 9 – Análise da cicatrização das amostras com bactérias na água de mistura (AM)	80
Quadro 10 – Análise da cicatrização das amostras com bactérias na água de aspersão (ASP)	82
Quadro 11 – Análise da cicatrização das amostras com bactérias na água de mistura e na água de aspersão (AM-ASP).....	84
Quadro 12 – Perda de massa das amostras de argamassa com bactérias	90
Quadro 13 – Melhores resultados obtidos nos diferentes ensaios de análises	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diversidade de bactérias biomineralizadoras de materiais a base de cimento.....	27
Tabela 2 – Concentração de esporos bacterianos empregada no processo de autocicatrização de matrizes a base de cimento.....	30
Tabela 3 – Fontes nutricionais utilizadas pelas bactérias biomineralizadoras	31
Tabela 4 – Materiais utilizados no encapsulamento dos esporos bacterianos	37
Tabela 5 – Materiais cimentícios usados no reparo de fissuras	39
Tabela 6 – Métodos de incorporação das bactérias aos materiais cimentícios	40
Tabela 7 – Ensaios para verificação do potencial de atuação das bactérias nos materiais cimentícios.....	41
Tabela 8 – Nomenclatura das bactérias utilizadas no estudo.....	48
Tabela 9 – Nomenclatura das bactérias aplicadas às matrizes cimentícias	56
Tabela 10 – Nomenclatura das amostras de argamassas.....	56
Tabela 11 – Dosagem para a produção de três corpos de prova prismáticos 4 x 4 x 16 cm	57
Tabela 12 – Dosagem para a produção de seis corpos de prova cilíndricos 5 x 10 cm	57

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1	OBJETIVOS	15
1.2	QUESTÃO E HIPÓTESES DA PESQUISA.....	16
1.3	DELIMITAÇÃO DA PESQUISA.....	16
1.4	ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	17
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	FORMAÇÃO DE FISSURAS EM MATERIAS A BASE DE CIMENTO	18
2.2	MICROORGANISMOS EM MATERIAIS A BASE DE CIMENTO	21
2.3	BIOMINERALIZAÇÃO EM MATERIAIS A BASE DE CIMENTO	23
2.3.1	Metabolismo Bacteriano Responsável pela Biomineralização	24
2.3.2	Condições Necessárias para a Biomineralização	26
2.3.2.1	<i>Linhagens bacterianas</i>	27
2.3.2.2	<i>Quantidade de bactérias</i>	29
2.3.2.3	<i>Meio de cultura e nutrientes</i>	31
2.3.2.4	<i>pH e umidade</i>	35
2.3.3	Encapsulamento dos Esporos Bacterianos.....	36
2.3.4	Tipos de Materiais Cimentícios Bacteriológicos	39
2.3.5	Mecanismos de Incorporação das Bactérias	40
2.3.6	Ensaio para Verificação do Potencial de Atuação das Bactérias	41
3.	METODOLOGIA.....	46
3.1	SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS PRECIPITADORAS DE CARBONATO DE CÁLCIO	47
3.1.1	Coleta das Amostras da Barragem de Itaipu.....	48
3.1.2	Isolamento das Bactérias Associadas a Barragem de Itaipu	49
3.1.2.1	<i>Preservação em ultracongelamento das bactérias</i>	50
3.1.2.2	<i>Reativação das bactérias preservadas em ultracongelamento</i>	50
3.1.3	Crescimento Bacteriano e Análise da Alteração do pH.....	51
3.1.4	Análise dos Cristais Precipitados	52
3.1.5	Cultivo das Bactérias e Indução da Formação de Esporos Bacterianos.....	52
3.1.6	Quantificação dos Esporos Bacterianos	54
3.1.7	Caracterização Molecular das Bactérias.....	54
3.2	APLICAÇÃO DAS BACTÉRIAS PRECIPITADORAS DE CaCO_3 NA ARGAMASSA.....	55
3.2.1	Produção da Argamassa.....	55
3.2.2	Procedimento de Fissuração	60

3.3	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DAS BACTÉRIAS NA BIOREPARAÇÃO DAS FISSURAS	61
3.3.1	Análise da Cicatrização.....	61
3.3.2	Análise da Presença do CaCO ₃	64
3.3.3	Análise da Composição do CaCO ₃	64
3.3.4	Análise Mecânica.....	65
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1	ISOLAMENTO E CRESCIMENTO BACTERIANO.....	67
4.1.1	Isolamento das Bactérias Retiradas da Barragem de Itaipu	67
4.1.2	Crescimento das Bactérias Preservadas em Ultracongelamento	68
4.2	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRECIPITAÇÃO DE CRISTAIS	70
4.2.1	Análise do Potencial de Precipitação de Cristais	70
4.2.2	Análise dos Cristais Precipitados.....	73
4.2.3	Quantificação dos Esporos Bacterianos	76
4.2.4	Caracterização Molecular das Bactérias.....	77
4.3	ANÁLISE DO POTENCIAL DE BIOREPARAÇÃO DAS FISSURAS	79
4.3.1	Análise Visual.....	79
4.3.2	Análise Quantitativa	86
4.3.3	Análise da Presença do CaCO ₃	88
4.3.4	Análise da Composição do CaCO ₃	91
4.3.5	Influência nas Propriedades Mecânicas.....	93
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
5.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	101
	REFERÊNCIAS.....	102

1. INTRODUÇÃO

Concretos e argamassas são os materiais de construção mais consumidos globalmente pelo setor da construção, devido à crescente demanda por edificações e infraestrutura e à predominância da utilização de sistemas construtivos à base de cimento (BRASILEIRO; MATOS, 2015). O baixo custo de produção, tendo em vista à ampla disponibilidade de recursos naturais como areia, brita, rocha calcária e argilas (para produção do cimento) são imperativos para a ampla utilização do concreto. Além disso, o concreto no estado fresco se adapta (molda) a diferentes formas, constituindo-se em um material de construção bastante versátil (KHALIQ; EHSAN, 2016).

No entanto, o surgimento de fissuras geradas por diferentes mecanismos de degradação (falha no projeto estrutural ou na execução da obra, excesso de cargas não previstas durante o projeto estrutural, retração, entre outros), constitui-se um dos principais problemas das construções com materiais a base de cimento (SILVA; PASSARINI; SANTOS, 2017). A fissuração no concreto torna-se um caminho preferencial para o acesso de agentes agressivos, como água, gases atmosféricos, cloretos e sulfatos, para o interior de uma estrutura ou edificação, o que não é desejável do ponto de vista de durabilidade, tendo em vista a redução da vida útil e/ou o aumento dos custos associados à manutenção e recuperação dos sistemas construtivos (DE BELIE; DE MUYNCK, 2009; XU; WANG, 2018). A busca e o desenvolvimento de ações, medidas ou produtos que mitiguem o surgimento das fissuras e/ou que reparem as fissuras já existentes é fortemente desejável e necessário, sendo o escopo desta pesquisa.

Neste sentido, o processo de autocicatrização¹ de fissuras tem se tornado assunto de interesse da comunidade técnico-científica, o qual pode ser promovido por meio de adições minerais (HUNG; SU; SU, 2018; PACHECO, 2020; SAHMARAN; YILDIRIM; ERDEM, 2013), poliméricas (LEE; WONG; BUENFELD, 2016; PACHECO, 2020; SNOECK et al., 2016) ou biológicas (ANNEZA et al., 2016; PACHECO, 2020; SCHWANTES-CEZARIO et al., 2018) à matriz cimentícia.

¹ A autocicatrização define-se como a habilidade dos materiais a base de cimento de repararem fissuras de forma autônoma, ou seja, sem intervenções externas e muitas vezes recuperando as características mecânicas originais (GHOSH, 2009).

Neste último caso, tem-se que a biodeposição² microbiana de carbonato de cálcio (CaCO_3) em materiais à base de cimento proporciona a cicatrização das fissuras (JONKERS et al., 2010; VAN TITTELBOOM et al., 2010; WANG et al., 2014a; WIKTOR; JONKERS, 2011) o que vem contribuindo para as questões de durabilidade e manutenibilidade das construções. Tal processo proporciona um material com menor quantidade de poros, o que pode favorecer a redução da penetração de água com poluentes e gases tóxicos presentes no ar evitando dessa forma o aparecimento de manifestações patológicas (VERMA et al., 2015; VIEIRA, 2017). Esse processo se dá pela ação de agentes biológicos como bactérias e fungos, que através de suas atividades metabólicas, podem produzir CaCO_3 induzindo o fechamento de fissuras presentes nos materiais a base de cimento, devido ao preenchimento das mesmas pelo CaCO_3 precipitado (MUHAMMAD et al., 2016).

Para que ocorra a precipitação de carbonato de cálcio na recuperação de fissuras nos materiais cimentícios é importante o uso de linhagens bacterianas locais, onde as mesmas já estão bem adaptadas às condições do meio ambiente onde vivem (DHAMI; REDDY; MUKHERJEE, 2012). Além disso, as bactérias devem apresentar características importantes, como serem resistentes a pH alcalino (comum em materiais cimentícios), tolerantes a presença de oxigênio, resistentes a altas concentrações de íons cálcio e produzir quantidades de carbonato de cálcio com potencial para selar pequenas fissuras, capazes de suportar condições de alta pressão por estarem embutidas na matriz cimentícia, permanecerem viável por longos períodos de tempo, e por fim, não devem ser patogênicas (GUPTA; RATHI; KAPUR, 2013). Também é importante levar em consideração a incorporação combinada de bactérias e nutrientes nos diferentes materiais cimentícios, como pasta, argamassa e concreto, para a reparação de fissuras como um método inovador para melhorar a durabilidade do concreto (SIDIQ; GRAVINA; GIUSTOZZI, 2019).

A reparação de fissuras, por meio da biodeposição de CaCO_3 por bactérias, vem se tornando uma ferramenta biotecnológica de manutenção e restauração de estruturas à base de materiais cimentícios. Esta alternativa pode ser considerada promissora principalmente em locais não visíveis e/ou de difícil acesso

² A biodeposição define-se como uma técnica que se caracteriza pela precipitação de carbonato de cálcio de origem biológica sobre a superfície de materiais utilizados em construções, tijolos e concretos (DHAMI; SUDHAKARA REDDY; MUKHERJEE, 2014).

como estruturas de concreto subterrâneas, e ainda estruturas que para serem reparadas podem necessitar da interrupção temporária de serviço, como pontes, túneis e barragens (VAN TITTELBOOM; DE BELIE, 2013).

Pesquisadores da Universidade Técnica de Delft, na Holanda, desenvolveram um material chamado de Bioconcreto. Este material refere-se a um concreto produzido com adição de linhagens bacterianas das espécies *Bacillus pseudofirmus* e *Bacillus cohnii*, capazes de proporcionar a autoregeneração do concreto e, conseqüentemente, reparo das microfissuras surgidas no concreto ao longo do tempo (JONKERS et al., 2010). Por outro lado, o processo de autocicatrização da argamassa de cimento, ou seja, a cicatrização de fissuras na argamassa pela bactéria *Bacillus sphaericus* encontra-se em conclusões dos estudos, os quais vêm sendo desenvolvidos pelo Departamento de Construção da Universidade Nacional de Cingapura que adicionaram à argamassa, *B. sphaericus* imobilizados em biocarvão (GUPTA; KUA; PANG, 2018).

Durante aproximadamente duas décadas, diversos estudos em todo o mundo foram e ainda estão sendo desenvolvidos sobre o uso de bactérias que realizam a biodeposição de carbonato de cálcio e dessa forma, promovem a cicatrização das fissuras nos materiais cimentícios. Entretanto, no Brasil o tema de pesquisa relacionado à adição de bactérias ao concreto é bastante recente, tendo sido encontrados poucos trabalhos científicos desenvolvidos até o momento (PACHECO, 2020; SCHWANTES-CEZARIO et al., 2018, 2019; SCHWANTES-CEZARIO; NOGUEIRA; TORALLES, 2017). Nos estudos globais já realizados, os autores utilizam diferentes bactérias do gênero *Bacillus* (como as espécies *Bacillus pasteurii*, *B. sphaericus* e *Bacillus subtilis*) e métodos de incorporação (direto na água da mistura, imersão na água de cura e pulverizada superficialmente na fissura) dessas aos materiais cimentícios, não existindo consenso na literatura sobre qual bactéria e mecanismo seria mais adequado na reparação de fissuras em matérias cimentícios. Além disso, a maior parte dos estudos apontam o potencial de recuperação de fissuras com largura menor que 1 mm (ALAZHARI et al., 2018; JONKERS et al., 2010; VAN TITTELBOOM et al., 2010; WANG et al., 2014a; WIKTOR; JONKERS, 2011).

Diante do exposto, verifica-se a importância de contribuir para o avanço do conhecimento científico em relação ao tema, por meio da identificação de bactérias presentes em materiais (concreto e argamassa)/estruturas a base de cimento e disponíveis na região do estudo, potencialmente capazes de precipitar

carbonato de cálcio para produção de materiais à base de cimento autocicatrizantes.

A utilização de bactérias como agentes de biodeposição de carbonato de cálcio pode ser uma alternativa promissora para a recuperação de fissuras em materiais/estruturas a base de cimento. Assim, tendo em vista que os agentes biológicos presentes na microbiota da região do estudo podem ser mais promissores, neste estudo, linhagens bacterianas foram isoladas de amostras de materiais/estruturas a base de cimento presentes na cidade de Foz do Iguaçu, PR, sendo posteriormente comparadas com uma linhagem da bactéria controle *B. subtilis* (AP91) quanto à produção de CaCO_3 e capacidade de recuperar fissuras em materiais cimentícios quando aplicadas de diferentes formas. Para tal, foram utilizados métodos de alteração de pH, ensaios de análise das fissuras e da composição do material precipitado na superfície das fissuras, além do ensaio da resistência à compressão.

1.1 OBJETIVOS

Selecionar bactérias e avaliar sua capacidade de reparação de fissuras em materiais cimentícios devido à biodeposição de carbonato de cálcio (CaCO_3).

Com base no objetivo geral, tem-se os seguintes objetivos específicos.

- a) Coletar e Selecionar bactérias de estruturas da região da pesquisa com potencialidade para precipitar carbonato de cálcio;
- b) Avaliar o potencial de recuperação de fissuras em material cimentício quando aplicados esporos das bactérias selecionadas, quanto a cicatrização, a resistência mecânica e o módulo de elasticidade dinâmico;
- c) Identificar a presença e a composição do carbonato de cálcio precipitado pelas bactérias na superfície das fissuras por meio de análise termogravimétrica e difração de raio X.

1.2 QUESTÃO E HIPÓTESES DA PESQUISA

A questão central de pesquisa deste trabalho busca responder se “Na região de estudo (Foz do Iguaçu, PR) existem bactérias produtoras de CaCO_3 que podem ser empregadas como agente de autocicatrização em materiais a base de cimento Portland, para recuperar fissuras de até 0,5 mm?”

A partir da questão de pesquisa são propostas as seguintes hipóteses:

- H1. Na região do estudo existem bactérias capazes de produzir carbonato de cálcio em seus processos metabólicos, compatíveis com matrizes a base de cimento Portland.
- H2. Bactérias capazes de produzir carbonato de cálcio em seus processos metabólicos conseguem atuar na recuperação de pequenas fissuras (máximo de 1 mm) em materiais a base de cimento por meio de biodeposição de CaCO_3 .

1.3 DELIMITAÇÃO DA PESQUISA

Para analisar o desempenho quanto à biorecuperação de fissuras e resistência mecânica em materiais a base de cimento, o presente estudo se limita a análises em corpos de prova prismáticos 4 x 4 x 16 cm armados e cilíndricos 5 x 10 cm não armados de argamassa, respectivamente, utilizando o traço 1:3 (cimento:areia) em massa com relação a/c igual a 0,48. Nos corpos de prova prismáticos foram realizadas fissuras não padronizadas na região central da amostra. Os esporos bacterianos, produzidos por bactérias isoladas de materiais/estruturas a base de cimento disponíveis na região de estudo, selecionados quanto a capacidade de precipitação de carbonato de cálcio, juntamente com o meio de extrato de levedura (fonte de nutriente) e acetato de cálcio (fonte de cálcio) foram empregados aos CPs de argamassa de três forma distintas, na água da mistura, na água para aspersão superficial das fissuras e na água da mistura mais água para aspersão superficial das fissuras. O período de análise foi de 120 dias, em matrizes a base de cimento em processo de hidratação.

1.4 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação está estruturada em 5 capítulos; No capítulo 1 – *Introdução*, apresenta-se a problemática da autocicatrização em materiais a base de cimento por meio do emprego de bactérias, a justificativa, objetivo, pergunta e hipótese do estudo. No capítulo 2 tem-se o *Referencial Teórico*, onde são apresentados temas relevantes em relação ao tema de estudo.

No capítulo 3 apresenta-se a *Metodologia, com descrição detalhada* dos procedimentos desenvolvidos para a realização do trabalho. Os *Resultados e Discussões* com a devida comparação com os resultados da literatura são apresentados no capítulo 4.

No capítulo 5 encontram-se as *Considerações Finais* obtidas a partir do levantamento dos resultados e as sugestões de *Pesquisas Futuras*, seguido das – *Referências* citadas no trabalho.

No Apêndice A tem-se os resultados da revisão sistemática da literatura e no Anexo A a primeira publicação do grupo de pesquisa LADEMA da Unila relacionada ao tema da dissertação, referente ao estudo piloto desenvolvido.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Neste tópico apresenta-se descrito algumas informações importantes em relação aos materiais cimentícios e as bactérias. Também se aborda a biomineralização de materiais a base de cimento, relatando as principais pesquisas desenvolvidas sobre o tema, os tipos e o metabolismo das bactérias biomineralizadoras, bem como os fatores que influenciam a biodeposição de carbonato de cálcio na recuperação de fissuras. Os materiais utilizados no encapsulamento e os mecanismos de incorporação das bactérias no material cimentício também são relatados.

2.1 FORMAÇÃO DE FISSURAS EM MATERIAS A BASE DE CIMENTO

A fissuração em materiais a base de cimento é inerente ao material, sofrendo a influência do ambiente de exposição, sobretudo de movimentações térmicas, e das condições de serviço e utilização da edificação ou estrutura ao longo do tempo. Dessa forma a origem das fissuras pode apresentar diversas causas, como fissuras de origem térmica, fissuras de retração e fissuras de origem estrutural (SILVA; PASSARINI; SANTOS, 2017). Também podem ser decorrentes de reações expansivas como a reação por sulfato, reação álcali-agregado (RAA) e formação de etringita tardia (DEF, em língua inglesa - Delayed Ettingite formation). A corrosão das armaduras também pode gerar fissuras (CAETANO, 2017).

Uma das manifestações patológicas que incidem sobre as estruturas de concreto são as fissuras de origem térmica. Tal fato está relacionado com o calor de hidratação ocasionado quando o cimento é hidratado, ou seja, quando os compostos do cimento reagem com a água para adquirir estabilidade e assim provocando a liberação de energia na forma de calor. As reações de hidratação dos compostos do cimento são exotérmicas. Dessa forma, estruturas que apresentam um grande volume de concreto liberam maior quantidade de calor, que pode ser dissipada para atmosfera ou absorvida pela matriz cimentícia (GAMBALE, 2017).

A variação térmica do ambiente pode ser responsável pela geração de fissuras nas estruturas de concreto e argamassas, devido à retração térmica. Esse processo ocorre quando a superfície do material ao se resfriar perde mais calor do

que seu interior, dessa forma provoca um aumento na temperatura do interior do material. Essa diferença de temperatura entre a superfície e o interior do material gera tensões maiores que a sua capacidade de deformação e assim causam o surgimento de fissuras (RECENA, 2014).

As estruturas de concreto apresentam baixa resistência à tração o que provoca o surgimento de fissuras quando as tensões solicitantes de tração são maiores do que a capacidade de resistência à tração do material. Isso pode acontecer quando ocorre erro de projeto ou execução, mudança de uso ou que algum esforço imprevisível passe a exercer influência sobre a estrutura. Dessa forma a fissura surge como forma de aliviar essas tensões e avisar que a estrutura pode entrar em colapso (NEELADHARAN et al., 2018).

As reações expansivas como a reação por ataque de sulfatos, a reação álcali-agregado (RAA) e a formação de etringita tardia (DEF) provocam o surgimento de fissuras no concreto. Na primeira reação, os sulfatos (presentes na água do mar e solos contaminados com esgoto doméstico e industrial) penetram nos poros do concreto e entram em contato com o hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) formando o sulfato de cálcio que reage com as aluminas presente na matriz do concreto resultando na formação de um composto expansivo chamado de etringita tardia que por apresentar volume maior que o volume dos poros gera fissuras (ÇULLU; ARSLAN, 2014). Na segunda reação, a sílica (presente no agregado) e os íons álcalis (Na^+ e K^+ - presentes no cimento) reagem e formam um gel expansivo que absorve água e se expande entre os poros do concreto, gerando uma tensão interna que causa fissura (LINDGÅRD et al., 2012). Já a formação de etringita tardia refere-se ao desenvolvimento de etringita após o endurecimento do concreto, podendo ser influenciada por diversos fatores divididos em dois grupos: os relacionados a formulação do concreto - natureza do cimento, natureza e tamanho dos agregados e quantidade de água utilizada na mistura; e os relacionados ao meio ambiente - condições de cura em elevadas temperaturas, acima de 65°C , e em altas umidades, acima de 90% (PICHELIN et al., 2020).

A corrosão das armaduras também pode gerar fissuras, podendo ocorrer por despassivação da armadura em função da diminuição do pH do concreto, causada pela reação de carbonatação entre o hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) e o gás carbônico ou pela presença de cloretos, que provoca a formação de óxido de ferro na superfície da armadura em contato com o concreto. Dessa forma o óxido de ferro por

possuir um volume maior que o íon Fe provocada um aumento de tensão que gera fissura (FIGUEIREDO; MEIRA, 2013).

As fissuras podem ser nomeadas de diferentes formas em relação ao tamanho de sua abertura. De acordo com a norma ABNT NBR 15575 (2013), referente ao desempenho de Edifícios Habitacionais – Parte 2, as fissuras possuem aberturas inferiores a 0,6 mm, enquanto as trincas possuem abertura superior ou igual a 0,6 mm. Já a norma ABNT NBR 9575 (2010) que trata de projeto de impermeabilização, considera como microfissuras as aberturas inferiores a 0,05 mm, como fissuras as aberturas até 0,5 mm, como trincas as aberturas entre 0,5 e 1 mm, como rachaduras as aberturas entre 1 e 1,5 mm e como fendas as aberturas superior a 1,5 mm.

As fissuras presentes nas estruturas de concreto armado podem causar problemas na sua durabilidade devido ao aumento da permeabilidade da água e substâncias nocivas na matriz cimentícia como água, gases atmosféricos, carbonatos, cloretos e sulfatos. Isso leva a degradação do material cimentício e a corrosão das armaduras do concreto, podendo levar a uma diminuição da resistência das estruturas de concreto e ocasionando problemas estruturais que podem levar ao seu colapso (DE KOSTER et al., 2015; DHAMI; REDDY; MUKHERJEE, 2012; NGUYEN et al., 2019).

Nas estruturas de concreto não armadas a presença de fissuras também pode causar problemas na sua durabilidade, pois ao permitirem a entrada de água provocam a degradação do material cimentício através da sua desagregação, e isso causa inconvenientes e transtornos estéticos, transmitindo aos usuários a sensação de insegurança, além de prejudicar a sua saúde por meio do surgimento de microrganismos causadores de mofo e bolor (PACHECO-TORGAL; LABRINCHA, 2013).

Sendo assim, o processo de biomineralização e recuperação das fissuras nos materiais cimentícios, através da bideposição de carbonato de cálcio realizado por bactérias, tem influência positiva na durabilidade dos materiais cimentícios reduzindo a absorção, permeabilidade e difusão de fluidos e gases para dentro da matriz cimentícia (PACHECO-TORGAL; LABRINCHA, 2013; VAN TITTELBOOM; DE BELIE, 2013). Os principais pontos relacionados a este tema são apresentados na sequência.

2.2 MICRORGANISMOS EM MATERIAIS A BASE DE CIMENTO

A microbiologia é a ciência que estuda os microrganismos, ou seja, os organismos considerados muito pequenos para serem observados a olho nu, entre eles estão as bactérias que medem cerca de 0,2 a 750 μm de diâmetro. Essa ciência utiliza-se do estudo das células microbianas para analisar e compreender como ocorrem os processos fundamentais a vida e assim auxiliar em importantes avanços na medicina humana e veterinária, na agricultura e na indústria (MADIGAN et al., 2016), abrangendo inclusive a indústria da construção civil (BANG; RAMAKRISHNAN, 2001; CHUNXIANG et al., 2009; SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019; TZIVILOGLOU et al., 2016; WANG et al., 2012).

Os materiais cimentícios, como concreto e argamassa, são bastante utilizados na construção civil, tendo em vista sua maior durabilidade em comparação com outros materiais construtivos. Tais materiais podem ser aplicados em edifícios, pontes, viadutos, túneis, estradas, barragens, fundações, tubulações de água e esgoto, entre outras edificações (CWALINA, 2008).

As edificações, em geral, estão suscetíveis ao desgaste das suas estruturas ao longo do tempo devido à ação química quando expostas à chuva, água do mar, gases atmosféricos, sulfatos e ácidos; pela a ação mecânica quando sofrem a ação de alguma carga não prevista; pela a ação física quando sofrem exposição a ciclos de gelo-degelo e pela ação biológica, representada por microrganismos como fungos e bactérias (BRANDÃO, 1998; GÓIS, 2016). Alguns microrganismos realizam o processo de deterioração ao colonizarem a superfície do material cimentício, seus poros e microfissuras, podendo causar danos às edificações resultando em problemas estéticos, funcionais ou estruturais (CWALINA, 2008). Contudo, em relação à ação biológica, é importante ressaltar que também existem microrganismos que realizam o processo de biomineralização de estruturas em materiais cimentícios, que é de interesse no que se refere à recuperação de fissuras em estruturas de concreto e edificações em geral.

A biodeterioração é um processo que está relacionado com a alteração nas propriedades dos materiais cimentícios que formam as edificações, tal processo é realizado por líquens, fungos e bactérias (SANCHEZ-SILVA; ROSOWSKY, 2008). A ocorrência deste processo depende de fatores que influenciam a sobrevivência e o desenvolvimento de tais organismos como, fatores externos, que

estão representados pela umidade, pH, temperatura e nutrientes e os fatores internos, como composição química e as características do material incluindo porosidade e absorção de água e gases (WARSCHEID; BRAAMS, 2000).

A ação das bactérias na biodeterioração é bastante comum em sistemas de saneamento, onde as mesmas produzem ácidos que provocam a dissolução dos compostos hidratados do cimento como o hidróxido de cálcio e os silicatos de cálcio hidratados, destruindo os agregados e a pasta de cimento que formam os materiais cimentícios, o que não é desejável. Além disso, interferem na sua estética, reduzindo a sua durabilidade e comprometendo a sua integridade (WEI et al., 2010).

Desde o século XIX, estudos vêm sendo realizados na área de biodeterioração do concreto (GÓIS, 2016). O primeiro trabalho foi realizado por Parker (1945), que isolou linhagens de bactérias produtoras de ácido de amostras coletadas de concreto presente no sistema de esgoto. Recentemente, muitas tentativas estão sendo feitas para proteger o concreto contra a biodeterioração, impedindo o crescimento e o metabolismo microbiano através da modificação do ambiente local e da modificação da estrutura de concreto (DRUGĂ et al., 2018; LORS et al., 2017; NOEIAGHAEI et al., 2017).

Por outro lado, a biomineralização é um processo relacionado com a produção de minerais por meio da retirada de elementos do meio, tal processo é realizado por organismos vivos. Sendo assim, o processo de biomineralização pode estar relacionado com a recuperação e reparação de fissuras, presentes nos materiais cimentícios que formam as edificações, por meio de células microbianas, que ao serem inseridas na matriz cimentícia são capazes de produzir carbonato de cálcio ou seus polimorfos estruturais cristalinos como calcita, aragonita e vaterita (ACHAL et al., 2015).

A produção do carbonato de cálcio na reparação das fissuras dos materiais cimentícios depende das condições da matriz cimentícia como a presença de cálcio, a presença de carbono inorgânico dissolvido, o pH alcalino e a umidade, bem como dos tipos de microrganismos resistentes ao mecanismo de mistura dos materiais cimentícios, ao pH alcalino por longos períodos e a presença de oxigênio (JONKERS et al., 2010).

Dentre os microrganismos responsáveis pela biomineralização, as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, são as mais utilizadas para a precipitação

de carbonato de cálcio na reparação de fissuras, pois são capazes de formar estruturas altamente resistentes aos ambientes alcalinos, denominadas esporos ou endósporos, que permitem sua sobrevivência (VAN TITTELBOOM et al., 2010). Tal processo é realizado por bactérias devido à presença de enzimas envolvidas em diversas vias metabólicas, entre elas a oxidação aeróbica de compostos ricos em cálcio, como acetato de cálcio, nitrato de cálcio, entre outros, para a produção de carbonato de cálcio e gás carbônico (VIJAY; MURMU; DEO, 2017).

Na década de 1990, surgiram os primeiros estudos referentes ao uso de bactérias produtoras de carbonato de cálcio para a reparação de fissuras presentes nas rochas calcárias (GOLLAPUDI et al., 1995). A partir de então, diversas pesquisas foram realizadas utilizando diferentes bactérias para a reparação de fissuras em materiais cimentícios, destacando o emprego das linhagens bacterianas de *B. pasteurii* (ACHAL et al., 2009; BANG; RAMAKRISHNAN, 2001; KIM et al., 2013), *B. sphaericus* (DE MUYNCK et al., 2008a; GUPTA; KUA; PANG, 2018; VAN TITTELBOOM et al., 2010) e *B. subtilis* (KHALIQ; EHSAN, 2016; PEI et al., 2013; SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019).

2.3 BIOMINERALIZAÇÃO EM MATERIAIS A BASE DE CIMENTO

Há mais de duas décadas, estudos estão sendo desenvolvidos em relação à utilização das bactérias como agentes biomineralizadores (KHALIQ; EHSAN, 2016). O uso de bactérias na realização do processo de biomineralização das fissuras presentes nos materiais cimentícios, está se tornando cada vez mais popular no meio científico, por ser compatível com a matriz cimentícia e favorável ao meio ambiente (WANG et al., 2012), como refletem os estudos demonstrados na Tabela I (APÊNDICE A). Os resultados dos estudos laboratoriais retratam que o processo de biomineralização ou biocimentação, é capaz de melhorar a resistência à compressão de materiais à base de cimento e reduzir sua porosidade e, ao diminuir a difusão de umidade e outras substâncias prejudiciais, melhora a durabilidade dos materiais cimentícios (ACHAL et al., 2015).

2.3.1 Metabolismo Bacteriano Responsável pela Biomineralização

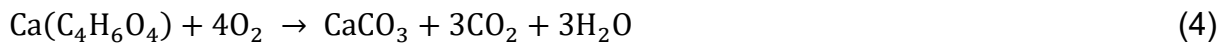
No ambiente, as bactérias vivem em conjunto formando comunidades microbiológicas, onde cada bactéria apresenta algum tipo de metabolismo microbiano responsável pela remoção de nutrientes presentes no meio ambiente, transformando-os em novas substâncias necessárias para seu crescimento (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Quanto ao mecanismo utilizado para realizar o metabolismo, as bactérias podem ser denominadas de autotróficas e heterotróficas, ou seja, as bactérias obtêm o carbono por meio do dióxido de carbono através do processo de fotossíntese ou de compostos químicos disponíveis no ambiente onde vivem, respectivamente (MADIGAN et al., 2016).

O processo de biomineralização através da precipitação de carbonato de cálcio por bactérias (biodeposição), envolve vários microrganismos, vias metabólicas e ambientes diferenciados (DE MUYNCK et al., 2008a). De modo geral, existem três principais mecanismos relacionados à precipitação do carbonato de cálcio. O primeiro é a redução dissimilatória do sulfato realizada pelas bactérias redutoras de sulfato sob condições anóxicas (condições de ausência de oxigênio e presença de sulfato). O segundo é a conversão metabólica aeróbia de sais de cálcio. O terceiro está relacionado à hidrólise enzimática da ureia pelas bactérias ureolíticas (DE MUYNCK et al., 2008b). Dentre os três mecanismos para precipitar o carbonato de cálcio, a decomposição da ureia pelas bactérias ureolíticas é o mais utilizado entre as pesquisas já desenvolvidas, por ser mais fácil de operar e controlar (WANG et al., 2012).

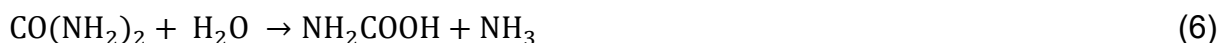
No processo de dissimilação ou redução do sulfato, as bactérias induzem a dissolução do gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em íon de cálcio (Ca^{2+}) e íon sulfato (SO_4^{2-}) (Eq. 1). Em seguida um composto orgânico (CH_2O) reage com o íon sulfato (SO_4^{2-}) e produz sulfeto de hidrogênio (H_2S) e bicarbonato (HCO_3^-) (Eq. 2). Por fim, o íon cálcio (Ca^{2+}) e o bicarbonato (HCO_3^-) reagem e formam carbonato de cálcio (CaCO_3) (Eq. 3) (ACHAL et al., 2015).

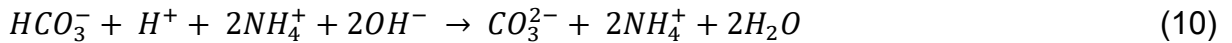


No processo de conversão metabólica aeróbica de sais de cálcio (Figura 1 b), as bactérias induzem a oxidação de um sal de cálcio orgânico, por exemplo acetato de cálcio ($\text{Ca}(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4)$) ou lactato de cálcio ($\text{Ca}(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6)$), a carbonato de cálcio sob condições ambientais favoráveis para as bactérias crescerem e se desenvolverem, como temperatura e pH adequados, presença de água, oxigênio e nutrientes. Os subprodutos da conversão de acetato de cálcio em carbonato de cálcio são dióxido de carbono e água, ambos compatíveis com o concreto (Eq. 4). Além disso, o carbonato de cálcio pode se formar pelo processo de carbonatação (Figura 1 a), onde o hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) se combina com o dióxido de carbono, dentro do concreto (Eq. 5). Isso leva a uma forma de cura autógena involuntária (ALAZHARI et al., 2018; JONKERS et al., 2010; WIKTOR; JONKERS, 2011).



No processo de hidrólise enzimática da ureia (Figura 1 b), as bactérias ureolíticas produzem uma enzima, denominada urease, que catalisa a hidrólise da ureia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) em amônio (NH_4^+) e carbonato (CO_3^{2-}), através de várias reações químicas. Primeiramente, uma molécula de ureia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) é hidrolisada intracelularmente em uma molécula de carbamato (NH_2COOH) e uma molécula de amônia (NH_3) (Eq. 6). Em seguida a molécula de carbamato (NH_2COOH) é espontaneamente hidrolisa para formar mais uma molécula de amônia (NH_3) além de ácido carbônico (H_2CO_3) (Eq. 7). Depois a molécula de ácido carbônico (H_2CO_3) forma uma molécula de bicarbonato (HCO_3^-) e uma molécula de íon de hidrogênio e as duas moléculas de amônia (2NH_3) formam duas moléculas de íons de amônio (2NH_4^+) e duas moléculas de íons de hidróxido (2OH^-) (Eqs. 8 e 9). Por fim, as moléculas produzidas nas equações 8 e 9 reagem e produzem uma molécula de carbonato (CO_3^{2-}) e duas moléculas de amônio (2NH_4^+) (Eq. 10). As duas últimas reações dão origem a um aumento do pH (ACHAL; MUKERJEE; REDDY, 2013; VAN TITTELBOOM et al., 2010).

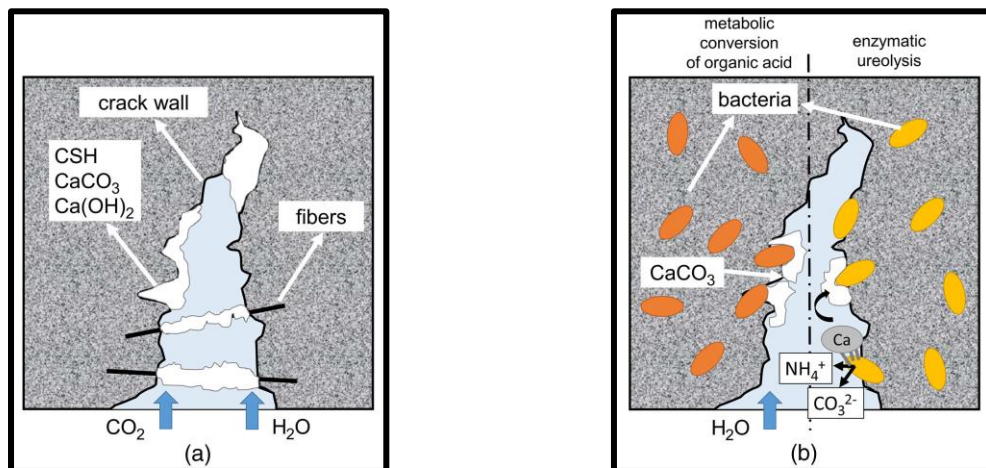




As reações descritas acima fazem com que a parede celular da bactéria fique carregada negativamente, devido ao íon CO_3^{2-} formado, se tornando um local de nucleação. Dessa forma as bactérias atraem os íons cátions do ambiente, incluindo Ca^{2+} , depositando-os em sua parede celular. Os íons cátions posteriormente irão reagir com os íons CO_3^{2-} levando à precipitação de carbonato de cálcio (CaCO_3) (Eqs.11 e 12) (ACHAL; MUKERJEE; REDDY, 2013; VAN TITTELBOOM et al., 2010).



Figura 1 - Mecanismos de autocicatrização de fissuras: a) Autógeno (carbonatação) e b) Autônomo (conversão de sais de cálcio/hidrólise da ureia)



Fonte: (RAJCZAKOWSKA et al., 2019)

2.3.2 Condições Necessárias para a Biomineralização

A biomineralização de fissuras está diretamente relacionada à produção de CaCO_3 por bactérias. Neste processo, bactérias produtoras de carbonato de cálcio, juntamente com os nutrientes (meios de cultura utilizados para cultivar as bactérias) e os precursores da precipitação de carbonato (compostos de ureia e

cálcio), são adicionados à matriz cimentícia ou aspergidos em sua superfície. Havendo condições ambientais favoráveis, as bactérias adicionadas serão ativadas precipitando carbonato de cálcio para remediar pequenas fissuras dos materiais cimentícios (ACHAL et al., 2015; WANG et al., 2018). Tal processo depende de muitos fatores incluindo o tipo e a quantidade de bactérias, o meio de cultura, as fontes de nutrientes utilizados, o pH da matriz e a umidade disponível no material cimentício (KHALIQ; EHSAN, 2016).

2.3.2.1 Linhagens bacterianas

Com base nos estudos compilados da literatura, (Tabela I do apêndice A), foi possível identificar as principais linhagens de bactérias utilizadas como agentes de biomineralização de fissuras nos materiais cimentícios (Tabela 1).

Observa-se que a maioria dos estudos fazem uso de bactérias do gênero *Bacillus*, sendo estas pertencentes ao Filo Firmicutes, ou seja, que apresentam forma celular cilíndrica chamada de bastonete ou bacilo e ainda são denominadas de Gram-positivos, pois apresentam somente uma única camada de envoltório celular e sobre esta, uma camada espessa de peptidoglicano (MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Tabela 1 – Diversidade de bactérias biomineralizadoras de materiais a base de cimento

Bactérias	Autores
<i>B. pasteurii</i> ou <i>Sporosarcina pasteurii</i>	(BANG; GALINAT; RAMAKRISHNAN, 2001), (XU; WANG, 2018), (ACHAL et al., 2009), (CHUNXIANG et al., 2009), (BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015), (KIM et al., 2013), (ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2011), (BANG et al., 2010), (BHASKAR et al., 2017), (GOLLAPUDI et al., 1995), (ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2010), (MAHESWARAN et al., 2014), (JONKERS; SCHLANGEN, 2007), (RUAN et al., 2019), (BANG; RAMAKRISHNAN, 2001), (MAGESWARI; KUMAR; RAGHUNANDHAN, 2017), (BERGH et al., 2020)
<i>B. sphaericus</i>	(WANG et al., 2014a), (VAN TITTELBOOM et al., 2010), (WANG et al., 2012), (DE MUYNCK et al., 2008b), (WANG et al., 2014b), (DE MUYNCK et al., 2008a), (GUPTA; KUA; PANG, 2018), (KIM et al., 2013), (DE BELIE; DE MUYNCK, 2009), (WANG et al., 2010), (WANG et al., 2018), (KUA et al., 2019), (MAGESWARI; KUMAR; RAGHUNANDHAN, 2017)
<i>B. subtilis</i>	(KHALIQ; EHSAN, 2016), (PEI et al., 2013), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2017), (NAIN et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2018), (ABDULKAREEM et al., 2019), (NGUYEN et al., 2019), (NEELADHARAN et al., 2018), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2020), (SINGH; GUPTA, 2020), (MONDAL; GHOSH, 2021)
<i>B. pseudofirmus</i>	(JONKERS et al., 2010), (ALAZHARI et al., 2018), (STUCKRATH et al.,

Bactérias	Autores
	2014), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008a), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008b), (LORS et al., 2017), (JONKERS; SCHLANGEN, 2007)
<i>B. cohnii</i>	(JONKERS et al., 2010), (ZHANG et al., 2017), (XU; YAO, 2014), (SIERRA-BELTRAN; JONKERS; SCHLANGEN, 2014), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008a), (JONKERS; SCHLANGEN, 2007), (TAN et al., 2020)
<i>Bacillus</i> sp.	(LUO; QIAN; LI, 2015), (TZIVILOGLOU et al., 2016), (ACHAL; MUKERJEE; REDDY, 2013), (DE KOSTER et al., 2015), (LUCAS et al., 2018)
<i>Bacillus megaterium</i>	(KRISHNAPRIYA; VENKATESH BABU; PRINCE ARULRAJ, 2015), (NAIN et al., 2019), (MAGESWARI; KUMAR; RAGHUNANDHAN, 2017)
<i>Bacillus licheniformis</i>	(KRISHNAPRIYA; VENKATESH BABU; PRINCE ARULRAJ, 2015), (HELMI et al., 2016)
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	(CHEN; QIAN; HUANG, 2016), (QIAN et al., 2016)
<i>Bacillus halodurans</i>	(JONKERS; SCHLANGEN, 2008a), (JONKERS; SCHLANGEN, 2007)
<i>Bacillus alkalinitrilicus</i>	(WIKTOR; JONKERS, 2011)
<i>Bacillus flexus</i>	(KRISHNAPRIYA; VENKATESH BABU; PRINCE ARULRAJ, 2015)
<i>Bacillus cereus</i>	(MAHESWARAN et al., 2014)
<i>Sposarcina ureae</i>	(BHASKAR et al., 2017)
<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	(JANG et al., 2020)
<i>Bacillus alkaliphilus</i>	(JANG et al., 2020), (SU et al., 2021)
<i>Deinococcus radiodurans</i>	(MONDAL et al., 2020), (MONDAL; GHOSH, 2021)

Fonte: Autora, 2021.

Segundo Schwantes-Cezario et al. (2018), as bactérias do gênero *Bacillus* são consideradas agentes autocicatrizas das fissuras dos materiais cimentícios, pois possuem a capacidade de precipitar minerais que fecham as fissuras de forma autônoma em materiais a base de cimento. As espécies de bactérias do gênero *Bacillus* são consideradas muito promissoras para seu uso como agente reparador de fissuras nos materiais cimentícios devido sua capacidade de tolerar o ambiente extremo dos materiais cimentícios (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

A autocicatrização por bactérias, principalmente do gênero *Bacillus*, envolve a selagem das fissuras por precipitação de carbonato de cálcio através de compostos orgânicos contendo cálcio, incluindo nitrato de cálcio (WANG et al., 2014a), lactato de cálcio (JONKERS et al., 2010), glutamato de cálcio (XU; YAO, 2014), acetato de cálcio (ALAZHARI et al., 2018) e cloreto de cálcio (VAN TITTELBOOM et al., 2010).

Um dos fatores que caracterizam o ambiente extremo dos materiais cimentícios é seu pH alcalino (pH > 11) (GUPTA; KUA; PANG, 2018; GUPTA; PANG; KUA, 2017). As bactérias que crescem e se desenvolvem em pH alcalino

(superior a 7) são denominadas de alcalifílicas e, para sobreviver ao pH alcalino da matriz cimentícia são capazes de formar estruturas resistentes a condições extremas, como suportar alterações ambientais ou produtos químicos, bem como radiações ultravioletas e tensões mecânicas, denominadas de esporos bacterianos ou endósporos (JONKERS et al., 2010; VAN TITTELBOOM; DE BELIE, 2013). Os esporos permitem que as bactérias permaneçam latentes na ausência de nutrientes e água por centenas de anos, até o retorno de um ambiente favorável ao desenvolvimento celular (DE KOSTER et al., 2015).

As bactérias responsáveis pela produção de carbonato de cálcio são capazes de formar endósporos aeróbicos (crescem na presença de oxigênio) ou anaeróbicos facultativos (crescem na presença ou na ausência de oxigênio) (GOLLAPUDI et al., 1995). O tamanho típico dos esporos das bactérias do gênero *Bacillus* é de aproximadamente 1 μm (JONKERS et al., 2010). Na figura 2 pode-se visualizar o tamanho do endósporo da bactéria *B. subtilis*.

Figura 2 – Endósporo da bactéria *B. subtilis*



Fonte: (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017)

2.3.2.2 Quantidade de bactérias

Estudos realizados por ALAZHARI et al. (2018), demonstram que o processo de autocicatrização, das fissuras presentes nos materiais cimentícios, realizado pelas bactérias *B. pseudofirmus*, depende de um número mínimo de esporos bacterianos necessários para garantir o processo de cicatrização. Na Tabela 2 tem-se a concentração de esporos bacterianos utilizadas em diferentes estudos em materiais cimentícios, para a remediação de suas fissuras.

Tabela 2 – Concentração de esporos bacterianos empregada no processo de autocicatrização de matrizes a base de cimento

Nº de bactérias	Autores
10 ⁵ esporos g ⁻¹	(WIKTOR; JONKERS, 2011)
10 ⁷ esporos g ⁻¹	(SIERRA-BELTRAN; JONKERS; SCHLANGEN, 2014)
10 ⁹ esporos g ⁻¹	(WANG et al., 2014a), (ALAZHARI et al., 2018)
10 ⁵ esporos mL ⁻¹	(KRISHNAPRIYA; VENKATESH BABU; PRINCE ARULRAJ, 2015), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2020)
10 ⁶ esporos mL ⁻¹	(BHASKAR et al., 2017), (BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015), (MAHESWARAN et al., 2014), (JANG et al., 2020)
10 ⁷ esporos mL ⁻¹	(DE MUYNCK et al., 2008b), (BANG; GALINAT; RAMAKRISHNAN, 2001), (ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2011), (XU; YAO, 2014), (BERGH et al., 2020)
10 ⁸ esporos mL ⁻¹	(JONKERS et al., 2010), (KHALIQ; EHSAN, 2016), (ZHANG et al., 2017), (BANG et al., 2010), (PEI et al., 2013), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008a), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008b), (WANG et al., 2010), (NAIN et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2018), (CHEN; QIAN; HUANG, 2016), (SINGH; GUPTA, 2020), (MONDAL et al., 2020), (MONDAL; GHOSH, 2021)
10 ⁹ esporos mL ⁻¹	(WANG et al., 2012), (WANG et al., 2014b), (LUO; QIAN; LI, 2015), (XU; WANG, 2018), (STUCKRATH et al., 2014), (LORS et al., 2017), (JONKERS; SCHLANGEN, 2007), (QIAN et al., 2016), (WANG et al., 2018), (ABDULKAREEM et al., 2019), (MAGESWARI; KUMAR; RAGHUNANDHAN, 2017), (TAN et al., 2020), (SU et al., 2021)
10 ¹⁰ esporos mL ⁻¹	(GUPTA; KUA; PANG, 2018)
10 ⁸ esporos L ⁻¹	(TZIVILOGLOU et al., 2016), (NGUYEN et al., 2019)
Não informado no paper	(VAN TITTELBOOM et al., 2010), (DE MUYNCK et al., 2008a), (ACHAL; MUKERJEE; REDDY, 2013), (ACHAL et al., 2009), (CHUNXIANG et al., 2009), (KIM et al., 2013), (GOLLAPUDI et al., 1995), (DE KOSTER et al., 2015), (DE BELIE; DE MUYNCK, 2009), (HELMI et al., 2016), (ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2010), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2017), (RUAN et al., 2019), (BANG; RAMAKRISHNAN, 2001), (LUCAS et al., 2018), (KUA et al., 2019), (NEELADHARAN et al., 2018),

Fonte: Autora, 2021.

Observa-se que existe divergência em relação à quantidade de esporos bacterianos empregada nos materiais à base de cimento necessárias para a remediação de suas fissuras, mostrando uma variação entre 10⁵ a 10¹⁰ esporos mL⁻¹ de água ou entre 10⁵ e 10⁹ esporos g⁻¹ de material utilizado para incorporação dos esporos bacterianos.

Além disso, constatou-se diferentes métodos de incorporação destes agentes à mistura cimentícias, podendo ser adicionadas em relação à quantidade de água (mililitro ou litro), utilizada na água da mistura, na água de cura ou na água aspergida na fissura, bem como em relação à massa (em gramas), dos materiais utilizados para incorporação das bactérias (MIHASHI; NISHIWAKI, 2012; WU; JOHANNESSON; GEIKER, 2012).

2.3.2.3 Meio de cultura e nutrientes

Na tabela 3 esta demonstrada a diversidade de meios de cultura/nutrientes e fontes de cálcio empregados em diferentes estudos. Os meios de cultura/nutrientes servem para o cultivo e crescimento das bactérias antes de serem adicionadas a matriz cimentícia. Já os compostos usados como fonte de cálcio são empregados para a precipitação de carbonato de cálcio após a adição das bactérias à matriz cimentícia.

Tabela 3 – Fontes nutricionais utilizadas pelas bactérias biomineralizadoras

Autores	Bactérias	Meio de cultura/Nutrientes	Fonte de Cálcio
(JONKERS et al., 2010)	<i>B. pseudofirmus</i> <i>B. cohnii</i>	Peptona, Extrato de carne, Bicarbonato de sódio, Carbonato de sódio	Lactato de cálcio, Acetato de cálcio
(WIKTOR; JONKERS, 2011)	<i>B. alkalinitrilicus</i>	-	Lactato de cálcio
(WANG et al., 2014a)	<i>B. sphaericus</i>	Extrato de levedura	Ureia, Nitrato de cálcio
(VAN TITTELBOOM ET AL., 2010)	<i>B. sphaericus</i>	Extrato de levedura	Ureia, Cloreto de Ca, Nitrato de Ca, Acetato de Ca
(WANG et al., 2012)	<i>B. sphaericus</i>	Extrato de levedura	Ureia
(KHALIQ; EHSAN, 2016)	<i>B. subtilis</i>	-	Lactato de cálcio
(DE MUYNCK et al., 2008b)	<i>B. sphaericus</i>	Caldo nutritivo, Bicarbonato de sódio, Cloreto de amônio	Ureia, Acetato de cálcio, Cloreto de cálcio
(WANG et al., 2014b)	<i>B. sphaericus</i>	Extrato de levedura	Ureia, Nitrato de cálcio
(DE MUYNCK et al., 2008a)	<i>B. sphaericus</i>	Caldo nutritivo, Bicarbonato de sódio	Ureia, Acetato de cálcio e Cloreto de cálcio
(TZIVILOGLOU et al., 2016)	<i>Bacillus</i> sp	Extrato de levedura	Lactato de cálcio
(BANG; GALINAT; RAMAKRISHNAN, 2001)	<i>B. pasteurii</i>	Trypcase, Extrato de levedura, Tricina, Sulfato de amônio, Ácido glutâmico	Ureia, Cloreto de cálcio
(LUO; QIAN; LI, 2015)	<i>Bacillus</i> sp	Peptona, Extrato de levedura	-
(ALAZHARI et al., 2018)	<i>B. pseudofirmus</i>	Luria Bertani	Acetato de cálcio
(ACHAL; MUKERJEE;	<i>Bacillus</i> sp	Caldo nutriente	Ureia, Cloreto

Autores	Bactérias	Meio de cultura/Nutrientes	Fonte de Cálcio
(REDDY, 2013)			de cálcio
(ZHANG et al., 2017)	<i>B. cohnii</i>	Peptona, Extrato de carne, Bicarbonato de sódio, Carbonato de sódio	Lactato de cálcio
(XU; WANG, 2018)	<i>B. pasteurii</i>	Peptona, Extrato de carne, Sulfato de manganês	Ureia
(KRISHNAPRIYA; VENKATESH BABU; PRINCE ARULRAJ, 2015)	<i>B. megaterium</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. flexus</i>	Caldo nutriente, Extrato de levedura, Extrato de carne, Farelo de trigo	Ureia
(ACHAL et al., 2009)	<i>B. pasteurii</i>	Cloreto de sódio, Extrato de levedura	Ureia, Cloreto de cálcio
(BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015)	<i>B. pasteurii</i>	Extrato de levedura	Ureia
(XU; YAO, 2014)	<i>B. cohnii</i>	Peptona, Extrato de carne, Bicarbonato de sódio, Carbonato de sódio	Lactato de cálcio, Glutamato de cálcio
(RUAN et al., 2019)	<i>B. pasteurii</i>	Cloreto de amônia, Extrato de levedura, Cloreto de níquel	Ureia
(CHUNXIANG et al., 2009)	<i>B. pasteurii</i>	Extrato de carne bovina, Peptona	Ureia, Nitrato de cálcio
(SIERRA-BELTRAN; JONKERS; SCHLANGEN, 2014)	<i>B. cohnii</i>	Extrato de levedura	Lactato de cálcio
(BANG et al., 2010)	<i>B. pasteurii</i>	Triptona, Extrato de levedura, Tricina, Sulfato de amônio, Ácido glutâmico	Ureia, Cloreto de cálcio
(BHASKAR et al., 2017)	<i>B. pasteurii</i> <i>S. ureae</i>	Caldo de nutriente (Peptona, Extrato de carne) e Caldo de soja (Peptona de caseína, Peptona de farinha de soja, cloreto de sódio)	Lactato de cálcio, Ureia
(CHEN; QIAN; HUANG, 2016)	<i>B. mucilaginous</i>	Sacarose, Extrato de levedura	Nitrato de cálcio
(KIM et al., 2013)	<i>B. pasteurii</i> <i>B. sphaericus</i>	Caldo nutriente, Cloreto de amônio, Bicarbonato de sódio	Ureia, Acetato de cálcio
(ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2011)	<i>B. pasteurii</i>	Caldo de nutrientes (caseína, peptona)	Ureia, Cloreto de cálcio
(KUA et al., 2019)	<i>B. sphaericus</i>	Extrato de levedura	Nitrato de cálcio, Ureia
(GUPTA; KUA; PANG, 2018)	<i>B. sphaericus</i>	Extrato de levedura	Ureia, Nitrato de cálcio
(PEI et al., 2013)	<i>B. subtilis</i>	Caldo nutriente, Cloreto de amônio, Bicarbonato de sódio	Ureia, Cloreto de cálcio
(GOLLAPUDI et al., 1995)	<i>B. pasteurii</i>	Caldo nutritivo, Cloreto	Ureia, Ácido

Autores	Bactérias	Meio de cultura/Nutrientes	Fonte de Cálcio
		de amônio, Bicarbonato de sódio	carbônico, Cloreto de cálcio
(DE BELIE; DE MUYNCK, 2009)	<i>B. sphaericus</i>	-	Ureia, Cloreto de cálcio, Nitrato de cálcio
(JONKERS; SCHLANGEN, 2008a)	<i>B. pseudofirmus</i> <i>B. cohnii</i> <i>B. halodurans</i>	Extrato de levedura, Cloreto de amônio, Fosfato monopotássico, Cloreto de potássio, Cloreto de magnésio	Cloreto de cálcio
(NAIN et al., 2019)	<i>B. subtilis</i> <i>B. megaterium</i>	Caldo nutriente (Peptona, Cloreto de sódio, Extrato de levedura, Extrato de carne)	-
(NGUYEN et al., 2019)	<i>B. subtilis</i>	Trypton Soy Broth	-
(DE KOSTER et al., 2015)	<i>Bacillus</i> sp	-	-
(STUCKRATH et al., 2014)	<i>B. pseudofirmus</i>	Peptona, Extrato de carne, Sulfato de manganês	Lactato de cálcio, Cloreto de cálcio
(JONKERS; SCHLANGEN, 2008b)	<i>B. pseudofirmus</i>	Peptona	Lactato de cálcio, Glutamato de cálcio
(HELMI et al., 2016)	<i>B. licheniformis</i>	Caldo nutriente	Ureia, Cálcio puro
(ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2010)	<i>B. pasteurii</i>	Cloreto de sódio, Extrato de levedura	Ureia, Cloreto de cálcio
(JANG et al., 2020)	<i>L. boronitolerans</i> <i>B. alkaliphilus</i>	Luria Bertani	Lactato de cálcio
(LORS et al., 2017)	<i>B. pseudofirmus</i>	Caldo Nutritivo, Extrato de levedura	Lactato de cálcio, nitrato de cálcio
(SINGH; GUPTA, 2020)	<i>B. subtilis</i>	Peptona, Cloreto de sódio, Extrato de levedura	Lactato de cálcio
(WANG et al., 2018)	<i>B. sphaericus</i>	Extrato de levedura	Ureia
(LUCAS et al., 2018)	<i>Bacillus</i> sp	Extrato de levedura	Lactato de cálcio
(SCHWANTES-CEZARIO et al., 2017)	<i>B. subtilis</i>	Meio de cultura B4 (Extrato de levedura)	Acetato de cálcio, Glicose
(MAHESWARAN et al., 2014)	<i>B. pasteurii</i> <i>B. cereus</i>	Caldo nutritivo, Cloreto de sódio, Extrato bovino, Extrato de levedura	Ureia, Cloreto de cálcio
(ABDULKAREEM et al., 2019)	<i>B. subtilis</i>	Caldo nutritivo (Tryptona, Extracto de levedura, Cloreto de sódio)	-
(WANG et al., 2010)	<i>B. sphaericus</i>	Extrato de levedura	Ureia, Nitrato de cálcio

Autores	Bactérias	Meio de cultura/Nutrientes	Fonte de Cálcio
(JONKERS; SCHLANGEN, 2007)	<i>B. pasteurii</i> <i>B. pseudofirmus</i> <i>B. cohnii</i> <i>B. halodurans</i>	Peptona, Extrato de levedura, Bicarbonato de sódio	-
(SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019)	<i>B. subtilis</i>	Luria Bertani	-
(QIAN et al., 2016)	<i>B. mucilaginous</i>	-	Nitrato de cálcio
(BANG; RAMAKRISHNAN, 2001)	<i>B. pasteurii</i>	-	Ureia, Cloreto de cálcio
(SCHWANTES-CEZARIO et al., 2020)	<i>B. subtilis</i>	Luria Bertani	-
(BERGH et al., 2020)	<i>B. pasteurii</i>	Trypton Soy Broth	Ureia
(TAN ET AL., 2020)	<i>B. cohnii</i>	Luria Bertani	Nitrato de cálcio
(SCHWANTES-CEZARIO et al., 2018)	<i>B. subtilis</i>	Mueller Hinton, Trypton Soy Broth	-
(MONDAL; GHOSH, 2021)	<i>D. radiodurans</i> <i>B. subtilis</i>	Extrato de carne de bovino, Extrato de levedura, Cloreto de Sódio, Peptona	Lactato de cálcio
(SU et al., 2021)	<i>B. alkaliphilus</i>	Peptona, Extrato bovino e Cloreto de sódio	Lactato de cálcio
(MONDAL et al., 2020)	<i>D. radiodurans</i>	Caldo nutritivo (extrato bovino, extrato de levedura, cloreto de sódio, peptona)	Lactato de cálcio
(NEELADHARAN et al., 2018)	<i>B. subtilis</i>	Peptona, Cloreto de sódio, Extrato de levedura	Lactato de cálcio
(MAGESWARI; KUMAR; RAGHUNANDHAN, 2017)	<i>B. pasteurii</i> <i>B. sphaericus</i> <i>B. megaterium</i>	Cloreto de sódio, Peptona, Extrato de carne	Ureia, cloreto de cálcio

Fonte: Autora, 2021.

Nota-se que há uma ampla variedade de meios nutricionais utilizados para o cultivo bacteriológico, o que pode estar relacionado com a diversidade de bactérias empregadas nos estudos, uma vez que o crescimento de cada espécie pode ser influenciado pelo meio de cultivo utilizado. Ainda pode estar relacionado com o acesso ou a disponibilidade de meios para a realização das pesquisas.

Apesar da variedade dos meios de cultura utilizados para o crescimento bacteriano, até agora os pesquisadores usaram meios nutricionais padrão, contendo caldo nutritivo, extrato de levedura, extrato de carne, peptona e glicose, onde o padrão nutricional indica alta preferência por meios proteicos (ACHAL et al., 2015; ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2011; JONKERS et al., 2010).

Observa-se que, entre os compostos utilizados como fonte de cálcio mais utilizados, a ureia está presente em 50% dos estudos analisados (Tabela 3). Isso está relacionado ao uso de bactérias ureolíticas que produzem CaCO_3 a partir da ureia.

Na maioria dos estudos, bactérias ureolíticas do gênero *Bacillus* foram utilizadas como agentes para a produção biológica de cristais de carbonato de cálcio para a reparação de fissuras presentes nos diversos materiais cimentícios (NGUYEN et al., 2019), dentre as bactérias ureolíticas destacam-se linhagens de *B. pasteurii*, *B. sphaericus* e *B. ureae*. Recentemente a adição de bactérias não-ureolíticas do gênero *Bacillus* estão sendo usadas como uma proposta alternativa (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2020), como as bactérias *B. subtilis*, *B. pseudofirmus* e *B. cohnii*.

As bactérias ureolíticas são capazes de precipitar carbonato de cálcio pela conversão de ureia em amônia e carbonato, que precipitam com os atuais íons de cálcio, para formar minerais de carbonato de cálcio. A degradação bacteriana da ureia aumenta localmente o pH e promove a deposição microbiana de carbonato como carbonato de cálcio em um ambiente rico em cálcio. Estes cristais precipitados podem assim preencher as fissuras (JONKERS et al., 2010; VAN TITTELBOOM et al., 2010).

As bactérias não-ureolíticas são capazes de precipitar carbonato de cálcio através da mudança de pH, onde os compostos orgânicos contendo cálcio são convertidos em carbonato de cálcio involuntariamente por respiração bacteriana, reduzindo o pH do meio e tornando-o mais viável para o crescimento bacteriano (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2020).

A precipitação de carbonato de cálcio pelas bactérias depende de nutrientes precursores que forneçam cálcio livre. Dessa forma, uma variedade de nutrientes pode ser utilizada como fonte de cálcio, dentre eles estão o cloreto de cálcio, lactato de cálcio, acetato de cálcio, nitrato de cálcio, glutamato de cálcio e acetato de cálcio (ACHAL et al., 2015; LORS et al., 2017; STUCKRATH et al., 2014).

2.3.2.4 pH e umidade

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* apresentam dificuldade de crescimento em pH altamente alcalino, entre 12-13, como é encontrado na matriz cimentícia dos materiais cimentícios (DE MUYNCK; DE BELIE; VERSTRAETE, 2010;

RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; BANG, 2001). Pesquisas afirmam que o pH ideal para o crescimento das bactérias do gênero *Bacillus* encontra-se em torno de 9 (PACHECO-TORGAL; LABRINCHA, 2013; STOCKS-FISCHER; GALINAT; BANG, 1999). Neste sentido, o pH dos materiais a base de cimento, pode ser reduzido de 13 para valores próximos ou inferiores a 9 em decorrência da carbonatação (reação do dióxido de carbono com os hidróxidos e outros compostos de hidratação presentes na matriz cimentícia). Também pode-se reduzir o pH da matriz alterando-se a composição química do cimento empregado. Adições pozolânicas como a cinza volante e a sílica ativa podem ser utilizadas para tal (SANTOS; ALBUQUERQUE; RIBEIRO, 2020).

A biomineralização ocorre quando esporos bacterianos e nutrientes são adicionados a matriz dos materiais cimentícios durante a mistura dos seus componentes. Quando aparecem fissuras, as bactérias presentes ao redor da superfície da fissura são ativadas, tornando-se metabolicamente ativas, pela presença de umidade e de oxigênio nas fissuras e assim, começam a produzir carbonato de cálcio. Desta maneira, as fissuras são obstruídas e a entrada de água e outros produtos químicos é impedida (BHASKAR et al., 2017; DE KOSTER et al., 2015; JONKERS et al., 2010; WANG et al., 2014b).

A água que penetra nas fissuras dos materiais cimentícios pode reagir com o óxido de cálcio não hidratado presente na matriz cimentícia e formar o hidróxido de cálcio (Eq. 13) e o hidróxido de cálcio pode reagir com o dióxido de carbono e formar carbonato de cálcio (Eq. 14). O carbonato de cálcio produzido proporciona à vedação das fissuras, reduzindo à permeabilidade de água e assim, melhora à durabilidade dos materiais cimentícios. O potencial de cicatrização deste sistema está diretamente relacionado à quantidade de partículas de cal não reagidas na argamassa (JONKERS; SCHLANGEN, 2008a).



2.3.3 Encapsulamento dos Esporos Bacterianos

O encapsulamento dos esporos bacterianos é essencial para a realização da atividade bacteriana desejada, ou seja, o crescimento e a precipitação

de carbonato de cálcio em ambientes secos e alcalinos presente nos materiais cimentícios por um longo período de tempo (GUPTA; KUA; PANG, 2018). Na Tabela 4 estão demonstrados os tipos de materiais utilizados na formação das cápsulas protetoras para o encapsulamento dos esporos bacterianos e os respectivos autores que as desenvolveram e utilizaram.

Tabela 4 – Materiais utilizados no encapsulamento dos esporos bacterianos

Materiais	Autores
Sem cápsula	(JONKERS et al., 2010), (DE MUYNCK et al., 2008a), (DE MUYNCK et al., 2008b), (LUO; QIAN; LI, 2015), (ACHAL; MUKERJEE; REDDY, 2013), (ACHAL et al., 2009), (KRISHNAPRIYA; VENKATESH BABU; PRINCE ARULRAJ, 2015), (CHUNXIANG et al., 2009), (BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015), (XU; YAO, 2014), (KIM et al., 2013), (ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2011), (PEI et al., 2013), (GOLLAPUDI et al., 1995), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008a), (DE BELIE; DE MUYNCK, 2009), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008b), (HELMI et al., 2016), (ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2010), (LORS et al., 2017), (MAHESWARAN et al., 2014), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2017), (JONKERS; SCHLANGEN, 2007), (RUAN et al., 2019), (QIAN et al., 2016), (NAIN et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2018), (ABDULKAREEM et al., 2019), (NGUYEN et al., 2019), (NEELADHARAN et al., 2018), (MAGESWARI; KUMAR; RAGHUNANDHAN, 2017), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2020), (JANG et al., 2020), (BERGH et al., 2020), (MONDAL et al., 2020), (SU et al., 2021), (MONDAL; GHOSH, 2021)
Agregado Leve	(WIKTOR; JONKERS, 2011), (KHALIQ; EHSAN, 2016), (ALAZHARI et al., 2018), (TZIVILOGLOU et al., 2016), (ZHANG et al., 2017), (SIERRA-BELTRAN; JONKERS; SCHLANGEN, 2014), (STUCKRATH et al., 2014), (LUCAS et al., 2018), (TAN et al., 2020)
Hidrogel	(WANG et al., 2014b), (WANG et al., 2018)
Sílica gel	(VAN TITTELBOOM et al., 2010), (WANG et al., 2012)
Biocarvão	(GUPTA; KUA; PANG, 2018), (KUA et al., 2019)
Geopolímero	(DE KOSTER et al., 2015), (BANG; RAMAKRISHNAN, 2001)
Melanina	(WANG et al., 2014a)
Poliuretano	(WANG et al., 2012), (BANG; GALINAT; RAMAKRISHNAN, 2001)
Cimento de sulfoaluminato de Ca	(XU; WANG, 2018)
Ceramsite	(CHEN; QIAN; HUANG, 2016)
Esferas/Tubos de vidro	(BANG et al., 2010), (WANG et al., 2010)
Zeólito	(BHASKAR et al., 2017)
Fibras de celulose	(SINGH; GUPTA, 2020)

Fonte: Autora, 2021.

Apesar da grande diversidade de materiais desenvolvidos e utilizados para o encapsulamento dos microrganismos para que estes possam ser adicionados

aos materiais cimentícios, ainda não existe consenso entre os estudos sobre qual dos materiais possui maior eficiência. A Tabela 4 mostra que 59% dos artigos optaram por não encapsular a bactéria, sendo mais fácil de ser aplicado e mais barato em comparação com o processo de encapsulamento. Dentre os 41% dos artigos que encapsularam a bactéria, 35% utilizaram agregado leve, ou seja, tipo de agregado que apresentam peso específico inferior ao agregado convencional, como meio de encapsulamento.

Uma melhor eficiência no processo de biomineralização é obtida quando as bactérias são encapsuladas sintética ou naturalmente, antes de serem adicionadas aos materiais cimentícios, para protegê-las do ambiente e do pH alcalino da matriz cimentícia, mantendo sua viabilidade por longo período de tempo (ACHAL et al., 2015; DHAMI; REDDY; MUKHERJEE, 2012; WANG et al., 2018), e protege-las do encolhimento das fissuras, pela precipitação inicial de carbonato de cálcio produzido pelas bactérias (GUPTA; PANG; KUA, 2017) ou pela hidratação dos grãos de cimento que produzem carbonato de cálcio (JONKERS et al., 2010). O método de "encapsulamento sintético" consiste em imobilizar as bactérias em uma cápsula protetora. O método de "encapsulamento natural" consiste em introduzir as bactérias na forma de endósporos (BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015). Quando as bactérias são submetidas a condições ambientais adversas, como carência nutricional, dessecação e temperaturas, inibem o crescimento bacteriano convertendo as células vegetativas em esporos. Uma vez que as condições adequadas são restabelecidas, os esporos germinam e o organismo retoma seu estilo de vida normal (MADIGAN et al., 2016).

A cápsula de revestimento deve ser forte e flexível o suficiente para sobreviver ao processo de mistura, mas frágil o suficiente para quebrar sempre que uma fissura surgir no material cimentício. Para garantir que as fissuras passem pela cápsula ao invés de contorná-las, a cápsula de revestimento deve formar uma ligação suficientemente forte com a matriz cimentícia (DE KOSTER et al., 2015; HUANG et al., 2016). A sobrevivência e o desempenho das cápsulas durante o processo de biomineralização dependem da espessura de sua parede, do diâmetro da cápsula e da textura da sua superfície (GUPTA; PANG; KUA, 2017; SIDIQ; GRAVINA; GIUSTOZZI, 2019). A eficiência do encapsulamento depende estritamente do tamanho das cápsulas, suas propriedades e distribuição ao longo da matriz de concreto (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016), além do material utilizado para a

confeção das cápsulas (PACHECO-TORGAL; LABRINCHA, 2013).

2.3.4 Tipos de Materiais Cimentícios Bacteriológicos

Diversos estudos já realizados indicam o uso potencial de bactérias para remediar fissuras em materiais cimentícios usados na construção civil, como pasta, argamassa e concreto (ABDULKAREEM et al., 2019; DHAMI; REDDY; MUKHERJEE, 2012; MAGESWARI; KUMAR; RAGHUNANDHAN, 2017; QIAN et al., 2016). Na Tabela 5 encontram-se os principais tipos de materiais cimentícios utilizados na aplicação do processo de biomineralização utilizando bactérias.

Tabela 5 – Materiais cimentícios usados no reparo de fissuras

Material cimentício	Autores
Pasta	(JONKERS et al., 2010), (LUO; QIAN; LI, 2015), (CHUNXIANG et al., 2009), (BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015), (CHEN; QIAN; HUANG, 2016), (DE KOSTER et al., 2015), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008a), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008b), (JONKERS; SCHLANGEN, 2007), (RUAN et al., 2019), (QIAN et al., 2016)
Argamassa	(WIKTOR; JONKERS, 2011), (WANG et al., 2014a), (WANG et al., 2012), (DE MUYNCK et al., 2008a), (WANG et al., 2014b), (DE MUYNCK et al., 2008b), (ALAZHARI et al., 2018), (BANG; GALINAT; RAMAKRISHNAN, 2001), (TZIVIOGLOU et al., 2016), (ACHAL; MUKERJEE; REDDY, 2013), (XU; WANG, 2018), (ACHAL et al., 2009), (BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015), (XU; YAO, 2014), (SIERRA-BELTRAN; JONKERS; SCHLANGEN, 2014), (GUPTA; KUA; PANG, 2018), (BANG et al., 2010), (BHASKAR et al., 2017), (PEI et al., 2013), (STUCKRATH et al., 2014), (ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2010), (LORS et al., 2017), (MAHESWARAN et al., 2014), (WANG et al., 2010), (BANG; RAMAKRISHNAN, 2001), (QIAN et al., 2016), (WANG et al., 2018), (LUCAS et al., 2018), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019), (ABDULKAREEM et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2020), (SINGH; GUPTA, 2020), (JANG et al., 2020), (BERGH et al., 2020), (TAN et al., 2020), (MONDAL et al., 2020), (SU et al., 2021), (MONDAL; GHOSH, 2021)
Concreto	(VAN TITTELBOOM et al., 2010), (KHALIQ; EHSAN, 2016), (ZHANG et al., 2017), (KRISHNAPRIYA; VENKATESH BABU; PRINCE ARULRAJ, 2015), (KIM et al., 2013), (ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2011), (DE BELIE; DE MUYNCK, 2009), (MAHESWARAN et al., 2014), (JONKERS; SCHLANGEN, 2007), (KUA et al., 2019), (NAIN et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2018), (NGUYEN et al., 2019), (NEELADHARAN et al., 2018), (MAGESWARI; KUMAR; RAGHUNANDHAN, 2017)
Outros*	(GOLLAPUDI et al., 1995), (HELMI et al., 2016), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2017)

*Coluna de areia (GOLLAPUDI et al., 1995), pintura (HELMI et al., 2016) e biofilme (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2017).

Fonte: Autora, 2021.

Observa-se que o material a base de cimento mais utilizado para

análise de reparação de fissuras foi à argamassa, estando presente em 57% dos artigos científicos. Este fato pode ser relacionado à maior facilidade de execução de estudos experimentais em argamassas, face o menor porte das amostras. Ainda, as argamassas são materiais a base de cimento amplamente utilizados nas construções e que fissuram com facilidade, provocando o surgimento de manifestações patológicas como infiltração de água e conseqüentemente o surgimento de microrganismos como fungos que prejudicam a saúde do usuário.

2.3.5 Mecanismos de Incorporação das Bactérias

A incorporação das bactérias ou esporos bacterianos em materiais cimentícios pode acontecer de três maneiras diferentes (VIJAY; MURMU; DEO, 2017), como mostrado na Tabela 6. Estudos revelam que o método direto caracteriza-se por ser mais simples e eficaz, onde as células bacterianas são suspensas diretamente na água da mistura (JONKERS et al., 2010), ou, a água da mistura é substituída por uma cultura composta por células bacterianas e um meio nutriente (BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015). Outros estudos relatam a suspensão de células bacterianas na água utilizada na cura das amostras de materiais a base de cimento (VAN TITTELBOOM et al., 2010), bem como pela pulverização de células bacterianas aplicadas na superfície das fissuras das amostras de materiais a base de cimento (BANG; GALINAT; RAMAKRISHNAN, 2001). A grande maioria dos trabalhos aborda somente um meio de incorporação das bactérias, demonstrando a importância da comparação dos métodos (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019).

Tabela 6 – Métodos de incorporação das bactérias aos materiais cimentícios

Métodos de incorporação das bactérias	Autores
Direto	(JONKERS et al., 2010), (WIKTOR; JONKERS, 2011), (WANG et al., 2014a), (WANG et al., 2012), (KHALIQ; EHSAN, 2016), (WANG et al., 2014b), (ALAZHARI et al., 2018), (LUO; QIAN; LI, 2015), (TZIVIOGLOU et al., 2016), (ACHAL; MUKERJEE; REDDY, 2013), (XU; WANG, 2018), (ZHANG et al., 2017), (ACHAL et al., 2009), (KRISHNAPRIYA; VENKATESH BABU; PRINCE ARULRAJ, 2015), (CHUNXIANG et al., 2009), (BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015), (XU; YAO, 2014), (SIERRA-BELTRAN; JONKERS; SCHLANGEN, 2014), (GUPTA; KUA; PANG, 2018), (CHEN; QIAN; HUANG, 2016), (BHASKAR et al., 2017), (PEI et al., 2013), (GOLLAPUDI et al., 1995), (DE KOSTER et al., 2015), (STUCKRATH et al., 2014), (JONKERS;

Métodos de incorporação das bactérias	Autores
	SCHLANGEN, 2008a), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008b), (ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2010), (WANG et al., 2010), (JONKERS; SCHLANGEN, 2007), (QIAN et al., 2016), (WANG et al., 2018), (LUCAS et al., 2018), (KUA et al., 2019), (NAIN et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2018), (ABDULKAREEM et al., 2019), (NGUYEN et al., 2019), (NEELADHARAN et al., 2018), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2020), (SINGH; GUPTA, 2020), (JANG et al., 2020), (TAN et al., 2020), (MONDAL et al., 2020), (SU et al., 2021), (MONDAL; GHOSH, 2021)
Imersão	(VAN TITTELBOOM et al., 2010), (DE MUYNCK et al., 2008b), (DE MUYNCK et al., 2008a), (KIM et al., 2013), (ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2011), (DE BELIE; DE MUYNCK, 2009), (HELMI et al., 2016), (LORS et al., 2017), (MAHESWARAN et al., 2014), (RUAN et al., 2019), (NEELADHARAN et al., 2018), (MAGESWARI; KUMAR; RAGHUNANDHAN, 2017)
Pulverizadas	(VAN TITTELBOOM et al., 2010), (BANG; GALINAT; RAMAKRISHNAN, 2001), (BANG et al., 2010), (BANG; RAMAKRISHNAN, 2001), (QIAN et al., 2016), (BERGH et al., 2020)

Fonte: Autora, 2021.

A maioria dos trabalhos já publicados empregam o método direto de incorporação das bactérias, geralmente esporuladas ou encapsuladas. Esse método é interessante na produção de biomateriais para novos materiais de estruturas de concreto ou argamassas de reparo de estruturas. Os estudos que envolvem a pulverização de bactérias podem ser de interesse para aplicações em estruturas existentes, uma vez que nestes casos não é possível conduzir outra forma de incorporação das bactérias.

2.3.6 Ensaios para Verificação do Potencial de Atuação das Bactérias

A realização dos diferentes ensaios, demonstrados na Tabela 7, tem como objetivo avaliar o potencial de atuação das bactérias biomineralizadoras e reparadoras de fissuras quando aplicadas na matriz cimentícia.

Tabela 7 – Ensaios para verificação do potencial de atuação das bactérias nos materiais cimentícios

Ensaios	Autores
Precipitação de carbonato de cálcio	(JONKERS et al., 2010), (WIKTOR; JONKERS, 2011), (WANG et al., 2014a), (VAN TITTELBOOM et al., 2010), (WANG et al., 2012)(DE MUYNCK et al., 2008b), (KHALIQ; EHSAN, 2016), (WANG et al., 2014b), (DE MUYNCK et al., 2008a), (ALAZHARI et al., 2018), (LUO; QIAN; LI, 2015), (TZIVILOGLOU et al., 2016), (ACHAL; MUKERJEE; REDDY, 2013), (XU; WANG, 2018), (ZHANG

Ensaio	Autores
	et al., 2017), (KRISHNAPRIYA; VENKATESH BABU; PRINCE ARULRAJ, 2015), (CHUNXIANG et al., 2009), (BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015), (SIERRA-BELTRAN; JONKERS; SCHLANGEN, 2014), (GUPTA; KUA; PANG, 2018), (KIM et al., 2013), (CHEN; QIAN; HUANG, 2016), (BANG et al., 2010), (BHASKAR et al., 2017), (PEI et al., 2013), (GOLLAPUDI et al., 1995), (DE KOSTER et al., 2015), (STUCKRATH et al., 2014), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008a), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008b), (HELMI et al., 2016), (ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2010), (LORS et al., 2017), (MAHESWARAN et al., 2014), (WANG et al., 2010), (JONKERS; SCHLANGEN, 2007), (RUAN et al., 2019), (QIAN et al., 2016), (WANG et al., 2018), (LUCAS et al., 2018), (KUA et al., 2019), (NAIN et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2018), (NGUYEN et al., 2019), (MAGESWARI; KUMAR; RAGHUNANDHAN, 2017), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2020), (SINGH; GUPTA, 2020), (JANG et al., 2020), (BERGH et al., 2020), (TAN et al., 2020), (MONDAL et al., 2020), (SU et al., 2021), (MONDAL; GHOSH, 2021)
Resistência à compressão	(JONKERS et al., 2010), (KHALIQ; EHSAN, 2016), (BANG; GALINAT; RAMAKRISHNAN, 2001), (ACHAL; MUKERJEE; REDDY, 2013), (XU; WANG, 2018), (ACHAL et al., 2009), (KRISHNAPRIYA; VENKATESH BABU; PRINCE ARULRAJ, 2015), (BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015), (XU; YAO, 2014), (SIERRA-BELTRAN; JONKERS; SCHLANGEN, 2014), (GUPTA; KUA; PANG, 2018), (BANG et al., 2010), (BHASKAR et al., 2017), (PEI et al., 2013), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008a), (ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2010), (MAHESWARAN et al., 2014), (JONKERS; SCHLANGEN, 2007), (BANG; RAMAKRISHNAN, 2001), (LUCAS et al., 2018), (KUA et al., 2019), (NAIN et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2018), (ABDULKAREEM et al., 2019), (NEELADHARAN et al., 2018), (MAGESWARI; KUMAR; RAGHUNANDHAN, 2017), (SINGH; GUPTA, 2020), (JANG et al., 2020), (BERGH et al., 2020), (MONDAL et al., 2020), (MONDAL; GHOSH, 2021)
Resistência à tração	(JONKERS; SCHLANGEN, 2008a), (JONKERS; SCHLANGEN, 2007), (NGUYEN et al., 2019), (NEELADHARAN et al., 2018)
Resistência à flexão	(WANG et al., 2012), (GUPTA; KUA; PANG, 2018), (CHEN; QIAN; HUANG, 2016), (BANG et al., 2010), (WANG et al., 2010), (JANG et al., 2020), (SU et al., 2021)
Absorção de gases	(WIKTOR; JONKERS, 2011), (DE MUYNCK et al., 2008b), (DE MUYNCK et al., 2008a), (TZIVILOGLOU et al., 2016), (SIERRA-BELTRAN; JONKERS; SCHLANGEN, 2014)
Absorção/Permeabilidade de água	(WANG et al., 2014a), (VAN TITTELBOOM et al., 2010), (WANG et al., 2012), (DE MUYNCK et al., 2008b), (WANG et al., 2014b), (DE MUYNCK et al., 2008a), (ALAZHARI et al., 2018), (LUO; QIAN; LI, 2015), (TZIVILOGLOU et al., 2016), (XU; WANG, 2018), (CHUNXIANG et al., 2009), (GUPTA; KUA; PANG, 2018), (KIM et al., 2013), (ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2011), (BHASKAR et al., 2017), (DE BELIE; DE MUYNCK, 2009), (QIAN et al., 2016), (WANG et al., 2018), (KUA et al., 2019), (NGUYEN et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2020), (JANG et al., 2020), (BERGH et al., 2020), (TAN et al., 2020), (MONDAL et al., 2020), (SU et al., 2021), (MONDAL; GHOSH, 2021)
Porosidade	(JONKERS et al., 2010), (WANG et al., 2014a), (ACHAL; MUKERJEE; REDDY, 2013), (PEI et al., 2013), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2020), (JANG et al., 2020), (BERGH et al., 2020)

Fonte: Autora, 2021.

Os trabalhos publicados demonstram que para avaliar o potencial de atuação das bactérias na recuperação de fissuras nos materiais a base de cimento, deve-se analisar a capacidade de fechamento das fissuras, verificar a presença de carbonato de cálcio nas fissuras, além de realizar os ensaios relacionados à resistência mecânica, a permeabilidade/absorção de água e de gases e a porosidade da matriz cimentícia.

O fechamento das fissuras pode ser visualizado por meio do estereomicroscópio (ALAZHARI et al., 2018), (TZIVILOGLOU et al., 2016), quando acoplado a softwares de medição de largura, comprimento e área permite avaliar a eficiência de cura da fissura, ou seja, comparar a espessura inicial e final de uma fissura e acompanhar ao longo do tempo sua regeneração (WIKTOR; JONKERS, 2011), (WANG et al., 2014a), (VAN TITTELBOOM et al., 2010), (WANG et al., 2014b), (LUO; QIAN; LI, 2015), (XU; WANG, 2018), (ZHANG et al., 2017).

A análise da morfologia do CaCO_3 precipitado nas fissuras pode ser realizada utilizando o microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JONKERS et al., 2010), (WANG et al., 2014a), (DE MUYNCK et al., 2008b), (KHALIQ; EHSAN, 2016), (DE MUYNCK et al., 2008a), (ACHAL; MUKERJEE; REDDY, 2013), (ZHANG et al., 2017), (KRISHNAPRIYA; VENKATESH BABU; PRINCE ARULRAJ, 2015), (CHUNXIANG et al., 2009), (GUPTA; KUA; PANG, 2018), (GOLLAPUDI et al., 1995), (STUCKRATH et al., 2014), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008a), (HELMİ et al., 2016), (ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2010), (LORS et al., 2017), (MAHESWARAN et al., 2014), (JONKERS; SCHLANGEN, 2007), (QIAN et al., 2016), (JANG et al., 2020), (BERGH et al., 2020), quando acoplado ao Espectrômetro de Raios-X de Energia Dispersiva (EDS) permite identificar a composição do material precipitado, mostrando de modo qualitativo os elementos químicos presentes no material analisado (WIKTOR; JONKERS, 2011), (LUO; QIAN; LI, 2015), (TZIVILOGLOU et al., 2016), (XU; WANG, 2018), (SIERRA-BELTRAN; JONKERS; SCHLANGEN, 2014), (KIM et al., 2013), (CHEN; QIAN; HUANG, 2016), (BANG et al., 2010), (BHASKAR et al., 2017), (PEI et al., 2013), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008b), (RUAN et al., 2019), (WANG et al., 2018), (LUCAS et al., 2018), (NAIN et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019), (NGUYEN et al., 2019), (MAGESWARI; KUMAR; RAGHUNANDHAN, 2017), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2020), (MONDAL et al., 2020), (MONDAL; GHOSH, 2021).

Para identificar a presença do CaCO_3 pode-se utilizar a técnica de TGA, ou análise termogravimétrica, que analisa a variação da massa de uma amostra ao longo do tempo quando submetida a um aquecimento pré-definido (VAN TITTELBOOM et al., 2010), (BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015), (STUCKRATH et al., 2014), (MAHESWARAN et al., 2014), (WANG et al., 2010), (QIAN et al., 2016), (KUA et al., 2019), (JANG et al., 2020). A decomposição do CaCO_3 ocorre na faixa de temperatura entre 500 e 900°C.

A caracterização mineralógica do material precipitado nas fissuras pode ser avaliada pela técnica de DRX, ou difração de raio-X, que identifica as fases cristalinas presentes na amostra, através de picos gerados na difração dos raios X produzidos pelos elétrons dos átomos característicos do mineral (KHALIQ; EHSAN, 2016), (DE MUYNCK et al., 2008a), (LUO; QIAN; LI, 2015), (XU; WANG, 2018), (ZHANG et al., 2017), (CHUNXIANG et al., 2009), (BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015), (GUPTA; KUA; PANG, 2018), (KIM et al., 2013), (CHEN; QIAN; HUANG, 2016), (BHASKAR et al., 2017), (PEI et al., 2013), (GOLLAPUDI et al., 1995), (HELMI et al., 2016), (LORS et al., 2017), (MAHESWARAN et al., 2014), (RUAN et al., 2019), (QIAN et al., 2016), (LUCAS et al., 2018), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2020), (MONDAL et al., 2020), (MONDAL; GHOSH, 2021).

Entre os ensaios mecânicos, que podem ser empregados na verificação da eficácia dos mecanismos de autorregeneração dos materiais a base de cimento, a resistência à compressão é uma das propriedades dos materiais cimentícios que é influenciada pela adição de bactérias. Estudos indicam que as amostras apresentam ganho de resistência ao longo do tempo, onde a resistência das amostras com bactéria é superior a resistência das amostras controle, sem bactérias (KHALIQ; EHSAN, 2016), (BANG; GALINAT; RAMAKRISHNAN, 2001), (ACHAL; MUKERJEE; REDDY, 2013), (XU; WANG, 2018), (ACHAL et al., 2009), (KRISHNAPRIYA; VENKATESH BABU; PRINCE ARULRAJ, 2015), (BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015), (SIERRA-BELTRAN; JONKERS; SCHLANGEN, 2014), (GUPTA; KUA; PANG, 2018), (BANG et al., 2010), (BHASKAR et al., 2017), (PEI et al., 2013), (ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2010), (MAHESWARAN et al., 2014), (LUCAS et al., 2018), (NAIN et al., 2019), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019), (ABDULKAREEM et al., 2019), (MONDAL et al., 2020), (MONDAL; GHOSH, 2021). Porém outros estudos indicam que, apesar das amostras apresentarem um ganho de resistência ao longo do tempo, a resistência das amostras com bactéria é inferior a

resistência das amostras controle (JONKERS et al., 2010), (XU; YAO, 2014), (JONKERS; SCHLANGEN, 2008a), (JONKERS; SCHLANGEN, 2007), (BANG; RAMAKRISHNAN, 2001), (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2018), (NEELADHARAN et al., 2018), (SINGH; GUPTA, 2020), (JANG et al., 2020).

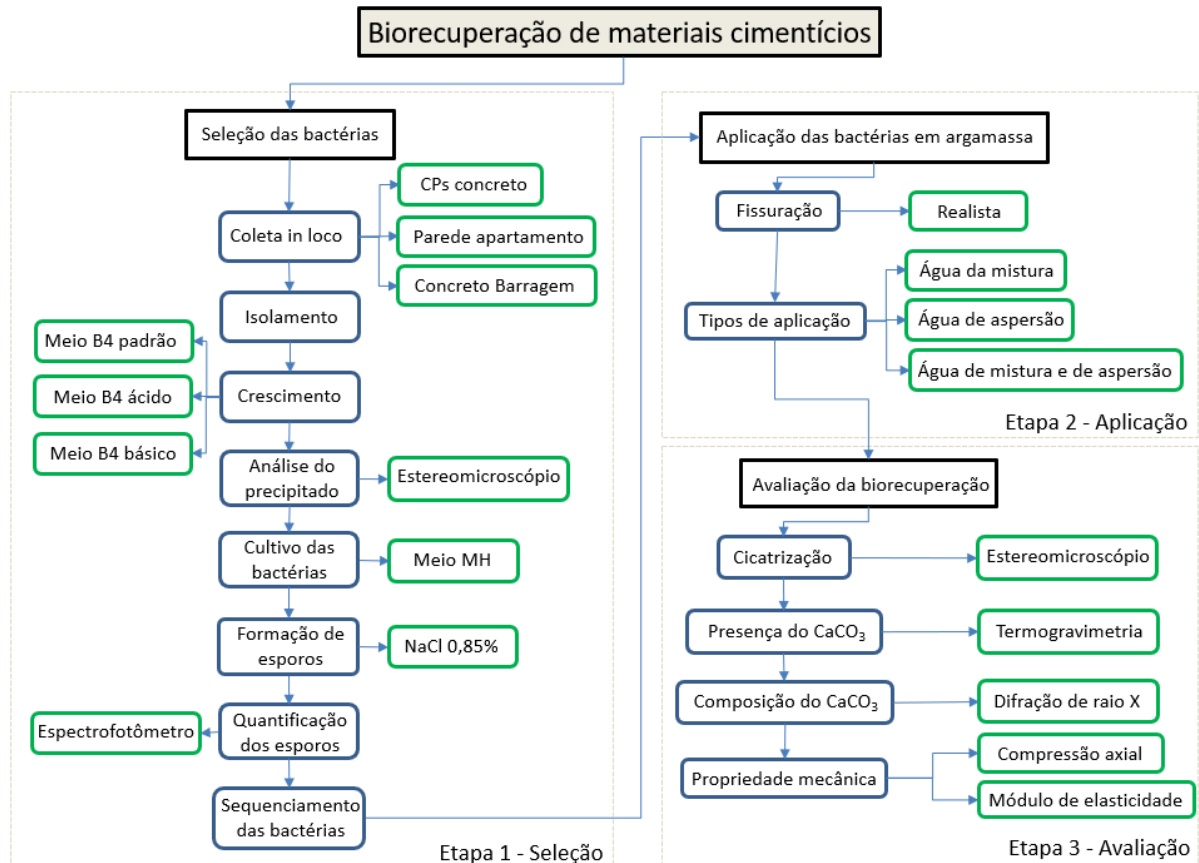
As informações supracitadas mostram aspectos importantes em relação as causas de formação das fissuras (origem térmica, retração, origem estrutural, reações expansivas, corrosão das armaduras) e a ação dos microrganismos na biodeterioração e biomineralização dos materiais a base de cimento. Quanto ao processo de biomineralização de materiais cimentícios, aborda as principais pesquisas desenvolvidas sobre o tema, o metabolismo das bactérias biomineralizadoras (redução dissimilatória do sulfato, conversão metabólica aeróbia de sais de cálcio, hidrólise enzimática da ureia), os fatores que influenciam a biodeposição de carbonato de cálcio na recuperação de fissuras (tipos e quantidade de bactérias, meio de cultura e nutrientes, pH e umidade), os materiais utilizados no encapsulamento e os mecanismos de incorporação das bactérias no material cimentício, os tipos de materiais cimentícios e os ensaios utilizados para avaliar o desempenho da remediação de fissuras.

Neste sentido o presente estudo objetivou a busca, em amostras de concreto, por bactérias potencialmente biomineralizadoras de carbonato de cálcio, as quais poderão ser utilizadas em estudos futuros na recuperação de fissuras em materiais a base de cimento.

3. METODOLOGIA

Para o desenvolvimento deste estudo a metodologia utilizada foi dividida em três etapas principais, como mostrado na Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma da metodologia da pesquisa



Fonte: Autora, 2021.

- Etapa 1 – A seleção das bactérias precipitadoras de carbonato de cálcio, foi realizada por meio dos seguintes procedimentos:
 - a) Coleta de amostras de biofilme presente em estruturas à base de cimento;
 - b) Isolamento das bactérias;
 - c) Crescimento das bactérias em meios de cultura B4 (padrão, ácido e básico);
 - d) Análise dos cristais precipitados;
 - e) Cultivo das bactérias e Indução da formação de esporos bacterianos;
 - f) Quantificação dos esporos bacterianos;
 - g) Sequenciamento das bactérias.

- Etapa 2 – A aplicação das bactérias precipitadoras de carbonato de cálcio na argamassa, foi realizada de três maneiras distintas:
 - a) Água da mistura;
 - b) Aspersão superficial;
 - c) Água da mistura e aspersão superficial.
- Etapa 3 – A avaliação do potencial das bactérias na biorecuperação de fissuras, foi realizada por meio dos seguintes procedimentos:
 - a) Análise da cicatrização;
 - b) Análise da presença do CaCO_3 ;
 - c) Análise da composição do CaCO_3 ;
 - d) Análise das propriedades mecânicas.

3.1 SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS PRECIPITADORAS DE CARBONATO DE CÁLCIO

As bactérias utilizadas neste estudo (Tabela 8) foram isoladas e/ou adquiridas de quatro locais distintos:

- i)* Bactéria controle: uma linhagem de *Bacillus subtilis* (AP91), disponibilizada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)³;
- ii)* Seis bactérias previamente isoladas de concreto depositadas na coleção de microrganismos da UNILA⁴ (FAVATO et al., 2018);
- iii)* Dezoito bactérias isoladas de uma edificação previamente isoladas e depositadas na coleção de microrganismos da UNILA⁵;
- iv)* Vinte e seis bactérias isoladas de diferentes locais da Barragem de concreto da Itaipu, Foz do Iguaçu⁶.

O procedimento de seleção das bactérias potencialmente responsáveis pela bioprecipitação de carbonato de cálcio foi realizado comparando a bactéria “controle – *B. subtilis*” e as bactérias “testes”, isoladas dos três distintos locais

³ Esta bactéria está sendo utilizada, devido sua capacidade comprovada de precipitar carbonato de cálcio (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2017).

⁴ As bactérias foram coletadas de amostras de corpos de provas de concreto do Laboratório de Concreto da UNILA no ano de 2018.

⁵ As bactérias foram coletadas de uma amostra de parede interna de alvenaria revestida com argamassa de uma edificação na cidade de Foz do Iguaçu, PR em 2018.

⁶ Coleta de amostras realizada em 06 de março de 2020.

(corpos de prova, edificação e Barragem), de acordo com os métodos apresentados abaixo.

Tabela 8 – Nomenclatura das bactérias utilizadas no estudo

Nomenclatura	Descrição
AP91	Bactéria “controle” <i>Bacillus subtilis</i>
BC (1-6)	Bactérias “teste” isoladas de corpos de prova de concreto
BCAP (1-18)	Bactérias “teste” isoladas da parede interna de uma edificação
BBi (1-26)	Bactérias “teste” isoladas da Barragem da Itaipu

Fonte: Autora, 2021.

3.1.1 Coleta das Amostras da Barragem de Itaipu

As amostras coletadas da Barragem da Itaipu foram retiradas de locais com processos de lixiviação de cálcio e fluxos de água decorrente da infiltração do Rio Paraná. Foram coletadas 5 amostras (Figura 4) de pontos distintos utilizando materiais como o esculpidor (Lecron) e espátula de pintor. As amostras 1, 2, 3 e 4 foram coletadas de drenos de concreto. A amostra 5 foi coletada de uma fissura no concreto com biofilme formado devido a percolação de água. As amostras foram acondicionadas em frascos esterilizados e processadas no Laboratório de Biotecnologia Ambiental da Unila.

Figura 4 – Pontos de coleta das amostras: a) amostra 1: Piezômetro PS-F-021; b) amostra 2: Dreno de concreto DM-F-702; c) amostra 3: Dreno de concreto DCC-F-081; d) amostra 4: Dreno de concreto DJC-F-009; e) amostra 5: Fissura no concreto



a)



b)



c)



d)



e)

Fonte: Autora, 2021.

3.1.2 Isolamento das Bactérias Associadas a Barragem de Itaipu

O isolamento das bactérias (Figura 5), associadas ao concreto da Barragem de Itaipu, foi realizado com as amostras contendo biofilme (2, 4 e 5) coletadas nas cotas 56 m, 44 m e 144 m. As amostras 2 e 4 foram centrifugadas em tubos Falcon de 50 mL por 4 minutos a 6000 rpm. Após a centrifugação, parte do sobrenadante foi descartado, restando apenas o material depositado no fundo do frasco, representando o biofilme com elevada concentração celular. A amostra 5 foi diluída em tubos Falcon de 50 mL contendo uma solução de 10 mL de água deionizada estéril e 0,5 mL de peptona. Foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) para cada amostra (MADIGAN et al., 2016), e alíquotas de 100 μ L foram transferidas para placas de Petri contendo o meio de cultivo NA (Ágar Nutriente) composto por 3 g L⁻¹ de extrato de carne, 5 g L⁻¹ de peptona e 15 g L⁻¹ de ágar, acrescido de 50 μ L de nistatina 100.000 UI mL⁻¹. As placas foram colocadas na estufa BOD a 37 °C por 24 horas.

Figura 5 – Isolamento das Bactérias associadas a Barragem de Itaipu



a) Amostras 2, 4 e 5.



b) Diluição seriada.



c) Placas de Petri.

Fonte: Autora, 2021.

3.1.2.1 *Preservação em ultracongelamento das bactérias*

Após os procedimentos de isolamento, as bactérias “testes”, associadas ao concreto da Barragem de Itaipu (total de 26), foram preservadas pelo método de ultracongelamento onde as bactérias foram recolhidas da superfície do meio NA presente na placa de Petri com o auxílio da alça de platina, solubilizadas em uma solução de crioproteção (glicerol 20%) presente dentro de um tubo de criopreservação de 2 mL e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

3.1.2.2 *Reativação das bactérias preservadas em ultracongelamento*

As bactérias “controle” e “testes”, isoladas de corpos de prova de concreto, da parede interna da edificação e da Barragem de Itaipu, foram reativadas da preservação em glicerol 20% a -80°C . Desta forma, a bactéria “controle” e as

bactérias “testes” (total de 50) foram cultivadas em placas de Petri contendo o meio de cultivo NA e em seguida colocadas na estufa BOD a 37 °C por 24 horas. Após reativação, foi realizada a técnica de coloração de Gram (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015) com alguns isolados que apresentaram crescimento celular, para verificar o estado de pureza das culturas bacterianas.

Além da técnica de coloração Gram foi realizada a técnica de coloração verde malaquita (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017) com as linhagens bacterianas (1 linhagem controle - AP91, 2 linhagens isoladas da edificação - BCAP 2 e BCAP 14 e 2 linhagens isoladas da Barragem - BBI 4-10⁻²-B(E) e BBI 4-10⁻²-B(F)) selecionadas (conforme os itens 3.1.3 e 3.1.4) quanto a capacidade de formação de cristais na superfície das colônias, para identificar o formato de bacilos bem como a produção de esporos bacterianos.

3.1.3 Crescimento Bacteriano e Análise da Alteração do pH

As bactérias “controle” e “testes” (corpos de prova, edificação e barragem) foram cultivadas em três diferentes meios de cultura (Figura 6): *i*) meio padrão B4 (4 g L⁻¹ de extrato de levedura, 14 g 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%); *ii*) meio ácido B4 tamponado a pH 7 (4 g L⁻¹ de extrato de levedura, 12 g L⁻¹ de TRIS, 14 g L⁻¹ de ágar bacteriológico, 2,5 mL L⁻¹ de solução de vermelha fenol, 12,5 mL L⁻¹ de glicose a 40%, 25 mL L⁻¹ de acetato de cálcio a 10%, pH 7 ajustado com HCl); *iii*) meio básico B4 tamponado a pH 8,2 (4 g L⁻¹ de extrato de levedura, 12 g L⁻¹ de TRIS, 14 g L⁻¹ de ágar bacteriológico, 2,5 mL L⁻¹ de solução de vermelha fenol, 12,5 mL L⁻¹ de glicose a 40%, 25 mL L⁻¹ de acetato de cálcio a 10%, pH 8,2 ajustado com HCl), conforme procedimentos descritos por Marvasi; Davila-Vazquez; Martinez (2013) e Marvasi et al. (2010). As placas foram inoculadas na estufa (BOD) à 37 °C durante 7 dias.

Figura 6 – Meios de cultivo utilizados no ensaio de alteração do pH



Fonte: Autora, 2021.

3.1.4 Análise dos Cristais Precipitados

Após tempo de incubação, as placas com colônias bacterianas foram visualizadas em Estereomicroscópio (modelo Nikon SMZ 745) acoplado a câmera do celular (Samsung A50), para determinar a capacidade de bioprecipitação do carbonato de cálcio, pela formação de cristais na superfície das colônias. Neste momento foi importante vincular os diferentes pHs e as cores dos meios com a formação de cristais pela bactéria, onde os meios B4 ácido, padrão e alcalino, apresentaram cores laranja escuro, laranja claro e vermelho, respectivamente. Segundo Marvasi; Davila-Vazquez; Martinez (2013) quando as bactérias são cultivadas em meio de cultura B4 padrão elas devem apresentar crescimento, podendo modificar o pH do meio induzindo a alcalinização e promovendo a precipitação de cristais, isso é observado pela mudança de cor do meio de cultura. Em meio de cultura B4 ácido elas não apresentam crescimento e a precipitação não ocorre, e em meio de cultura B4 alcalino elas apresentam crescimento, ocorrendo precipitação.

3.1.5 Cultivo das Bactérias e Indução da Formação de Esporos Bacterianos

As linhagens bacterianas (1 linhagem controle - AP91, 2 linhagens isoladas da edificação - BCAP 2 e BCAP 14 e 2 linhagens isoladas da Barragem - BBI 4-10⁻²-B(E) e BBI 4-10⁻²-B(F)) selecionadas (conforme os itens 3.1.3 e 3.1.4) quanto a capacidade de formação de cristais na superfície das colônias, foram inoculadas e

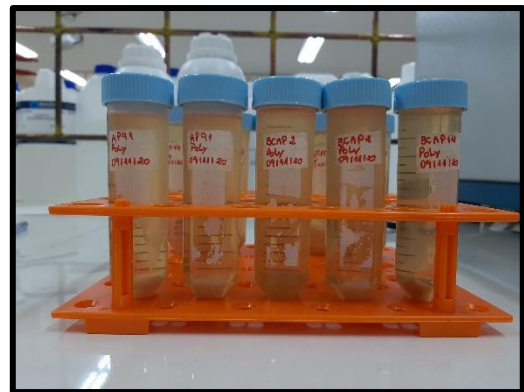
cultivadas (Figura 7) em tubos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura Mueller Hinton (MH) líquido, constituído por 17 g L⁻¹ de peptona de caseína, 2 g L⁻¹ de peptona de carne e 1,5 g L⁻¹ de amido, com pH final 7,3 ± 0,1. Em seguida as bactérias foram colocadas no agitador shaker (modelo SIF-6000) por 66 horas a 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 com as bactérias foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado 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 contendo bactérias foi armazenada por dois dias à temperatura de 8 °C para induzir a formação de esporos. É importante mencionar que a formação de esporos é fundamental para a sobrevivência das bactérias nos materiais cimentícios (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2018).

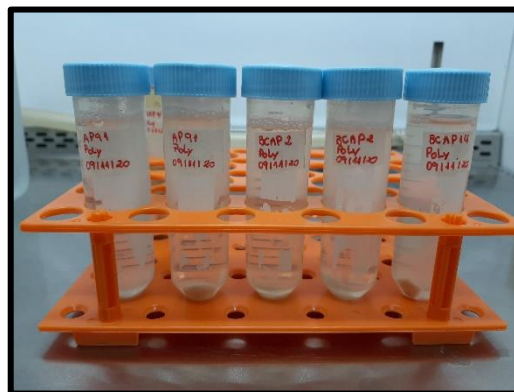
Figura 7 – Cultivo das Bactérias e Produção de esporos



a) Meio MH inoculado com bactérias



b) Solução com bactérias antes da lavagem



c) Solução com bactérias após a lavagem

3.1.6 Quantificação dos Esporos Bacterianos

A quantificação das linhagens bacterianas (1 linhagem controle - AP91, 2 linhagens isoladas da edificação - BCAP 2 e BCAP 14 e 2 linhagens isoladas da Barragem - BBI 4-10⁻²-B(E) e BBI 4-10⁻²-B(F)) cultivadas em meio de cultura Mueller Hinton (MH) foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro com leitura a 600 nm. Para o teste com o espectrofotômetro (modelo UV-M51), foram utilizadas duas amostras de 2 mL (KHALIQ; EHSAN, 2016), o controle com solução salina a 0,85% e os esporos bacterianos crescidos em solução de meio de cultura MH e diluídos em solução salina a 0,85%. Para calcular a concentração de esporos bacterianos no meio através da absorbância, foi utilizada a equação 15 aplicada por Ramachandran; Ramakrishnan; Bang (2001).

$$Y = (8,59 \times 10^7) \times (X^{1,3627}) \quad (15)$$

onde:

X = absorvência (a);

Y = concentração de esporos por mL.

O procedimento foi realizado três vezes adotando o valor médio da concentração de esporos (KIM et al., 2013). A partir da concentração encontrada, os cálculos de diluição foram feitos para atingir uma concentração de 10⁵ esporos mL⁻¹. 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).

3.1.7 Caracterização Molecular das Bactérias

A caracterização molecular foi realizada com as bactérias que apresentaram maior capacidade de precipitação de CaCO₃. Os isolados (BCAP2 e 4-10⁻²-E) foram encaminhadas a empresa DSMA – Desenvolvimento Sustentável e Monitoramento Ambiental responsável pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das bactérias pelo método Sanger.

A identificação foi alcançada comparando as sequências contíguas do

gene rRNA obtidas do sequenciamento com os dados da sequência rRNA das linhagens de referência, disponíveis no banco de dados público GenBank usando a rotina BLASTn. As sequências foram alinhadas usando o programa CLUSTAL X e analisadas com o software MEGA versão 4.0. As distâncias evolutivas foram derivadas das dissimilaridades de pares de sequências, calculadas conforme implementadas no MEGA, usando o modelo de substituição de DNA. A reconstrução filogenética foi feita usando o algoritmo de neighbour-joining (NJ), com valores de bootstrap calculados a partir de 1000 execuções de replicação, usando as rotinas incluídas no software MEGA (MENEZES et al., 2010).

3.2 APLICAÇÃO DAS BACTÉRIAS PRECIPITADORAS DE CaCO_3 NA ARGAMASSA

Para avaliar o potencial das bactérias na biorecuperação de matrizes a base de cimento, a solução formada por esporos bacterianos, na concentração de 10^5 esporos mL^{-1} em relação a água da mistura, selecionados (conforme os itens 3.1.3 e 3.1.4), acetato de cálcio e extrato de levedura (fonte de cálcio e fonte de nutriente, respectivamente, com 1% em relação ao peso do cimento segundo estudo desenvolvido por Ghellere et al (2021)⁷), foram empregadas na argamassa de três formas distintos:

- a) na água da mistura;
- b) na água para aspersão superficial da argamassa após o endurecimento (sendo renovada a cada 7 dias, segundo Bang et al. (2010), durante 120 dias).
- c) na água da mistura e na água para aspersão superficial da argamassa após o endurecimento (sendo renovada a cada 7 dias, segundo Bang et al. (2010), durante 120 dias).

3.2.1 Produção da Argamassa

As amostras de argamassa foram produzidas utilizando cimento Portland de alta resistência inicial (CPV ARI) com massa específica de $3,12 \text{ g/cm}^3$ (dados do fabricante – Itambé), agregado miúdo (areia natural) com massa específica

⁷ Acesso ao artigo – DOI: <https://doi.org/10.4322/conpat2021.502>.

de 2,65 g/cm³ e módulo de finura de 2,11, água e 5 soluções de esporos de diferentes linhagens bacterianas (Tabela 9) diluídas em água, acetato de cálcio e extrato de levedura.

Tabela 9 – Nomenclatura das bactérias aplicadas às matrizes cimentícias

Nomenclatura	Local de isolamento
B1	<i>Bacillus subtilis</i> (AP91) - EMBRAPA
B2	BCAP2 - Parade do apartamento
B3	BCAP14 - Parade do apartamento
B4	BBI 4-10 ⁻² -(E) - Barragem de Itaipu
B5	BBI 4-10 ⁻² -(F) - Barragem de Itaipu

Fonte: Autora, 2021.

Os esporos bacterianos (B), o acetato de cálcio (A) e o extrato de levedura (E) foram adicionados na argamassa de três formas distintas, água de mistura (AM), aspersão superficial (ASP) e água de mistura mais aspersão superficial (AM-ASP), produzindo 13 variações experimentais (Tabela 10).

Tabela 10 – Nomenclatura das amostras de argamassas

Nomenclatura	Composição
R	Argamassa de referência produzida com cimento, areia e água
AM-B1	Argamassa produzida com B1+A+E na água de mistura
AM-B2	Argamassa produzida com B2+A+E na água de mistura
AM-B3	Argamassa produzida com B3+A+E na água de mistura
AM-B4	Argamassa produzida com B4+A+E na água de mistura
AM-B5	Argamassa produzida com B5+A+E na água de mistura
ASP-B1	Argamassa com aspersão de esporos B1+A+E na superfície da fissura
ASP-B2	Argamassa com aspersão de esporos B2+A+E na superfície da fissura
ASP-B3	Argamassa com aspersão de esporos B3+A+E na superfície da fissura
ASP-B4	Argamassa com aspersão de esporos B4+A+E na superfície da fissura
ASP-B5	Argamassa com aspersão de esporos B5+A+E na superfície da fissura
AM-ASP-B1	Argamassa produzida com B1+A+E na água de mistura e com aspersão de esporos B1 na superfície da fissura
AM-ASP-B2	Argamassa produzida com B2+A+E na água de mistura e com aspersão de esporos B2 na superfície da fissura

Fonte: Autora, 2021.

A proporção de cimento-areia utilizada foi de 1:3, em massa, e a relação água-cimento (a/c) foi de 0,48 (Tabela 11 e 12).

Tabela 11 – Dosagem para a produção de três corpos de prova prismáticos 4 x 4 x 16 cm

Argamassas	Quantidade de materiais (g)			Esporos mL ⁻¹	Nutrientes (%) [*]	
	Cimento	Areia	Água		A	E
R	450	1350	216	-	-	-
AM-B (1-5)	450	1350	216	10 ⁵	1	1
ASP-B (1-5)	450	1350	216	10 ⁵	1	1
AM-ASP-B (1-2)	450	1350	216	10 ⁵	1	1

*Porcentagem dos nutrientes em relação a massa de cimento.

Fonte: Autora, 2021.

Tabela 12 – Dosagem para a produção de seis corpos de prova cilíndricos 5 x 10 cm

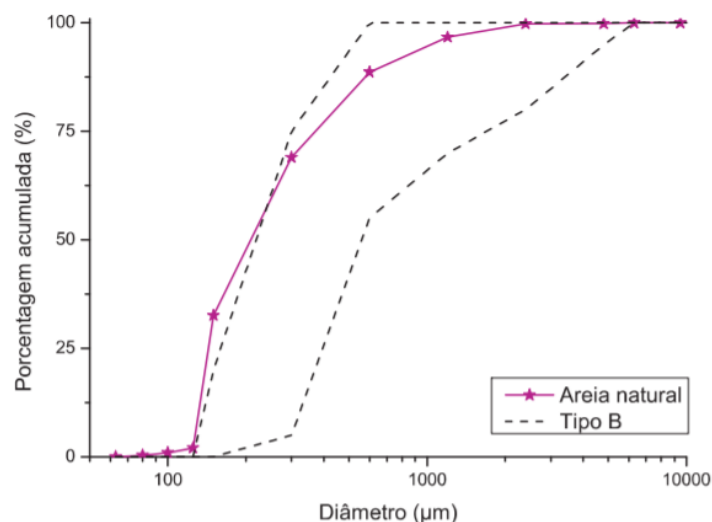
Argamassas	Quantidade de materiais (g)			Esporos mL ⁻¹	Nutrientes (%) [*]	
	Cimento	Areia	Água		A	E
R	700	2100	336	-	-	-
AM-B (1-5)	700	2100	336	10 ⁵	1	1

*Porcentagem dos nutrientes em relação a massa de cimento.

Fonte: Autora, 2021.

Os ensaios de caracterização (granulometria, massa específica e massa unitária) da areia, natural de origem quartzosa do Rio Paraná, foram realizados no LADEMA da Universidade Federal da Integração Latino-Americana. A granulometria da areia natural foi determinada por meio da realização do ensaio de peneiramento conforme a ABNT NBR NM 248 (2003). O resultado pode ser visualizado na Figura 8. Os valores da massa específica, de 2,65 g/cm³, e da massa unitária, de 1,72 g/cm³, foram determinados por meio do processo do picnômetro e conforme a ABNT NBR NM 45 (2006), respectivamente.

Figura 8 – Granulometria da areia natural



Fonte: Autora, 2021.

Conforme a Figura 8 pode-se verificar que a areia natural se enquadra parcialmente nos limites do tipo B conforme a norma britânica BS 1199 (BRITISH STANDARD, 1976). A areia natural apresentou os valores de 2,36 e 0,15 mm para a dimensão máxima e mínima característica, respectivamente. O modulo de finura resultante foi de 2,11. O teor de material pulverulento foi caracterizado no percentual de 0,52 e a absorção em 0,28%.

Quadro 1 – Programa experimental da aplicação das bactérias em argamassa

Amostra	Tipo de CPs	Número de CPs	Forma de aplicação do agente biológico			Ensaio (dias)	Análise de Desempenho
			AM	ASP	AM+ASP		
R	C	24				7, 14, 28, 120	Resistência mecânica
	P	3				0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84, 120	Biorecuperação da fissura
B1	C	24	X			7, 14, 28, 120	Resistência mecânica
	P	9	X	X	X	0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84, 120	Biorecuperação da fissura
B2	C	24	X			7, 14, 28, 120	Resistência mecânica
	P	9	X	X	X	0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84, 120	Biorecuperação da fissura
B3	C	24	X			7, 14, 28, 120	Resistência mecânica
	P	6	X	X		0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84, 120	Biorecuperação da fissura
B4	C	24	X			7, 14, 28, 120	Resistência mecânica
	P	6	X	X		0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84, 120	Biorecuperação da fissura
B5	C	24	X			7, 14, 28, 120	Resistência mecânica
	P	6	X	X		0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84, 120	Biorecuperação da fissura

Fonte: Autora, 2021.

Foram produzidos corpos de prova (CPs) prismáticos com dimensão 4 x 4 x 16 cm (largura x altura x comprimento) e cilíndricos com dimensões 5 x 10 cm (diâmetro x altura). A quantidade de CPs está descrita a seguir e demonstrada no Quadro 1:

- 27 CPs de referência sem bactéria, sendo 24 CPs cilíndricos não armados e não fissurados para a avaliação da resistência mecânica aos 7, 28, 60 e 120 dias e 3 CPS prismáticos armados e fissurados para a avaliação da

biorecuperação da fissura aos 0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84, 120.

- 33 CPs para as bactérias B1 e B2, sendo 24 CPs cilíndricos não armados e não fissurados para a avaliação da resistência mecânica aos 7, 28, 60 e 120 dias e 9 CPS prismáticos armados e fissurados para a avaliação da biorecuperação da fissura aos 0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84, 120.
- 30 CPs para as bactérias B3, B4 e B5, sendo 24 CPs cilíndricos não armados e não fissurados para a avaliação da resistência mecânica aos 7, 28, 60 e 120 dias e 6 CPS prismáticos armados e fissurados para a avaliação da biorecuperação da fissura aos 0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84, 120.

As argamassas foram produzidas em misturador mecânico 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.

Figura 9 – Produção e cura das amostras de argamassa



Fonte: Autora, 2021.

Foram produzidas amostras de argamassas usando moldes

prismáticos (4x4x16 cm) com armadura (4,8 mm de diâmetro e 15 cm de comprimento, posicionada a 1 cm da base), suportadas por espaçadores de pasta cimentícia e cilíndricos (5x10 cm) sem armadura (Figura 9). As amostras foram desmoldadas após 48 horas e armazenadas no laboratório em cura úmida envoltas por uma manta geotêxtil de drenagem de solo sob condições de temperatura e umidade não controladas. As amostras prismáticas de argamassa com armadura (usadas para análise da recuperação de fissuras) foram submetidas a cura úmida por 7 dias (idade de abertura das fissuras) e novamente submetidas a cura úmida por 120 dias. As amostras cilíndricas de argamassa sem armadura (usadas para a avaliação da resistência à compressão) foram submetidas a cura úmida por 120 dias.

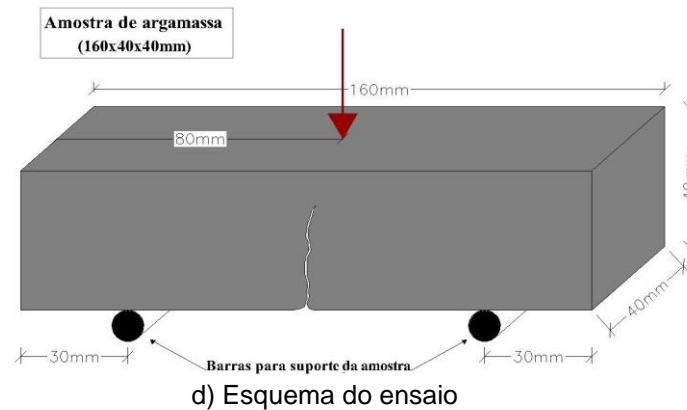
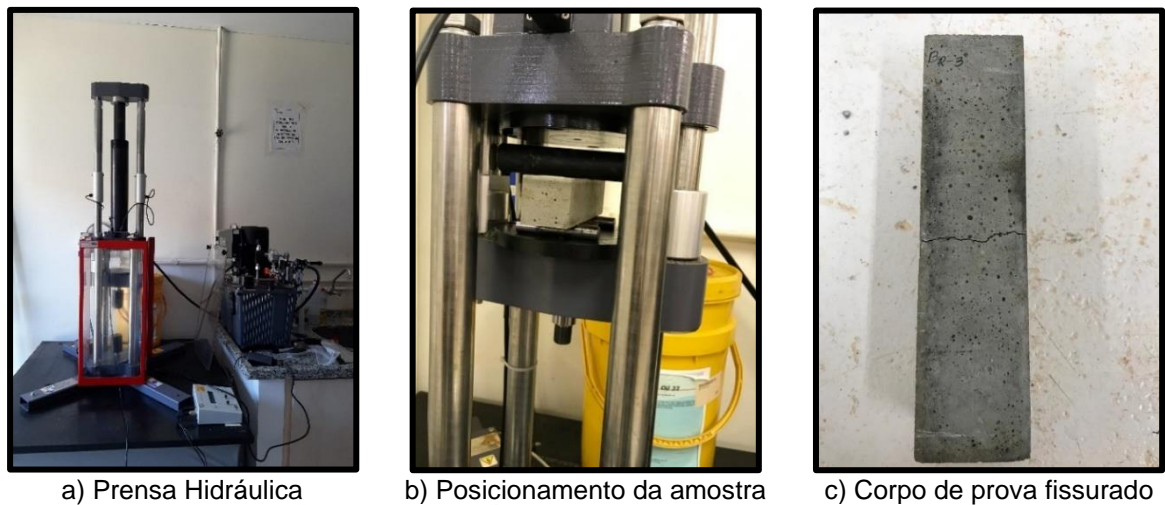
3.2.2 Procedimento de Fissuração

Para avaliar a capacidade de recuperação das fissuras dos materiais cimentícios realizada pelas bactérias foram produzidas nos corpos de provas prismáticos fissuras/aberturas não padronizadas/realistas.

As fissuras não padronizadas foram induzidas após 7 dias de cura úmida das amostras, por flexão de três pontos (Figura 10). Para tal, cada corpo de prova foi colocado na máquina de teste/prensa hidráulica, onde uma carga vertical foi aplicada lentamente no vão intermediário da amostra até o surgimento das primeiras fissuras. Com isso a aplicação da força foi cessada, medindo-se as dimensões de largura das fissuras conforme descrito por Wang et al. (2012) e Tziviloglou et al. (2016).

Os corpos de prova prismáticos fissurados e os cilíndricos não fissurados foram armazenados no laboratório em cura úmida envoltas por uma manta geotêxtil de drenagem de solo em ambiente de laboratório por 120 dias, sendo molhados semanalmente. Os corpos de provas prismáticos fissurados que demandam aplicação de solução com agentes biológicos e nutrientes, foram aspergidos com a mesma a cada 7 dias durante 120 dias.

Figura 10 – Ensaio de tração na flexão de 3 pontos



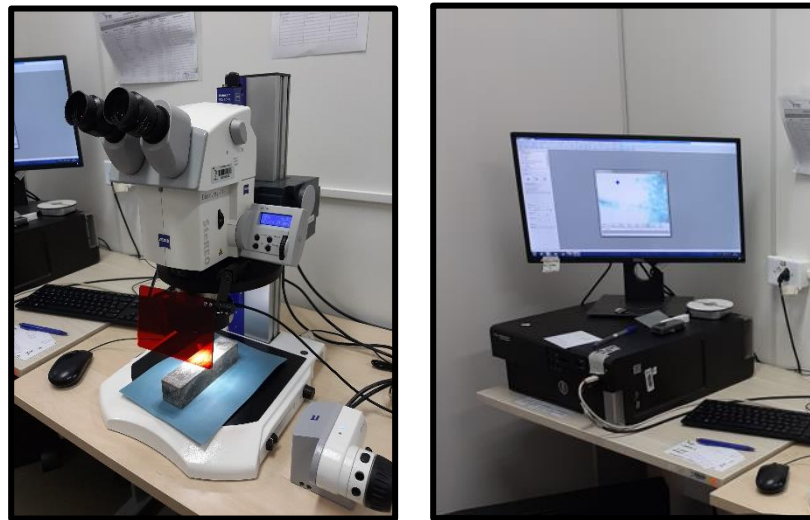
Fonte: Autora, 2021.

3.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DAS BACTÉRIAS NA BIOREPARAÇÃO DAS FISSURAS

3.3.1 Análise da Cicatrização

As fissuras produzidas nos CPs prismáticos foram monitoradas 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 (Figura 11). Com o auxílio do estereomicroscópio foi possível medir a largura da abertura das fissuras em diferentes pontos, identificando as larguras máximas e mínimas.

Figura 11 – Equipamentos usados na visualização das amostras



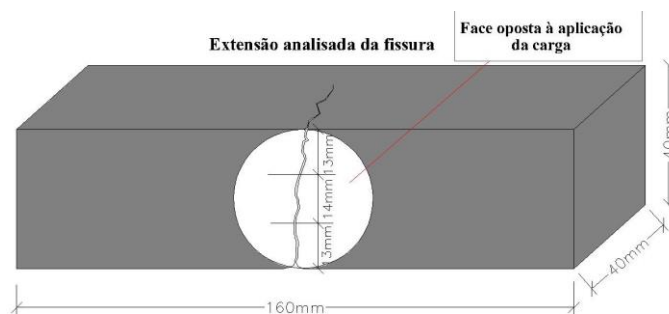
a) Estereomicroscópio

b) Tela de visualização

Fonte: Autora, 2021.

A análise visual da cicatrização das fissuras foi realizada com 3 amostras de cada grupo de argamassa (R, AM-B, ASP-B e AM-ASP-B), onde foram analisados 3 segmentos de aproximadamente 1,4 cm de comprimento de cada amostra de argamassa durante o período de cura, aos 0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84, 120 após fissuração (Figura 12).


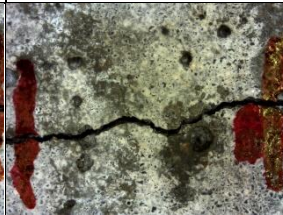
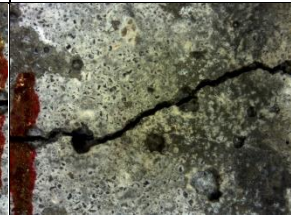

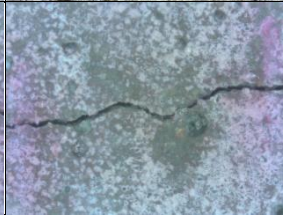

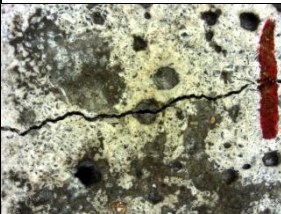

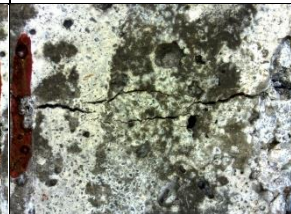



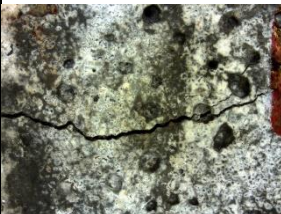
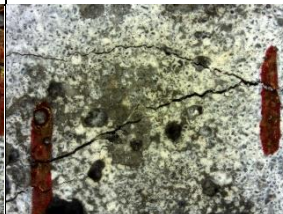
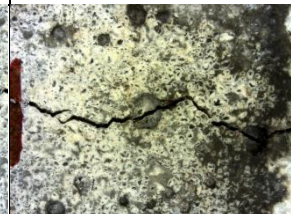



Figura 12 – Segmento da fissura analisado



Fonte: Autora, 2021.

No Quadro 2 encontra-se detalhado imagens da área analisada para cada uma das amostras de referência (1, 2 e 3) correspondente aos segmentos (A, B e C) da fissura, aos 0 e 28 dias de cura úmida.

Quadro 2 – Procedimento de análise da cicatrização

Área analisada - R			
Período de Análise	1 - A	1 - B	1 - C
0 dias			
28 dias			
Período de Análise	2 - A	2 - B	2 - C
0 dias			
28 dias			
Período de Análise	3 - A	3 - B	3 - C
0 dias			
28 dias			

Fonte: Autora, 2021.

Em seguida foi realizada a análise quantitativa das fissuras presentes nas amostras prismáticas (n=9) para cada grupo de argamassa (n=13), por meio do levantamento (em porcentagem) da quantidade de fissuras que apresentaram precipitação de cristais ao longo do tempo (0, 28, 56, 84 e 120 dias) de análise.

3.3.2 Análise da Presença do CaCO_3

Após 4 meses (120 dias) de cura, uma amostra do material precipitado presente na superfície das fissuras, dos corpos de prova prismático de cada grupo de argamassa ($n=13$), foi removida com o auxílio de espátulas *Iecron* e armazenada em microtubos *Eppendorf* (Figura 13). Para cada amostra ± 20 mg do material removido da fissura foi colocado no cadinho dentro do Analisador Termogravimétrico (modelo STA-6000) para posterior análise termogravimétrica (TGA). Durante a análise, o material precipitado da fissura foi exposto a temperaturas na faixa de 40 °C a 900 °C conforme descrito por Bundur; Kirisits; Ferron (2015) a uma taxa de 20 °C/min em uma atmosfera de nitrogênio a uma taxa de 50 mL/min conforme descrito por Van Tittelboom et al. (2010) e Stuckrath et al. (2014). A perda de massa e o fluxo de calor das amostras durante o processo de aquecimento foram registrados e demonstrados em gráficos de temperatura e fluxo de peso-calor e assim determinando a presença de carbonato de cálcio (CaCO_3) no mesmo.

Figura 13 – Instrumentos e amostras coletadas para a Análise Termogravimétrica (TGA)



a) Espátulas *Iecron*



b) *Eppendorf* com amostra

Fonte: Autora, 2021.

3.3.3 Análise da Composição do CaCO_3

A composição mineralógica do material precipitado formado sobre a superfície das fissuras dos corpos de provas prismáticos foi investigada por difração de raios-X após 4 meses (120 dias) de ensaio. O material precipitado presente na superfície das fissuras de cada corpo de prova prismático foi removido com o auxílio de espátulas *Iecron* e armazenada em microtubos *Eppendorf* produzindo 1 amostra

para cada grupo de argamassa (n=13). Para cada amostra ± 20 mg do material removido da fissura foi usado para análise no difratômetro (modelo Empréan) conforme descrito por Gupta; Kua; Pang (2018) onde os espectros de DRX foram obtidos através de um ânodo de cobre (40 kV e 20 mA) e varredura de 3 a 80° 2 θ conforme descrito por De Muynck et al. (2008b) e Xu; Wang (2018).

3.3.4 Análise Mecânica

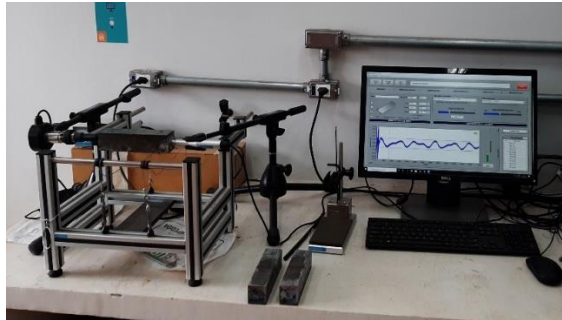
Os corpos de provas cilíndricos (não armados e sem fissuras) da mistura de referência (R) e com bactérias adicionadas na água da mistura (AM), foram submetidos ao teste de compressão em Prensa Hidráulica (modelo 2121-S) até ruptura aos 7, 14, 28 e 120 dias de cura. A resistência à compressão foi registrada e calculada, segundo a norma ABNT NBR 13279 (2005) em 6 amostras para cada grupo de argamassa (n=36).

Os corpos de provas prismáticos armados e fissurados, usados para o ensaio de análise da cicatrização ao longo do tempo, foram também submetidos ao ensaio não destrutivo de módulo de elasticidade dinâmico em equipamento e software Sonelastic® da marca ATCP Engenharia Física, na configuração longitudinal. O módulo de elasticidade foi registrado a partir da técnica de excitação por impulso, que consiste na resposta acústica da frequência de vibração natural de um material, após a excitação deste por um impacto manual ou automatizado (BAHR et al., 2013).

O ensaio foi conduzido aos 0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84 e 120 dias de cura úmida, sendo avaliadas três amostras de cada grupo (n=39) (referência (R), com bactérias adicionadas na água da mistura (AM), na água de aspersão (ASP) e em combinação de ambas (AM-ASP)).

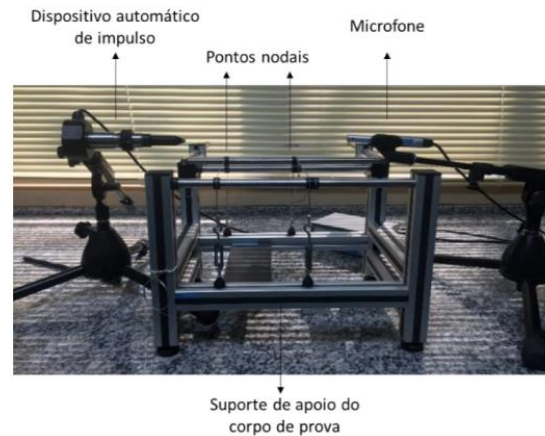
Para a realização do ensaio (Figura 14), primeiramente, foi inserido no software do equipamento a massa (em gramas) e as dimensões de comprimento e da área da seção transversal do corpo de prova (em mm). Em seguida, a amostra foi colocado no porta-amostra de maneira específica e apoiado em pontos nodais (Figura 15). Assim que posicionado corretamente, o microfone foi posto aproximadamente à 1 cm da face do corpo de prova para a análise da resposta acústica, e o pulsador automático foi posicionado à uma distância de 3 milímetros do local do impacto.

Figura 14 – Equipamento de ensaio do módulo de elasticidade dinâmico pela Técnica de Excitação por Impulso



Fonte: Autora (2021)

Figura 15 – Suporte de amostra com os dispositivos de captação de som e pulsação para afeição do MED pela Técnica de Excitação por Impulso



Fonte: (THOMAS, 2020)

As frequências de vibração acústicas produzidas pelo impacto realizado no CP em análise são capturadas por um microfone, as quais são processadas por um programa computacional baseado na transformada rápida de Fourier, em seguida o valor do módulo de elasticidade dinâmico é calculado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta etapa estão apresentados os resultados e discussões provenientes dos procedimentos experimentais conduzidos.

4.1 ISOLAMENTO E CRESCIMENTO BACTERIANO

Os procedimentos de isolamento e crescimento das bactérias teve como objetivo a busca por exemplares de bactérias presentes na Barragem de Itaipu e o crescimento das bactérias, isoladas dos corpos de prova de concreto, da parede interna da edificação e da Barragem de Itaipu, utilizadas para a seleção quanto ao potencial na precipitação de cristais.

4.1.1 Isolamento das Bactérias Retiradas da Barragem de Itaipu

O isolamento das bactérias, associadas ao concreto da Barragem de Itaipu, foi realizado com as diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) das amostras contendo biofilme (2, 4 e 5), coletadas nas cotas 56 m, 44 m e 144 m, em meio de cultivo NA (Ágar Nutriente), o qual disponibiliza uma rica fonte de nutrientes para a comunidade microbiana. Entretanto, foram inoculadas em placas de Petri as diluições 10^{-2} e 10^{-3} das amostras 2 e 4, e a amostra 5 sem diluição e com diluição 10^{-1} (duas repetições, A e B, para cada amostra).

Observa-se no Quadro 3 que houve uma diferença na abundância das bactérias isoladas nos meios de cultivo onde, a amostra 4 proporcionou maior quantidade de bactérias (total de 22) em relação a amostra 2 e 5 (total de 2, cada). Isso se deve, pois o local de coleta da amostra 4 apresentava um ambiente mais favorável ao crescimento de microrganismos, ou seja, a concentração de microrganismos em suspensão na água era maior ao encontro como relatado por (MADIGAN et al., 2016).

Quadro 3 – Quantidade de bactérias isoladas da barragem de Itaipu

Amostras	Diluição	Bactérias isoladas
2	10 ⁻² (A)	1
	10 ⁻² (B)	-
	10 ⁻³ (A)	1
	10 ⁻³ (B)	-
4	10 ⁻² (A)	13
	10 ⁻² (B)	6
	10 ⁻³ (A)	2
	10 ⁻³ (B)	1
5	Sem diluição (A)	1
	Sem diluição (B)	1
	10 ⁻¹ (A)	-
	10 ⁻¹ (B)	-

Fonte: Autora, 2021.

Dentre os artigos publicados até o momento que utilizam bactérias capazes de precipitar carbonato de cálcio para recuperação de fissuras em materiais a base de cimento, alguns autores utilizaram bactérias isoladas do solo (KRISHNAPRIYA; VENKATESH BABU; PRINCE ARULRAJ, 2015; VAN TITTELBOOM et al., 2010; WIKTOR; JONKERS, 2011) e outros adquiriram linhagens bacterianas de coleções de cultura microbiana (BHASKAR et al., 2017; NAIN et al., 2019; QIAN et al., 2016; WANG et al., 2018). Entretanto, a coleta e isolamento de bactérias associadas a materiais cimentícios foi reportado por Maheswaran et al. (2014), onde os autores isolaram bactérias de antigos prédios de concreto. Não foi encontrado relatos de isolamento de bactérias associadas à barragem de concreto para a mesma finalidade.

Levando em consideração o descrito, o presente trabalho pode ser considerado o primeiro a isolar bactérias de amostras coletadas em uma barragem de concreto, as quais podem apresentar a capacidade de precipitar carbonato de cálcio e dessa forma, podem ser aplicadas em materiais a base de cimento para recuperação de fissuras.

Nesta etapa foram isoladas 26 bactérias da Barragem de Itaipu, que foram submetidas à próxima etapa da pesquisa.

4.1.2 Crescimento das Bactérias Preservadas em Ultracongelamento

A reativação das linhagens preservadas em glicerol 20% a -80 °C foi

realizada com a bactéria “controle” e as bactérias “testes” (total de 50), cultivadas em placas de Petri contendo o meio de cultivo NA por 24 horas.

Após o cultivo foi observado o crescimento de 41 bactérias entre elas a bactéria “controle AP91” e 40 bactérias “testes”, (2 bactérias isoladas de corpos de prova de concreto “BC”, 13 bactérias isoladas da parede interna da edificação “BCAP” e 25 bactérias isoladas da Barragem de Itaipu ‘BBI’), conforme mostrado no Quadro 4.

Quadro 4 – Bactérias que apresentaram crescimento após reativação

Número	Nomenclatura	Número	Nomenclatura
1	AP91	11	BCAP 7
2	BC 1	12	BCAP 9
3	BCAP 1	13	BCAP 13
4	BCAP 2	14	BCAP 14
5	BCAP 6	15	BCAP 15
6	BCAP 8	16	BCAP 16
7	BCAP 10	17-18	BBI 2
8	BCAP 12	19-39	BBI 4
9	BC 3	40-41	BBI 5
10	BCAP 3		

Fonte: Autora, 2021.

Após a reativação, alguns isolados foram submetidos a técnica de coloração de Gram verificando que suas culturas bacterianas se apresentavam puras, ou seja, sendo observado a presença de apenas uma linhagem bacteriana.

Os isolados bacterianos (1 linhagem controle - AP91, 2 linhagens isoladas da edificação - BCAP 2 e BCAP 14 e 2 linhagens isoladas da Barragem - BBI 4-10⁻²-B(E) e BBI 4-10⁻²-B(F)) selecionadas quanto a capacidade de formação de cristais na superfície das colônias foram submetidos a técnica de coloração com o corante verde malaquita, conforme demonstrado no Quadro 5.

Quadro 5 – Técnica de coloração de verde malaquita

Nomenclatura	Formato	Produção de esporos
AP91	Bacilo	Sim
BCAP 2	Bacilo	Sim
BCAP 14	Bacilo	Sim
BBI 4-10 ⁻² -B(E)	Bacilo	Sim
BBI 4-10 ⁻² -B(F)	Bacilo	Sim

Fonte: Autora, 2021.

Em relação a técnica de coloração com o corante verde malaquita observa-se que todas as bactérias visualizadas por essa coloração, apresentaram formato de bacilo bem como a produção de esporos bacterianos. Estudos realizados por Schwantes-Cezario et al. (2018) demonstram que tais características permitem que as bactérias apresentem grande potencial na precipitação de carbonato de cálcio.

Nesta etapa das 50 bactérias utilizadas, apenas 41 apresentaram crescimento. Entre elas encontram-se a bactéria “controle” AP91, 2 bactérias isoladas de corpos de prova de concreto “BC”, 13 bactérias isoladas da parede interna da edificação “BCAP” e 25 bactérias isoladas da Barragem de Itaipu ‘BBI”, que foram submetidas à próxima etapa da pesquisa.

4.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRECIPITAÇÃO DE CRISTAIS

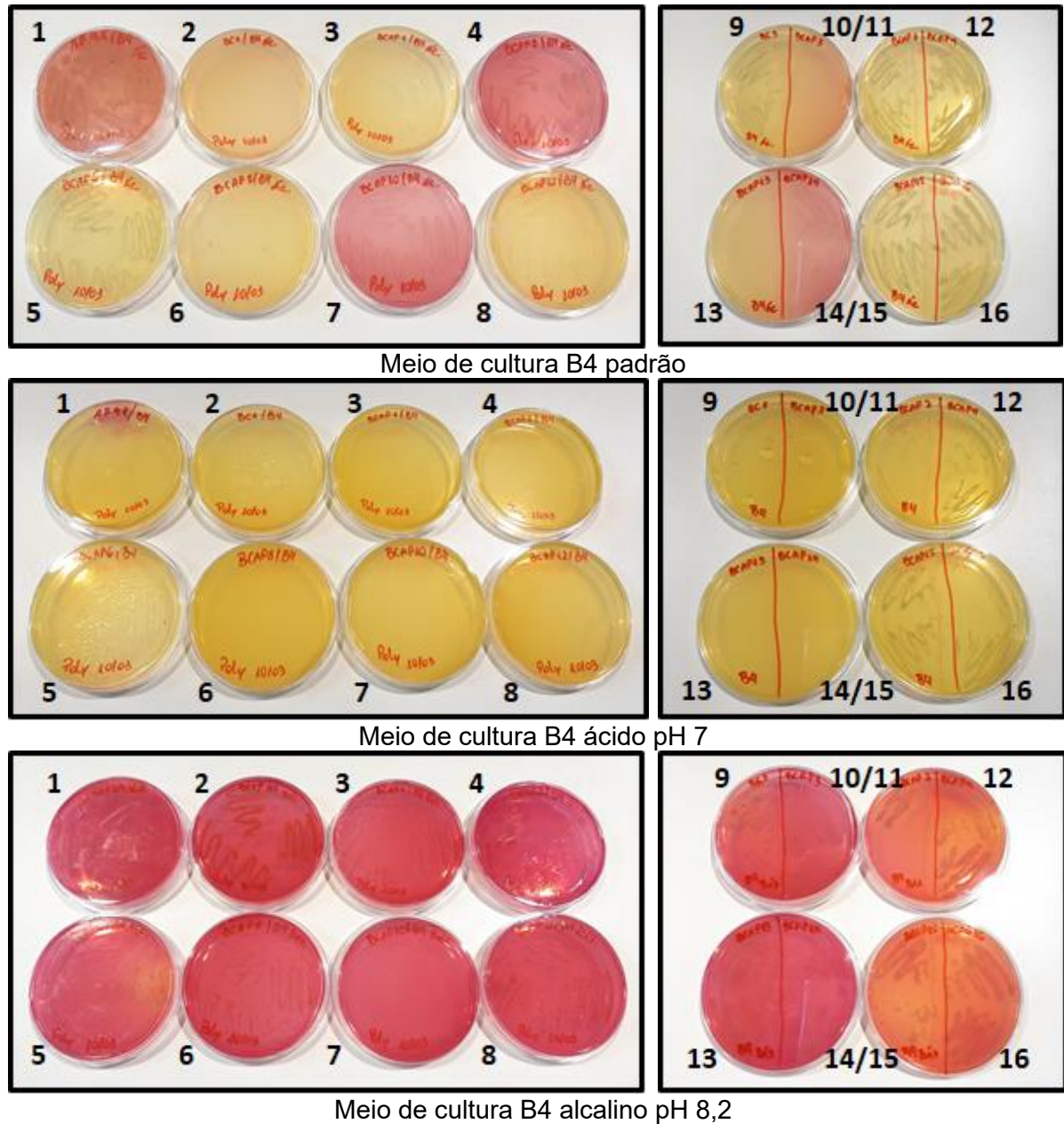
A avaliação do potencial de precipitação de cristais tem como objetivo selecionar bactérias potencialmente capazes de precipitar cristais, realizar a análise dos cristais, produzir e quantificar esporos bacterianos e por fim realizar a caracterização molecular das mesmas.

4.2.1 Análise do Potencial de Precipitação de Cristais

Os ensaios de seleção de bactérias potencialmente capazes de precipitar cristais foram realizados com a bactéria “controle” (*Bacillus subtilis* AP91) e as bactérias “testes”, as quais foram isoladas de amostras de corpos de prova de concreto, de uma edificação e da Barragem de Itaipu (total de 40), por meio do crescimento microbiano, alteração do pH e alteração da coloração dos meios de cultivo utilizados (meio padrão B4, meio ácido B4 tamponado a pH 7 e meio alcalino B4 tamponado a pH 8,2) por 7 dias.

Na Figura 16 pode-se visualizar o crescimento bacteriano e a mudança de cor do meio B4 padrão, de laranja claro para vermelho, em algumas placas referentes a bactéria “controle” na placa 1 e a 15 bactérias “testes” (2 bactérias isoladas de corpos de prova de concreto nas placas 2 e 9, e 13 bactérias isoladas da parede interna da edificação nas placas 3-8 e 10-16).

Figura 16 – Crescimento bacteriano e mudança de cor por alteração de pH



Fonte: Autora, 2021.

No meio de cultura B4 padrão somente as bactérias “testes” isoladas de corpos de prova de concreto e da parede da edificação presentes nas placas 2 e 10, respectivamente, não apresentaram crescimento bacteriano. Por outro lado, as bactérias “controle” presente na placa 1 e as bactérias “testes” isoladas da parede da edificação presentes nas placas 4, 7 e 14, apresentaram precipitação de cristais além do crescimento bacteriano. Isso foi percebido devido à alteração de cor existente no meio de cultura. Já no meio de cultura B4 ácido, cinco bactérias “testes” (uma isolada de corpos de prova de concreto presente na placa 9 e quatro isoladas da parede da

edificação presentes nas placas 11, 12, 15 e 16) apresentaram crescimento celular, porém nenhuma apresentou precipitação de cristais. Por fim, no meio de cultura B4 alcalino, quatorze bactérias (uma bactéria “controle” presente na placa 1, duas bactérias “testes” isoladas de corpos de prova de concreto presentes nas placas 2 e 9, e onze bactérias “testes” isoladas da parede da edificação presentes nas placas 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 15 e 16) apresentaram crescimento, porém apenas três bactérias presentes nas placas 1, 4 e 14 foram capazes de precipitar cristais.

No quadro 6 observa-se o resultado do crescimento bacteriano e da mudança de cor do meio B4 padrão, de laranja claro para vermelho, em algumas placas referentes as bactérias “testes” (25 bactérias isoladas da Barragem de Itaipu).

Quadro 6 – Crescimento bacteriano e mudança de cor por alteração de pH

Número	Nomenclatura	Meios B4		
		Padrão	Ácido	Alcalino
17	BBI 2-10 ⁻² -A	CB	-	CB
18	BBI 2-10 ⁻³ -A	CB; MC	-	CB; MC
19	BBI 4-10 ⁻² -A(A)	CB	-	CB; MC
20	BBI 4-10 ⁻² -A(B)	CB	-	CB
21	BBI 4-10 ⁻² -A(C)	-	-	-
22	BBI 4-10 ⁻² -A(D)	-	-	-
23	BBI 4-10 ⁻² -A(E)	-	-	-
24	BBI 4-10 ⁻² -A(F)	-	-	-
25	BBI 4-10 ⁻² -A(G)	-	-	-
26	BBI 4-10 ⁻² -A(H)	-	-	-
27	BBI 4-10 ⁻² -A(I)	-	-	-
28	BBI 4-10 ⁻² -A(K)	-	-	CB
29	BBI 4-10 ⁻² -A(L)	-	-	CB
30	BBI 4-10 ⁻² -A(M)	CB	-	CB
31	BBI 4-10 ⁻² -B(A)	-	-	-
32	BBI 4-10 ⁻² -B(B)	CB	-	CB
33	BBI 4-10 ⁻² -B(C)	-	-	-
34	BBI 4-10 ⁻² -B(D)	-	-	-
35	BBI 4-10 ⁻² -B(E)	CB; MC	-	CB; MC
36	BBI 4-10 ⁻² -B(F)	CB; MC	-	CB; MC
37	BBI 4-10 ⁻³ -A(A)	CB; MC	-	CB; MC
38	BBI 4-10 ⁻³ -A(B)	-	-	-
39	BBI 4-10 ⁻³ -B	-	-	-
40	BBI 5A	CB	-	CB
41	BBI 5B	-	-	CB

CB – Crescimento Bacteriano; MC – Mudança de Cor

Fonte: Autora, 2021.

No meio de cultura B4 padrão dez bactérias, presentes nas placas 17, 18, 19, 20, 30, 32, 35, 36, 37, 40, apresentaram crescimento bacteriano, entre essas

somente as bactérias presentes nas placas 18, 35, 36, 37 apresentaram precipitação de cristais. Isso foi percebido devido à alteração de cor existente no meio de cultura. Já no meio de cultura B4 ácido, nenhuma bactéria apresentou crescimento celular e precipitação de cristais. Por fim, no meio de cultura B4 alcalino, treze bactérias, presentes nas placas 17, 18, 19, 20, 28, 29, 30, 32, 35, 36, 37, 40, 41, apresentaram crescimento, porém apenas cinco bactérias, presentes nas placas 18, 19, 35, 36, 37, foram capazes de precipitar cristais.

Comparando os resultados obtidos, verificou-se que somente a bactéria “controle”, duas bactérias “testes” isoladas da parede da edificação e quatro bactérias “testes” isoladas da barragem de Itaipu apresentaram crescimento e precipitação de cristais tanto no meio padrão B4 como no meio básico B4. Demonstrando dessa forma que as bactérias isoladas das amostras de corpos de prova de concreto não apresentaram eficiência na precipitação de cristais. Já as bactérias isoladas da parede da edificação e da barragem de Itaipu apresentaram eficiência na precipitação de cristais de 15 e 16 %, respectivamente.

Segundo Marvasi; Davila-Vazquez; Martinez (2013) quando as bactérias são cultivadas em meio de cultura B4 padrão elas podem modificar o pH do meio induzindo a alcalinização e promovendo a precipitação de cristais, isso é observado pela mudança de cor do meio de cultura. Em meio de cultura B4 ácido elas não apresentam crescimento e a precipitação não ocorre, por outro lado, no meio de cultura B4 alcalino as bactérias apresentam crescimento, ocorrendo precipitação.

Estudos realizados por Schwantes-Cezario et al. (2017) relataram que as bactérias cultivadas no meio ácido B4 não apresentaram precipitação de carbonato de cálcio e alteração de cor, entretanto nos meios padrão e alcalino B4 apresentaram presença de cristais e variação do pH através da mudança de cor no meio padrão B4.

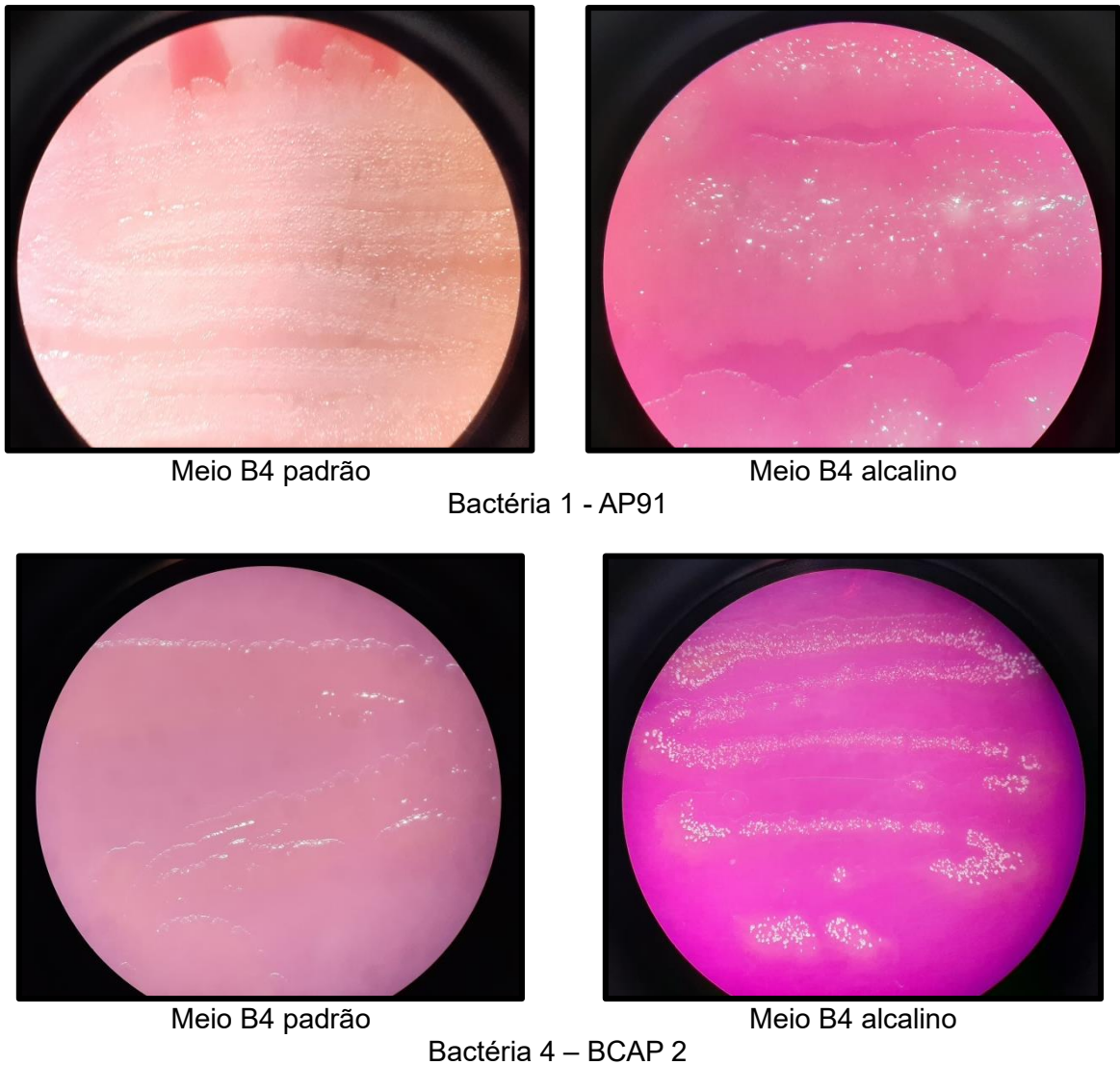
4.2.2 Análise dos Cristais Precipitados

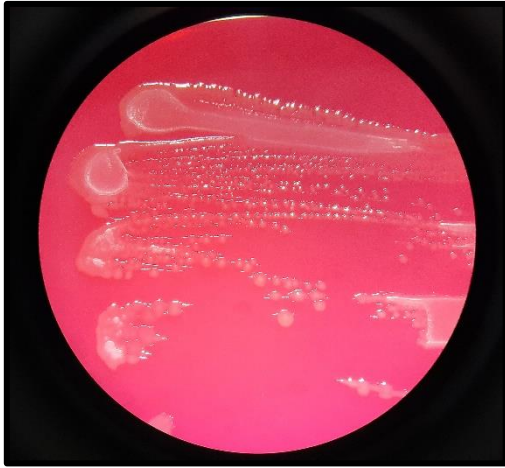
A verificação da precipitação de cristais foi realizada com os isolados presente na placa 1 referente a bactéria “controle” AP91, os isolados da parede da edificação presentes nas placas 4 e 14 referentes às bactérias “testes” BCAP 2 e BCAP 14, pois apresentaram crescimento e precipitação de cristais tanto no meio padrão B4 como no meio básico B4, e os isolados da barragem de Itaipu presentes

nas placas 35 e 36 referentes as bactérias “testes” BBI 4-10⁻²-B(E) e BBI 4-10⁻²-B(F), pois além de apresentarem crescimento apresentaram, visualmente, mais precipitação de cristais tanto no meio padrão B4 como no meio básico B4.

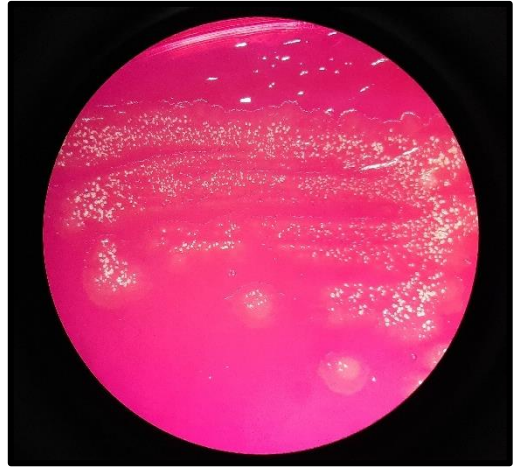
Com o auxílio do Estereomicroscópio acoplado a câmera do celular visualizou-se a presença de cristais na superfície das colônias referente às bactérias 1, 4, 14, 35 e 36, como mostrado na Figura 17.

Figura 17 – Cristais precipitados visualizados no Estereomicroscópio



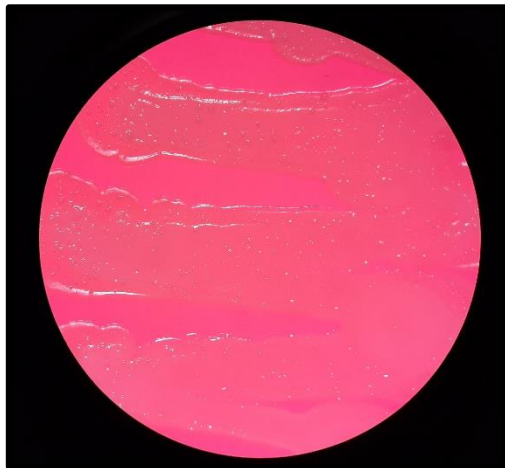


Meio B4 padrão

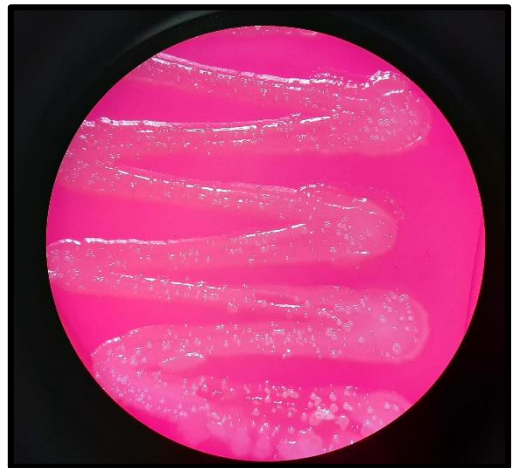


Meio B4 alcalino

Bactéria 14 – BCAP 14



Meio B4 padrão



Meio B4 alcalino

Bactéria 35 – BBI 4-10⁻²-B(E)



Meio B4 padrão



Meio B4 alcalino

Bactéria 36 – BBI 4-10⁻²-B(F)

Fonte: Autora, 2021.

Segundo os estudos desenvolvidos por Schwantes-Cezario et al.

(2017) os cristais precipitados pela bactéria *Bacillus subtilis* AP91 foram analisados a partir de imagens ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) acoplado com Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS), comprovando que os cristais precipitados correspondem ao carbonato de cálcio produzido pelas bactérias a partir do acetato de Ca presente no meio. Devido à complexidade e indisponibilidade do uso do equipamento MEV não foi possível sua utilização neste momento. Sendo assim, foi utilizado somente o Estereomicroscópio para analisar a precipitação dos cristais.

4.2.3 Quantificação dos Esporos Bacterianos

A quantificação dos esporos bacterianos foi realizada com as soluções salinas a 0,85% contendo os isolados 1 referente a bactéria “controle” AP91, os isolados da parede da edificação 4 e 14 referentes as bactérias “testes” BCAP 2 e BCAP 14, e os isolados da barragem de Itaipu 35 e 36 referentes as bactérias “testes” BBI 4-10⁻²-B(E) e BBI 4-10⁻²-B(F) após os procedimentos de cultivo das bactérias no meio MH e posterior esporulação.

Com o auxílio do espectrofotômetro com leitura a 600 nm obteve-se a absorbância das soluções contendo as bactérias 1, 4, 14, 35 e 36 e calculou-se a quantidade de esporos que elas conseguiram esporular, como mostra o Quadro 7.

Quadro 7 – Concentração de esporos mL⁻¹

Número	Nomenclatura	Absorbância	Absorbância média	Concentração de esporos mL ⁻¹
1	AP91	0,998	1,043	9,10 x 10 ⁷
		1,035		
		1,096		
4	BCAP 2	0,780	0,897	7,41 x 10 ⁷
		0,902		
		1,009		
14	BCAP 14	1,033	1,000	8,59 x 10 ⁷
		1,006		
		0,960		
35	4-10 ⁻² -B(E)	1,800	1,824	1,95 x 10 ⁸
		1,831		
		1,840		
36	4-10 ⁻² -B(F)	1,655	1,650	1,70 x 10 ⁸
		1,650		
		1,645		

Fonte: Autora, 2021.

Pode-se observar que as concentrações das soluções calculadas de 10^7 e 10^8 esporos mL^{-1} se encontram diferentes da adotada para o estudo que foi de 10^5 esporos mL^{-1} , sendo assim foi necessário realizar alguns cálculos de diluição (Quadro 8), multiplicando a concentração de esporos mL^{-1} pela quantidade de água total necessária para produzir os corpos de prova de argamassa (1000 mL) e assim para encontrar a quantidade de solução salina a 0,85% contendo esporos bactérias (mL) necessária para obter a concentração de 10^5 esporos mL^{-1} .

Quadro 8 – Diluição da concentração de esporos mL^{-1}

Nomenclatura	Concentração de esporos mL^{-1}	Concentração de esporos mL^{-1} obtido a partir da quantidade de solução bacteriana (mL) diluída em 1000 mL de água	
		1 mL	2 mL
AP91	$9,10 \times 10^7$	$9,10 \times 10^4$	$1,82 \times 10^5$
BCAP 2	$7,41 \times 10^7$	$7,41 \times 10^4$	$1,48 \times 10^5$
BCAP 14	$8,59 \times 10^7$	$8,59 \times 10^4$	$1,72 \times 10^5$
BBI 4- 10^{-2} -B(E)	$1,95 \times 10^8$	$1,95 \times 10^5$	$3,90 \times 10^5$
BBI 4- 10^{-2} -B(F)	$1,70 \times 10^8$	$1,70 \times 10^5$	$3,40 \times 10^5$

Fonte: Autora, 2021.

Observa-se que alguns valores de concentração obtidos, a partir da diluição da solução bacteriana em 1000 mL de água, apresentam a concentração de 10^4 e 10^5 esporos mL^{-1} , entretanto selecionou-se os valores mais próximos da concentração de 10^5 , ou seja, foi usado a quantidade de 2 mL para as bactérias AP1, BCAP 2 e BCAP 14 e de 1 mL para as bactérias BBI 4- 10^{-2} -B(E) e BBI 4- 10^{-2} -B(F).

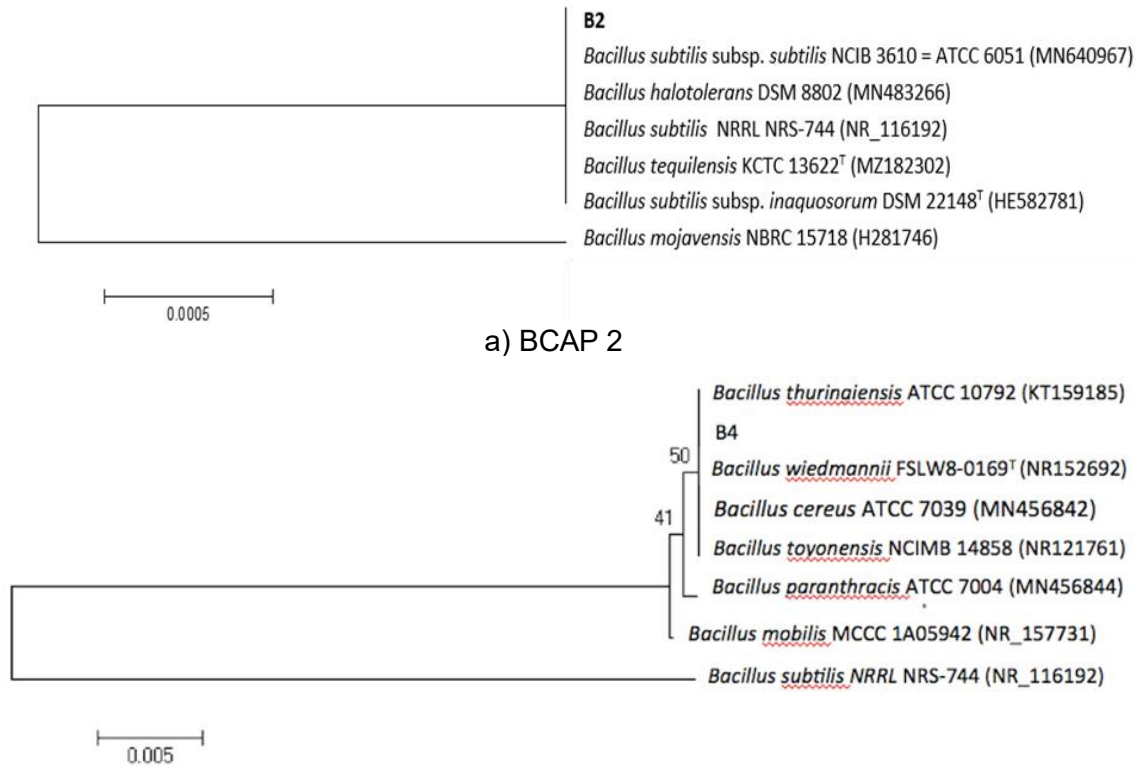
Na literatura existe divergência em relação à quantidade de bactérias empregadas nos materiais à base de cimento necessárias para a remediação de suas fissuras, mostrando uma variação entre 10^5 a 10^{10} bactérias mL^{-1} de água (ver Tabela 2). No entanto, estudos desenvolvidos por Krishnapriya; Vankatesh Bab; Prince Arulraj (2015) e Schwantes-Cezario et al. (2019, 2020) utilizaram a concentração de 10^5 bactérias mL^{-1} de água.

4.2.4 Caracterização Molecular das Bactérias

O sequenciamento genético do gene 16S rRNA pelo método Sanger, disponibilizado pela empresa DSMA – Desenvolvimento Sustentável e Monitoramento

Ambiental, foi realizado com as bactérias BCAP 2 e BBI 4-10⁻²-B(E), pois apresentaram maior capacidade de precipitação de CaCO₃ ao serem aplicadas nos corpos de prova de argamassa.

Figura 18 – Árvores filogenéticas baseada na sequência do gene 16S rRNA dos isolados potencialmente produtores de CaCO₃



*Valores de Bootstrap equivalentes a 1000 réplicas. Número de acesso no GenBank estão listados após os nomes das espécies.

Fonte: Autora, 2021.

As análises após comparação das sequências obtidas dos isolados com sequências do banco de dados BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool, nucleotide) do NCBI (National Center for Biotechnology Information), nos mostraram que o isolado BCAP 2 apresentou similaridade de 100% das sequências afiliadas as espécies *Bacillus velezensis*, *B. subtilis*, *B. halotolerans* e *B. tequilensis*. Da mesma forma, o isolado BBI 4-10⁻²-B(E), apresentou similaridade de sequência de 100% com as espécies *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. toyonensis*, *B. paranthracis* e *B. wiedmannii*.

Assim, a construção de árvores filogenéticas de cada isolado (Figura 18) foram estruturas para afiliar os isolados as sequências recuperadas do banco de

dados. Os resultados demonstraram que a afiliação taxonômica não pode confirmar com certeza em qual espécie os isolados foram afiliados e sim, foi possível afirmar que são isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, sendo o isolado BCAP 2 mais próximo ao grupo dos *B. subtilis* e o isolado BBI 4-10⁻²-B(E) mais próximo ao grupo dos *B. cereus*. A filogenia do gênero *Bacillus*, realizada apenas com o sequenciamento do gene 16S rRNA, ainda é muito limitada, devido à grande similaridade que o grupamento dos *Bacillus* apresenta em relações evolutivas. Assim, novas análises serão necessárias, incluindo o sequenciamento do gene codificante da enzima DNA girase, enzima atuante na replicação do DNA bacteriano, para melhor compreensão da afiliação taxonômica dos isolados potencialmente produtores de CaCO₃.

4.3 ANÁLISE DO POTENCIAL DE BIOREPARAÇÃO DAS FISSURAS


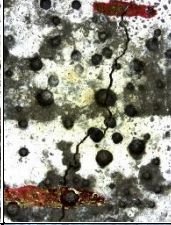
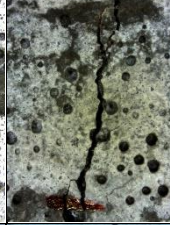
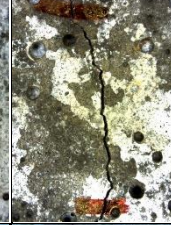
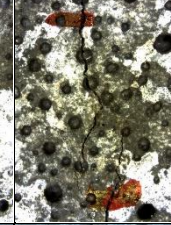
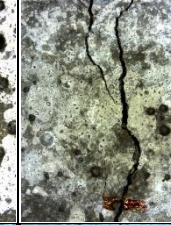

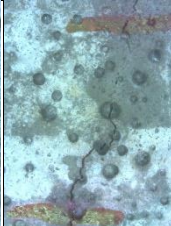

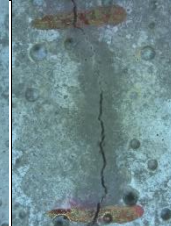
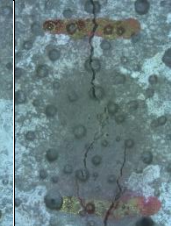
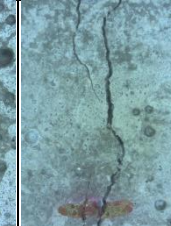




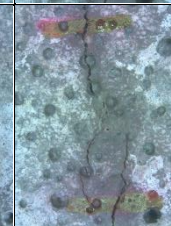
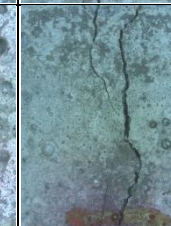

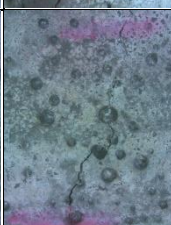
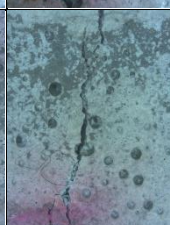

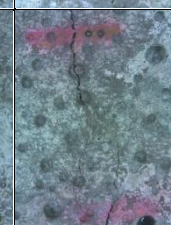
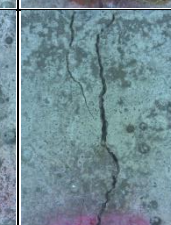


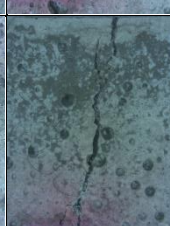
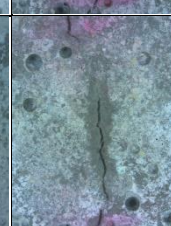
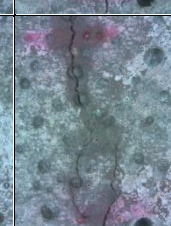


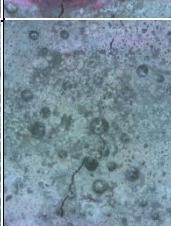
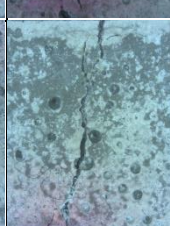
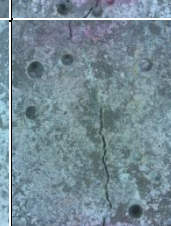
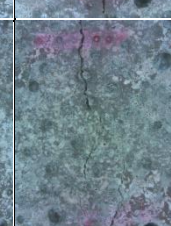


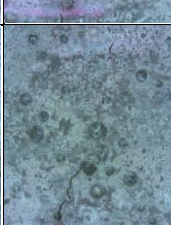

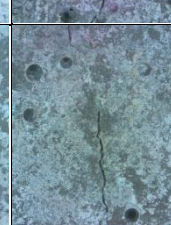
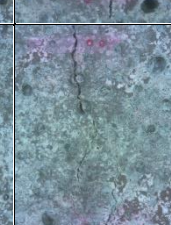

O procedimento de análise do potencial de bioreparação das fissuras teve como objetivo avaliar o potencial das bactérias selecionadas, quanto à precipitação de cristais, na biorecuperação de fissuras presentes no material cimentício, por meio da análise visual e quantitativa das fissuras, da presença e composição mineralógica do carbonato de cálcio (CaCO₃) precipitado na superfície das mesmas, e por fim sua influência nas propriedades mecânicas do material cimentício.


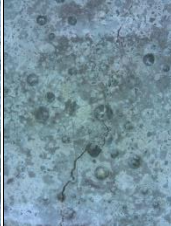
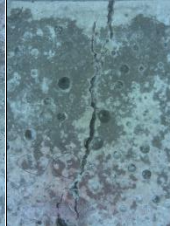

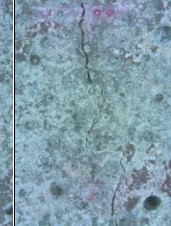
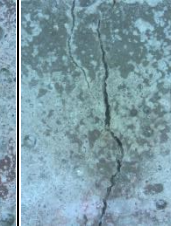

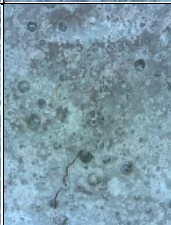
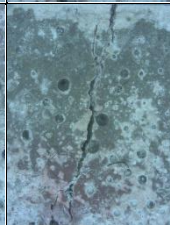


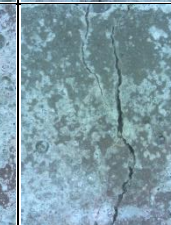
4.3.1 Análise Visual

A análise visual da cicatrização das fissuras foi realizada com os grupos de argamassa (R, AM-B, ASP-B e AM-ASP-B), por meio do qual foram geradas imagens com larguras máximas e mínimas de 3 amostras divididas em 3 segmentos (n = 9) para cada grupo de argamassa (n = 13) em cada dia de análise ao longo do período de cura (n = 9), totalizando dessa forma 1053 imagens. Levando em consideração a grande quantidade de imagens optou-se por selecionar as fissuras que apresentaram melhor cicatrização, como demonstrado nos Quadros 9, 10 e 11.

No Quadro 9 encontra-se imagens da precipitação de cristais nas fissuras das amostras de argamassas de referência (R) em comparação as argamassas com bactérias adicionadas na água da mistura (AM).

Quadro 9 – Análise da cicatrização das amostras com bactérias na água de mistura (AM)

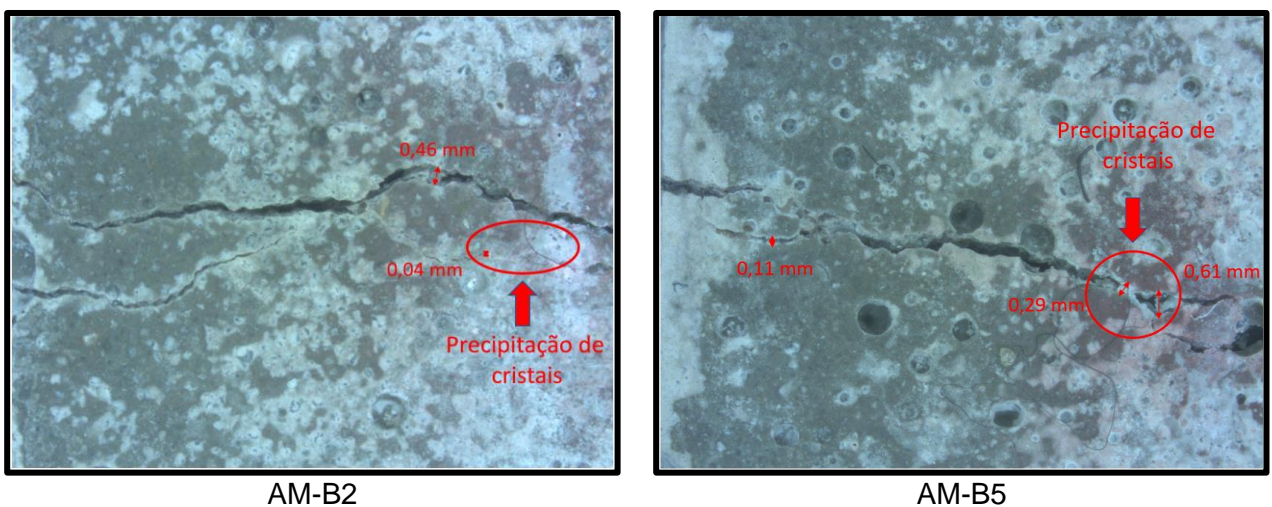
Grupos		R-2(B)	AM-B1-2(B)	AM-B2-2(A)	AM-B3-2(B)	AM-B4-2(B)	AM-B5-3(A)
Largura (mm)		Máx 0,19 Mín 0,06	Máx 0,15 Mín 0,07	Máx 0,61 Mín 0,11	Máx 0,18 Mín 0,05	Máx 0,20 Mín 0,07	Máx 0,46 Mín 0,04
Dias	0						
	7						
	14						
	21						
	28						
	42						
	56						

Grupos	R-2(B)	AM-B1-2(B)	AM-B2-2(A)	AM-B3-2(B)	AM-B4-2(B)	AM-B5-3(A)
Largura (mm)	Máx 0,19 Mín 0,06	Máx 0,15 Mín 0,07	Máx 0,61 Mín 0,11	Máx 0,18 Mín 0,05	Máx 0,20 Mín 0,07	Máx 0,46 Mín 0,04
84						
120						

Fonte: Autora, 2021.

Observa-se que tanto as amostras de argamassa de referência (R) quanto as amostras de argamassas com adição de bactéria na água de mistura (AM-B) apresentaram precipitação de cristais com fechamento de fissuras de forma contínua. Entretanto a amostra AM-B5 apresentou resultado inferior, isso pode estar relacionado pois a mesma apresenta valor de largura máxima de fissura de 0,46 mm, onde a precipitação ocorreu na região de fissura com valor de largura mínima de 0,04 mm. Já a amostra AM-B2 apresentou resultado superior, onde a precipitação ocorreu na região de fissura com valor intermediário de 0,29 mm, como demonstrado na Figura 19.

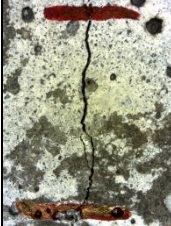












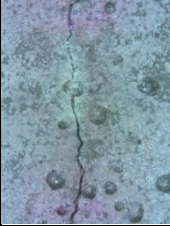

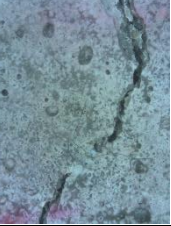
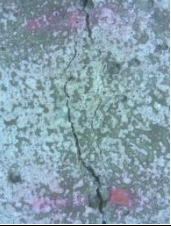


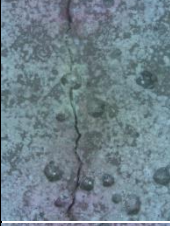

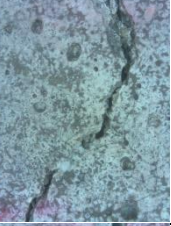





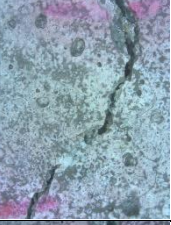
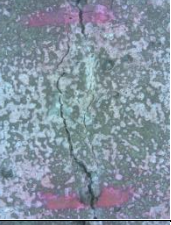



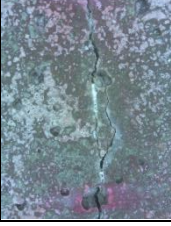



Figura 19 – Detalhamento da precipitação de cristais das amostras AM-B2 e AM-B5


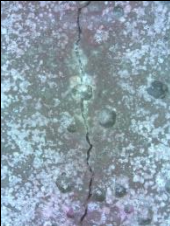





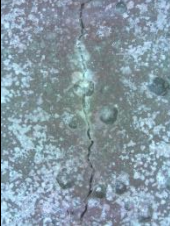





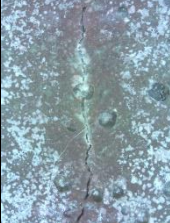






Fonte: Autora, 2021.

No Quadro 10 encontra-se imagens da precipitação de cristais nas fissuras das amostras de argamassas de referência (R) em comparação as argamassas com bactérias adicionadas na água de aspersão (ASP).

Quadro 10 – Análise da cicatrização das amostras com bactérias na água de aspersão (ASP)

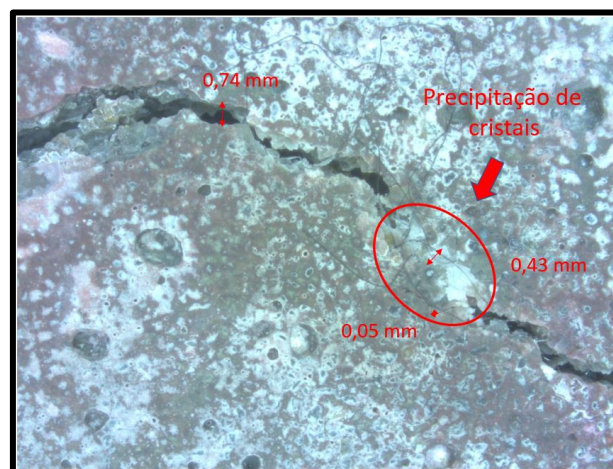
Grupos		R-2(B)	ASP-B1-3(B)	ASP-B2-3(B)	ASP-B3-3(B)	ASP-B4-1(B)	ASP-B5-2(B)
Largura (mm)		Máx 0,19 Mín 0,06	Máx 0,23 Mín 0,03	Máx 0,25 Mín 0,06	Máx 0,74 Mín 0,05	Máx 0,20 Mín 0,06	Máx 0,21 Mín 0,02
Dias	0						
	7						
	14						
	21						
	28						
	42						

Grupos	R-2(B)	ASP-B1-3(B)	ASP-B2-3(B)	ASP-B3-3(B)	ASP-B4-1(B)	ASP-B5-2(B)
Largura (mm)	Máx 0,19 Mín 0,06	Máx 0,23 Mín 0,03	Máx 0,25 Mín 0,06	Máx 0,74 Mín 0,05	Máx 0,20 Mín 0,06	Máx 0,21 Mín 0,02
56						
84						
120						

Fonte: Autora, 2021.

Nota-se que dentre as amostras de argamassa com bactéria adicionada na água de aspersão (ASP-B) todas apresentaram precipitação de cristais com fechamento de fissuras de forma contínua. No entanto a amostra da argamassa ASP-B3 apresentou resultado superior, onde a precipitação ocorreu na região de fissura com valor de largura intermediário de 0,43 mm, como demonstrado na Figura 20.





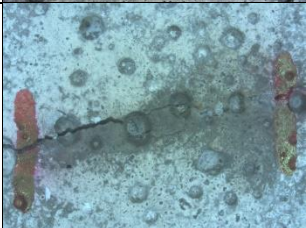
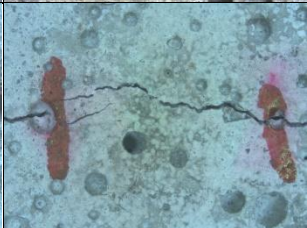

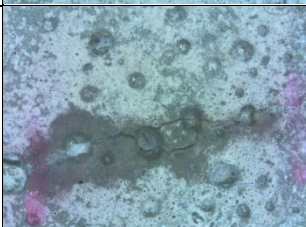


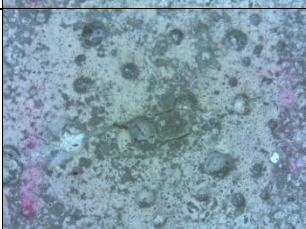
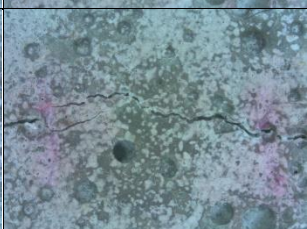
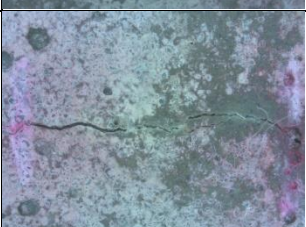


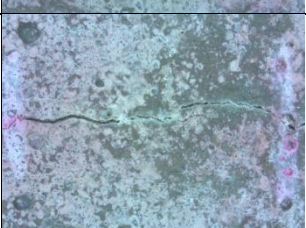
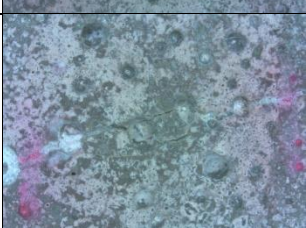

Figura 20 – Detalhamento da precipitação de cristais da amostra ASP-B3


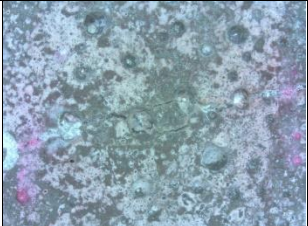


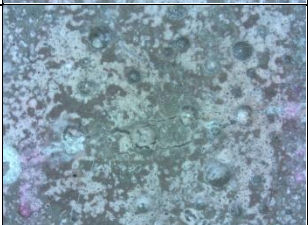
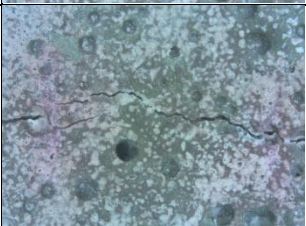

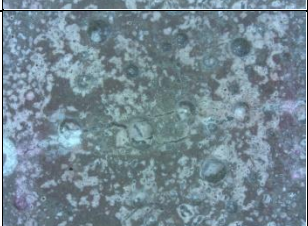
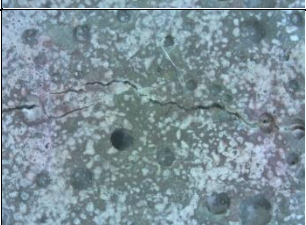


Fonte: Autora, 2021.

No Quadro 11 encontra-se imagens da precipitação de cristais nas fissuras das amostras de argamassas de referência (R) em comparação as argamassas com bactérias adicionadas na água de mistura e na água de aspersão (AM-ASP).

Quadro 11 – Análise da cicatrização das amostras com bactérias na água de mistura e na água de aspersão (AM-ASP)

Grupos		R-2(B)	AM-ASP-B1-1(B)	AM-ASP-B2-3(B)
Largura (mm)		Máx 0,19 Mín 0,06	Máx 0,24 Mín 0,13	Máx 0,19 Mín 0,08
Dias	0			
	7			
	14			
	21			
	28			
	42			

Grupos		R-2(B)	AM-ASP-B1-1(B)	AM-ASP-B2-3(B)
Largura (mm)		Máx 0,19 Mín 0,06	Máx 0,24 Mín 0,13	Máx 0,19 Mín 0,08
	56			
	84			
	120			

Fonte: Autora, 2021.

Ambas as amostras de argamassas com bactéria adicionada na água de mistura e na água de aspersão (AM-ASP-B) apresentaram precipitação de cristais com fechamento de fissuras de forma contínua, apresentando o melhor resultado a amostra da argamassa AM-ASP-B1 apesar de apresentar valor de largura máximo (0,24 mm) maior que a amostra de argamassa AM-ASP-B2 (0,19 mm).

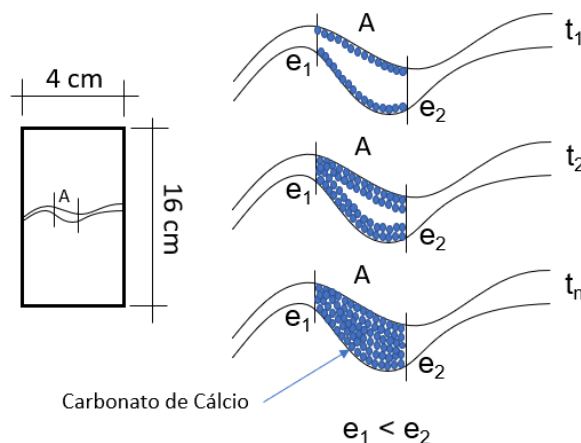
Como pode-se observar as fissuras apresentam espessuras diferentes, com valores que variam de 0,02 a 0,74 mm, isso se deve a dificuldade encontrada durante o ensaio de fissuração para produzir fissuras de tamanhos similares. Para minimizar as diferentes larguras entre as fissuras Hollmann (2020) recomenda 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 os tamanhos iniciais máximo e mínimo da largura da fissura teve influência no processo de biorecuperação das mesmas. Amostras com fissuras de pequenas aberturas (inferior a 0,43 mm) tiveram mais sucesso no processo de autocatrização, para o período avaliado. Na literatura os 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).

Neste estudo, observou-se que a precipitação de carbonatos é de difícil visualização, especialmente nas primeiras idades, onde a quantidade formada é pequena. Com o passar do tempo, mais cristais são formados e depositados nas paredes das fissuras (Figura 21), que vão se acumulando em direção à parede oposta da fissura. O encontro destes produtos é que faz o fechamento da fissura, sendo função da espessura da fissura. Fissuras de menor abertura (e_1) são seladas em tempos menores que de maior abertura (e_2).

Figura 21 – Processo esquemático de recuperação de fissura por biodeposição de carbonato e cálcio em matrizes cimentícias

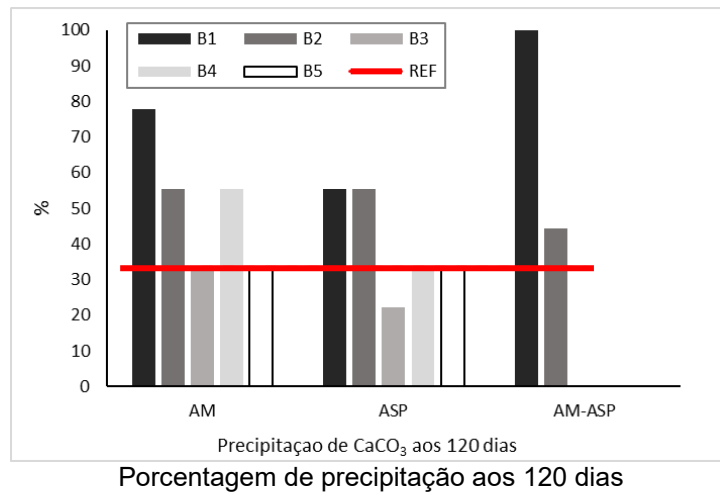
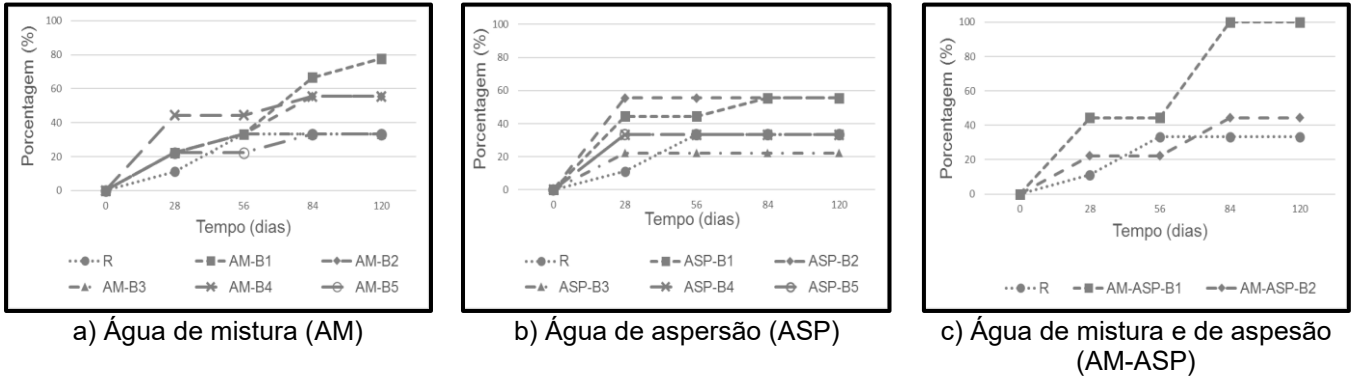


Fonte: Autora, 2021.

4.3.2 Análise Quantitativa

A partir das imagens obtidas da precipitação de cristais nas fissuras das amostras fissuras ($n=9$) para cada grupo de argamassa ($n=13$), realizou-se um levantamento (em porcentagem) da quantidade de fissuras que apresentaram ou não precipitação de cristais ao longo do tempo (0, 28, 56, 84 e 120 dias) de análise independente do fechamento completo da fissura, como demonstrado na Figura 22. As amostras de argamassas encontram-se separadas em relação as diferentes formas com que as bactérias foram adicionadas (AM, ASP e AM-ASP).

Figura 22 – Porcentagem de precipitação ao longo do tempo



Fonte: Autora, 2021.

Apesar de todos os grupos de argamassas (n=13) apresentarem precipitação de cristais, algumas combinações tiveram melhores resultados. Para o período de 120 dias, em relação à adição das bactérias na água de mistura (AM), a bactéria B1 apresentou o melhor resultado com 77,77%, em seguida as bactérias B2 e B4 com 55,55% e por fim as bactérias B3 e B5 com 33,33%. Já quanto a adição das bactérias na água de aspersão (ASP), as bactérias B1 e B2 apresentaram o melhor resultado de 55,55%, em seguida as bactérias B4 e B5 com 33,33% e por fim a bactéria B3 com 22,22%. Ao adicionar bactérias na água de mistura e na água de aspersão (AM-ASP), a bactéria B1 apresentou o melhor resultado de 100% e em seguida a bactéria B2 com 44,44%. Os resultados obtidos do processo de fechamento das fissuras por meio da precipitação de cristais pelas bactérias não apresentam um padrão homogêneo e sim aleatório, não sabendo ainda qual a causa de tal fenômeno.

Observou-se para as amostras AM e AM-ASP um desempenho crescente na autocicatrização após os 56 dias de cura, ou seja, a biorecuperação foi mais intensa a partir desta idade. Como no estudo foi utilizado o CP V – ARI,

provavelmente esse processo não é decorrente de reações pozolânicas uma vez que este cimento não contém esse tipo de material em sua fabricação. Estudos mais aprofundados devem ser conduzidos a fim de aclarar estas alterações. Sugerem-se estudos de longa duração (superiores a um ano) com análise ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) da matriz cimentícia.

Comparando a análise visual com a análise quantitativa, é importante frisar que na análise visual foram analisadas as fissuras com maior precipitação de carbonato de cálcio visual, o que indicou que nas amostras com bactérias adicionadas na água de aspersão (ASP) apresentaram melhores resultados. No entanto, na análise quantitativa, onde todas os segmentos das fissuras submetidas ao ensaio foram considerados mostrando o potencial global de recuperação, constatou que as amostras com bactérias adicionadas na água da mistura e na água de aspersão (AM-ASP), representadas pela bactéria B1, apresentaram os melhores resultados. Então deve-se ter muito cuidado com as análises dos trabalhos publicados em que são apresentados somente análise de imagens não indicando se a mesma foi realizada com a fissura que apresentou melhor fechamento, indicando resultados que podem ser falsos positivos.

4.3.3 Análise da Presença do CaCO₃

O ensaio de termogravimetria foi realizado aos 120 dias de cura, visando identificar e quantificar o CaCO₃ precipitado pelas bactérias na superfície das fissuras. Os resultados da curva termogravimétrica e da derivada da perda de massa das amostras de argamassa com ou sem bactérias estão apresentados na Figura 23.

Quando aquecidos os cristais de hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) se decompõem em óxido de cálcio (CaO) e água (H₂O), de acordo com a reação de desidroxilação da Eq. 16. Já os cristais de carbonato de cálcio (CaCO₃) se decompõem em óxido de cálcio (CaO) e dióxido de carbono (CO₂), de acordo com a reação de descarbonatação da Eq. 17.

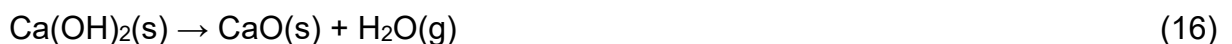
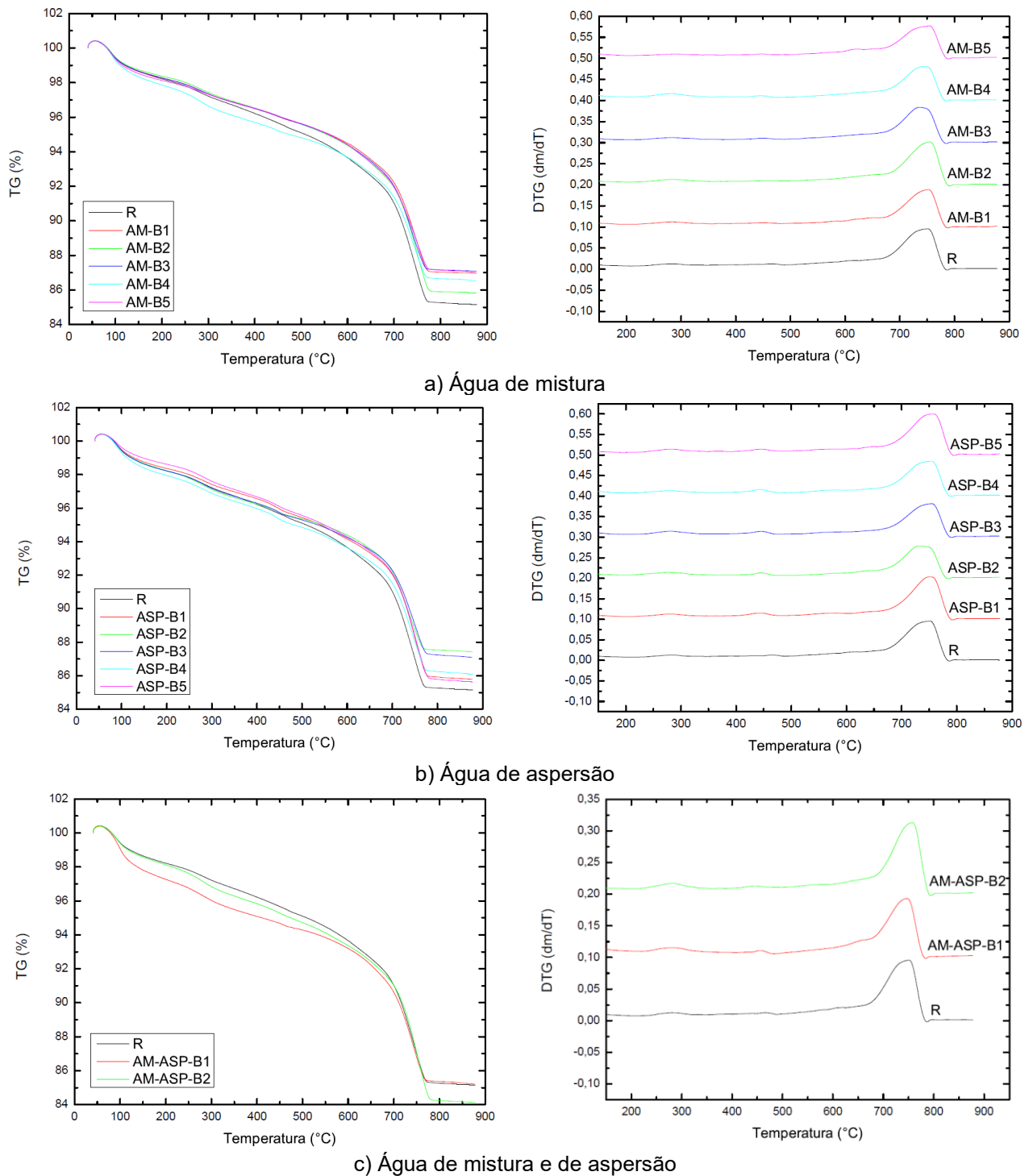


Figura 23 – Curva termogravimétrica e Derivada da perda de massa para amostras com bactérias adicionadas à a) água de mistura (AM) b) Água de aspersão (ASP) c) Água de mistura e de aspersão (AM-ASP)



Fonte: Autora, 2021.

A partir da análise da Figura 23 e do Quadro 12 verificou-se uma perda de massa em todas as amostras nas faixas de temperatura de 300 a 520 °C que correspondem a decomposição do hidróxido de cálcio conforme relado na literatura (NEVES JUNIOR, 2014; SCRIVENER, K.; SNELLINGS, R.; LOTHENBACH, 2016).

Além disso, verificou-se que a partir dos 500°C também houve uma perda de massa em todas as amostras, decorrente da decomposição do carbonato de cálcio. A literatura cita que a decomposição térmica deste composto nas faixas de temperatura de 500 a 800°C (STUCKRATH et al., 2014; VAN TITTELBOOM et al., 2010) e 700°C a 900°C (BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015).

Segundo os estudos realizados por Van Tittelboom et al (2010) e Stuckrath et al (2014) com amostras de concreto tratado com bactérias imobilizadas em sol-gel+cloreto de cálcio ou em sol-gel+acetato de cálcio e com amostras de argamassa com argila expansiva impregnada de bactérias, respectivamente, foi identificado perda de massa do material cimentício na faixa de temperatura de 500 a 800°C. Já os estudos realizados por Bundur; Kirisits; Ferron (2015) com pasta de cimento com bactéria relataram a perda de massa da pasta na faixa de temperatura de 700°C a 900°C.

Quadro 12 – Perda de massa das amostras de argamassa com bactérias

Grupos	Perda de massa (%) (300 a 520°C)	Percentual de Ca(OH)₂ (%)	Perda de massa (%) (500 a 900°C)	Percentual de CaCO₃ (%)
R	0,50	2,05	9,93	22,57
AM-B1	0,65	2,67	8,70	19,77
AM-B2	0,76	3,12	9,83	22,34
AM-B3	0,65	2,67	8,55	19,43
AM-B4	0,49	2,01	8,34	18,95
AM-B5	0,48	1,97	8,71	19,80
ASP-B1	0,97	3,99	9,70	22,05
ASP-B2	0,51	2,10	8,00	18,18
ASP-B3	0,76	3,12	8,22	18,68
ASP-B4	0,89	3,66	8,77	19,93
ASP-B5	1,01	4,15	9,92	22,55
AM-ASP-B1	0,42	1,73	9,00	20,45
AM-ASP-B2	0,84	3,45	10,66	24,23

Fonte: Autora, 2021.

Conforme o observado na Figura 23 e confirmado no Quadro 12, verificou-se que a amostra AM-ASP-B2 apresentou o maior percentual (24,23 %) de CaCO₃. Em seguida, tem-se as amostras R e ASP-B5, com valores de 22,57 e 22,55 %, respectivamente. A presença de elevados teores de CaCO₃ nas amostras de R, pode ser devido à contaminação sofrida, pois foi curada juntamente com as amostras com bactérias na água de mistura. Também, nesta amostra pode ter ocorrido autocicatrização autógena por meio da formação dos produtos de hidratação, onde as

partículas não hidratadas da matriz cimentícia reagem com a água que penetra na fissura formando o hidróxido de cálcio, e este pode reagir com o dióxido de carbono que penetra na fissura juntamente com a água e formar carbonato de cálcio (HUANG et al., 2016; JONKERS; SCHLANGEN, 2008a).

Outra possibilidade pode estar relacionada a dificuldade encontrada durante o processo de coleta dos cristais precipitados, realizado com o auxílio do estereomicroscópio e instrumento lecron, onde os mesmos são microscópicos. Dessa forma pode-se ter coletado material cimentício presente na superfície da fissura, que poderia estar carbonatado devido a ação atmosférica do CO_2 , juntamente com os cristais precipitados.

4.3.4 Análise da Composição do CaCO_3

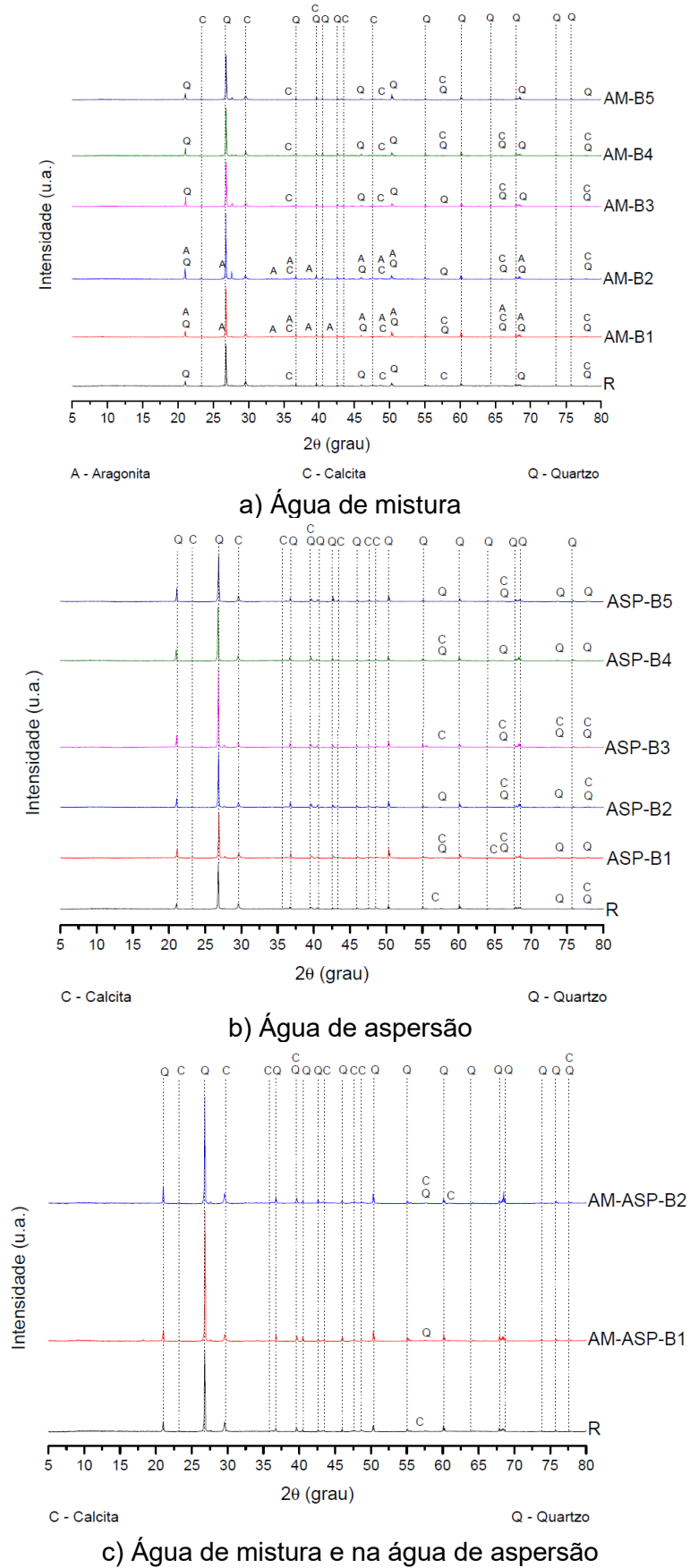
O ensaio de difração de raio X (DRX) foi realizado aos 120 dias de cura, visando identificar a composição mineralógica do material precipitado pelas bactérias sobre a superfície das fissuras dos corpos de provas prismáticos. A Figura 24 apresenta os espectros de DRX do material precipitado na superfície das fissuras presente nas amostras, demonstrando que em todas as amostras foi identificada em sua composição a presença de carbonato de cálcio, representado por duas de suas formas, calcita e aragonita. Segundo Rao et al (2013) os cristais de carbonato de cálcio podem ser encontrados em três formas morfológicas diferentes que são chamadas de calcita, aragonita e vaterita.

Analisando a Figura 24 (a) pode-se observar a presença de carbonato de cálcio em duas formas distintas, calcita e aragonita, e quartzo. A calcita está presente em todas as amostras, entretanto as amostras B1-AM e B4-AM apresentam maior quantidade de picos. A aragonita está presente somente nas amostras B1-AM e B2-AM, apresentando maior quantidade de picos a amostra B1-AM.

Observa-se na Figura 24 (b) a presença de carbonato de cálcio, na forma de calcita, e quartzo em todas as amostras. No entanto, na amostra B3-ASP está demonstrado maior quantidade de picos.

A partir na análise da Figura 24 (c) observa-se a presença de carbonato de cálcio, na forma de calcita, e quartzo em todas as amostras. Porém, na amostra B2-AM-ASP encontra-se maior quantidade de picos.

Figura 24 – Difratoograma do material precipitado na superfície das fissuras das amostras



Fonte: Autora, 2021.

Os resultados mostram que o material produzido nas fissuras é carbonato de cálcio e está em concordância com os resultados obtidos na análise termogravimétrica (figuras 23 a, b e c) e em estudos anteriores (GUPTA; KUA; PANG, 2018; KHALIQ; EHSAN, 2016; KIM et al., 2013; MONDAL; GHOSH, 2021; SCHWANTES-CEZARIO et al., 2020; ZHANG et al., 2017).

Os picos mais altos obtidos nos difratogramas citados acima com valores de 2θ de $\sim 30^\circ$ são bastante próximo do valor de 2θ de $29,455^\circ$ de calcita pura observado por Al-Jaroudi et al (2007).

Estudos anteriores afirmam que a morfologia da precipitação de carbonato de cálcio induzida por bactérias é altamente influenciada pela fonte do composto de cálcio. Por meio de observações MEV, eles provaram que a presença de cloreto de cálcio resultou em cristais romboédricos de calcita, enquanto a presença de acetato de cálcio resultou em cristais esféricos/granulares de vaterita (DE MUYNCK et al., 2008a; VAN TITTELBOOM et al., 2010) e a presença de lactato de cálcio resultou em cristais com morfologia de romboedros e agulhas de calcita e de aragonita, respectivamente (WIKTOR; JONKERS, 2011). Dessa forma, para comprovar a morfologia e a composição dos tipos de carbonato de cálcio encontrados neste estudo por meio do ensaio de difração de raios X (DRX), seria importante a realização do ensaio de imagens obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) acoplado a Espectroscopia por energia dispersiva (EDS).

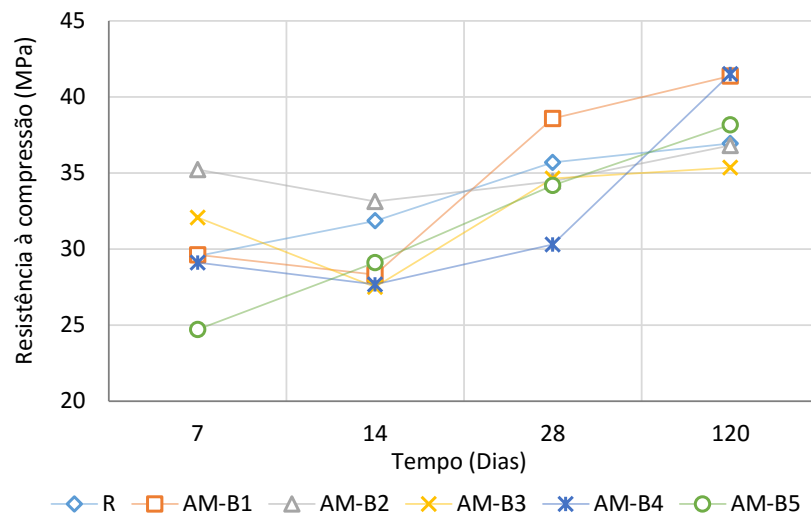
4.3.5 Influência nas Propriedades Mecânicas

O ensaio de compressão (Figura 25) foi realizado com os corpos de provas cilíndricos não armados e não fissurados submetidos a cura úmida com adição de bactéria na água de mistura e sem aspersão, 6 amostras para cada grupo de argamassa ($n=36$), para cada período de cura, 7, 14, 28 e 120 dias, visando identificar a influência da adição das bactérias e nutrientes (acetato de cálcio e extrato de levedura) na resistência à compressão das amostras de argamassa.

Como pode-se observar todas as amostras apresentaram ganho de resistência ao longo do tempo. Constatou que as amostras B1, B2, B3 e B4 apresentaram decréscimo na resistência aos 14 dias, fato que pode ser associado à execução do ensaio, uma vez que a resistência volta a crescer nas idades mais

avançadas. O aumento na resistência à compressão está de acordo com os resultados obtidos no estudo de autocicatrização realizado por Sierra-Beltran e Jonkers (2012) confirmando que o processo de autocicatrização realizado pelas bactérias na matriz cimentícia é uma das causas do aumento na resistência à compressão do material.

Figura 25 – Resistência à compressão axial em amostras não fissuradas



Fonte: Autora, 2021.

A incorporação de bactérias produtoras de CaCO_3 na água de mistura demonstrou influenciar no aumento na resistência à compressão das amostras de argamassa. Esta melhoria vista pela introdução direta de bactérias está em consonância com os resultados alcançados por (BHASKAR et al., 2017; GUPTA; KUA; PANG, 2018; KHALIQ; EHSAN, 2016; MONDAL et al., 2020; SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019).

Ao verificar os valores de resistência aos 7 dias somente a amostra B5 apresentou valor (24,71 MPa) inferior a amostra R (29,54 MPa), sendo identificada com resultado menos satisfatório e o melhor resultado foi observado na amostra B2 (35,23 MPa). Aos 14 dias somente a amostra B2 (33,12 MPa) apresentou valor superior a amostra R (31,85 MPa), considerada como o melhor resultado. Já aos 28 dias somente a amostra B1 (38,59 MPa) apresentou valor superior a amostra de referência (35,69 MPa), considerada como o melhor resultado. Por fim, aos 120 dias as amostras B2 (36,81 MPa) e B3 (35,36 MPa) apresentaram valores ligeiramente inferiores à de referência (36,94 MPa), com os melhores resultados apresentados

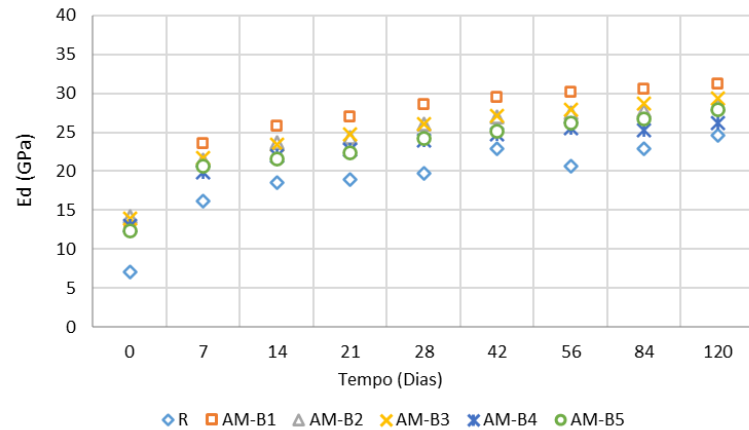
pelas amostras B1 (41,38 MPa) e B4 (41,51 MPa). Cabe destacar que estas variações da resistência à compressão podem ser decorrentes da adição dos nutrientes (acetato de cálcio e extrato de levedura) à matriz cimentícia. Como pode ser constatado na Tabela 11, a amostra de referência não continha nutrientes em sua mistura. Geralmente, a adição destes tende a reduzir a resistência à compressão, conforme verificado no estudo desenvolvido por Jonkers et al (2010) que ao adicionar separadamente os nutrientes (acetato de cálcio e extrato de levedura) à matriz cimentícia percebeu que ambas as amostras apresentaram valores de resistência inferiores a amostra controle. A fim de confirmar estas influências sugere-se a produção de amostras de referência com e sem nutrientes (sem adição de bactérias).

Visando identificar a influência da adição das bactérias e nutrientes (acetato de cálcio e extrato de levedura) na recuperação de fissuras em amostras de argamassa, fez-se o ensaio de módulo de elasticidade dinâmico empregando a técnica de excitação por impulso (TEI). Observa-se nas figuras 26 a, b e c que o módulo de elasticidade aumenta ao longo do tempo, com tendência a atenuação nas idades mais avançadas.

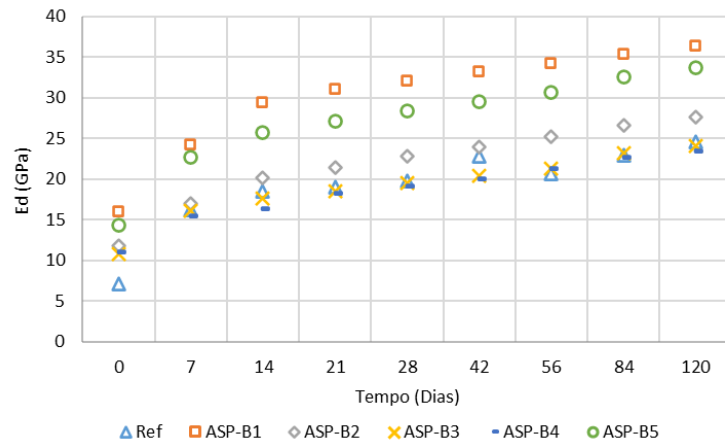
Observa-se que, independentemente da forma de adição das bactérias à mistura (AM, ASP e AM-ASP), a amostra de referência resultou em menor módulo de elasticidade dinâmico, excetuando-se as misturas com as bactérias B3 e B4 quando adicionadas via aspersão superficial da amostra (Figura 27). Tal fator pode estar relacionado a atuação das bactérias na matriz cimentícia, sobretudo no processo de recuperação das micro e macro fissuras das amostras. Segundo Neville (2016) as microfissuras presentes na matriz cimentícia reduzem o valor do módulo de elasticidade dinâmico.

Cabe ressaltar que o estado de umidade da amostra influencia no módulo de elasticidade dinâmico do concreto/argamassa. Segundo Kocáb et al. (2017), concretos curados em água possuem módulo de elasticidade dinâmico mais elevados em relação à concretos curados ao ar. Contudo, neste estudo, todas as amostras encontravam-se em iguais condições de umidade, com aspersão superficial de água semanal seguida da proteção por manta de drenagem, sendo eliminada esta influência. A presença de armadura nas amostras em estudo também pode ter influenciado a determinação desta variável. Porém, como todas as amostras (referência e com bactérias) tinham armaduras de mesmas dimensões, tipo e quantidade, acredita-se que estavam sobre iguais condições no momento do ensaio.

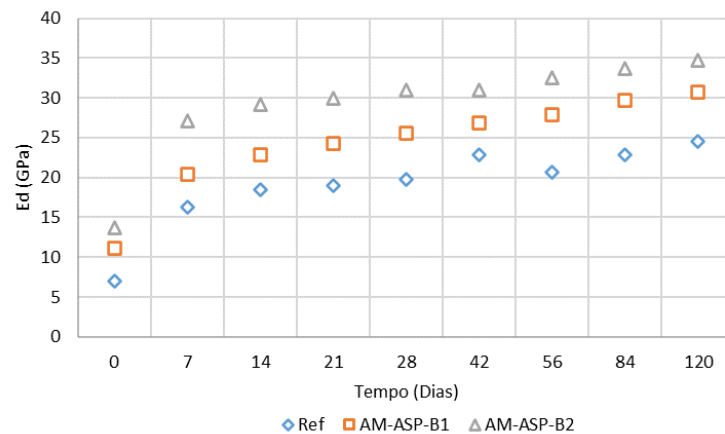
Figura 26 – Módulo de elasticidade dinâmico em amostras fissuradas com bactérias adicionadas a) à água de mistura b) por aspersão e c) água de mistura e aspersão



a) Água de mistura



a) Água de aspersão



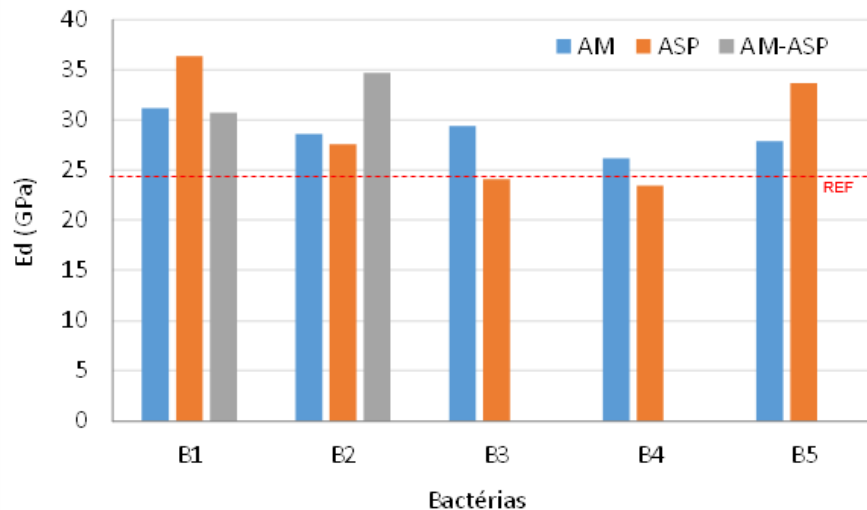
a) Água de mistura e na água de aspersão

Fonte: Autora, 2021.

Também, o menor módulo de elasticidade dinâmico das amostras de referência pode estar relacionado à ausência de nutrientes (presentes apenas nas amostras com bactérias), porém não foram realizados estudos que possam confirmar ou refutar essa influência. Ainda, até o momento, não foram encontrados estudos na

literatura com o emprego desta técnica, para análise comparativa de resultados.

Figura 27 – Módulo de elasticidade dinâmico em amostras fissuradas em função do método de adição de diferentes bactérias após 120 dias de hidratação



Fonte: Autora, 2021.

De modo geral, constatou-se que as amostras com adição de bactérias tiveram resultados mais satisfatórios em relação a amostra de referência, apresentando melhores desempenhos as amostras B1 quanto adicionadas na água de mistura (AM) e na água de aspersão (ASP) e as amostras B2 quanto adicionadas na combinação de ambas (AM-ASP). Pela análise do módulo de elasticidade dinâmico pela técnica de incitação por impulso (TEI), consta-se que o método de aspersão tem menor eficácia em relação à adição das bactérias à água de mistura, o que corrobora com os demais testes realizados neste estudo.

Tendo em vista que o ensaio de módulo de elasticidade dinâmico usando o TEI não é comumente empregado para avaliação da autocicatrização de matrizes cimentícias por agentes biológicos, sugere-se a realização de novos testes a fim de confirmar a eficácia do método neste tipo de avaliação. O ideal é avaliar amostras não armadas, integras e fissuradas, sob mesmas condições de umidade e temperatura. Este ensaio, por se não destrutivo e de fácil e rápida execução pode ser promissor em análises de autocicatrização de fissuras em matrizes a base de cimento.

Pelas diferentes técnicas de análises conduzidas neste estudo (imagem no estereomicroscópio, TGA, DRX), constatou-se que as matrizes com as bactérias B1, B2 e B4 (Quadro 13) tiveram desempenho superior às de referência no fechamento de microfissuras (menores que 0,43 mm) e nas propriedades mecânicas

(compressão e módulo de elasticidade dinâmico), indicando que estes agentes biológicos apresentam potencial de utilização em materiais cimentícios com função autocicatrizante.

Quadro 13 – Melhores resultados obtidos nos diferentes ensaios de análises

Grupos		Análise Visual	Análise Quantitativa	TGA	DRX	Resistência à Compressão	Módulo de Elasticidade Dinâmico	Soma
AM	B1	0	+2	-1	0	+2	+2	+5
	B2	+1	+1	0	0	0	+1	+3
	B3	0	0	-1	0	-1	+1	-1
	B4	0	+1	-1	0	+2	+1	+3
	B5	-2	0	-1	0	0	+1	-2
ASP	B1	0	+1	0	0	-	+2	+3
	B2	0	+1	-1	0	-	+1	+1
	B3	+2	-1	-1	0	-	0	0
	B4	0	0	-1	0	-	0	-1
	B5	0	0	0	0	-	+2	+2
AM-ASP	B1	0	+2	-1	0	-	+1	+2
	B2	0	+1	+1	0	-	+2	+4
Critério de análise de desempenho em relação a amostra de referência: Superior +2; Ligeiramente Superior +1; Similar 0; Ligeiramente Inferior -1; Inferior -2								

Fonte: Autora, 2021.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação à coleta e seleção de bactérias presentes em estruturas a base de cimento disponíveis na região da pesquisa com potencialidade para precipitar carbonato de cálcio, neste estudo foram identificadas quatro bactérias, sendo que duas bactérias (B2 e B3) foram isoladas da parede interna da edificação e as outras duas bactérias (B4 e B5) isoladas da barragem de Itaipu. A quinta bactéria do estudo (B1) foi obtida junto a Embrapa. A partir da construção de árvores filogenéticas dos isolados bacterianos B2 e B4, selecionados quanto ao potencial de precipitação de cristais, demonstrou-se que ambos pertencem ao gênero *Bacillus*, sendo o isolado B2 afiliado ao grupo dos *B. subtilis* e o isolado B4 afiliado ao grupo dos *B. cereus*.

Ao avaliar o potencial de recuperação de fissuras em material cimentício quando aplicados esporos bacterianos na água de mistura (AM), na água de aspersão (ASP) e na associação de ambas (AM-ASP), verificou-se que todas as combinações testadas apresentaram precipitação de carbonatos na superfície das fissuras ao longo do tempo. Na amostra de referência, sem agente biológico, também houve precipitação de carbonato de cálcio.

Durante a análise do fechamento das fissuras por meio das imagens obtidas ao estereomicroscópio, constatou-se que o melhor resultado foi demonstrado pelas amostras com bactérias aplicadas na água de aspersão (ASP). O melhor resultado foi apresentado pela amostra ASP-B3. Observou-se também que os tamanhos iniciais máximo e mínimo da largura da fissura tiveram influência no processo de biorecuperação das mesmas, onde amostras com fissuras de pequenas aberturas (inferior a 0,43 mm) tiveram mais sucesso no processo de autocicatrização. Notou-se ainda que o fechamento das fissuras ocorre da parede para o interior da fissura, sendo por esta razão que fissuras de maior dimensão não são facilmente seladas, pois demandam de mais tempo para esta ocorrência. Logo, acredita-se que em estudos de maior duração, resultados mais satisfatórios podem ser obtidos no que se refere à ação bacteriana para o preenchimento de fissuras de maior dimensão.

Neste estudo, também se verificou precipitação de carbonatos nas fissuras das amostras de referência, não sendo possível confirmar com os procedimentos metodológicos empregados se a recuperação das fissuras foi provocada pela cicatrização autônoma realizada pelas bactérias ou pela cicatrização

autógena decorrentes dos produtos de hidratação da matriz cimentícia.

Em relação à análise da porcentagem de precipitação de CaCO_3 ao longo do tempo, foi observado maior potencial de recuperação de fissuras nas amostras com adição de bactérias na água de mistura e na água de aspersão (AM-ASP). O melhor resultado foi apresentado pela amostra AM-ASP-B1. Demonstra-se que houve uma tendência de algumas bactérias apresentarem melhor resultados em relação ao percentual de fissuras fechadas, indicando que os estudos com bactérias podem ser promissores. Porém ainda é necessário melhorias no processo de adição destas à matriz cimentícia, levando em consideração a disponibilidade de nutrientes, oxigênio e umidade, o pH da matriz cimentícia, a temperatura do ambiente, entre outros.

Quanto a identificação da presença de carbonato de cálcio do material precipitado na superfície da fissura, verificou-se que tanto as amostras de referência (R) quanto as amostras com adição de bactérias (B1, B2, B3, B4 e B5) apresentaram perda de massa a partir de $500\text{ }^\circ\text{C}$ quando aplicadas nas três formas distintas, na água de mistura (AM), na água de aspersão (ASP) e na associação de ambas (AM-ASP), indicando assim a presença de carbonato de cálcio. O melhor resultado foi apresentado pela amostra AM-ASP-B2.

Analisando a composição do carbonato de cálcio precipitado na superfície das fissuras conclui-se que as amostras sem adição de bactéria (R) e as amostras com adição de bactéria (B1, B2, B3, B4 e B5) apresentaram carbonato de cálcio, na forma de calcita, como material de precipitação na superfície das fissuras quando aplicadas nas três formas distintas, na água de mistura (AM), na água de aspersão (ASP) e na associação de ambas (AM-ASP). E na forma de aragonita foi observado nas amostras B1-AM e B2-AM.

Em relação à influência das bactérias na resistência mecânica do material cimentício não fissurado, observou-se que as amostras com adição das bactérias B1 e B4 tiveram desempenho superior a amostra de referência. Contudo, tal efeito também pode estar relacionado à ação dos nutrientes adicionados às amostras com agentes biológicos.

Levando em consideração a análise do módulo de elasticidade pela técnica de excitação por impulso, observou-se que em todas as amostras (com e sem bactéria), houve um aumento dos valores ao longo do tempo, com tendência a atenuação em idades mais avançadas. Constatando-se que as amostras com adição de bactérias tiveram resultados mais satisfatórios em relação a amostra de referência,

apresentando melhores desempenhos as amostras com adição da bactéria B1 quanto adicionadas na água de aspersão (ASP). Este ensaio, por se não destrutivo e de fácil e rápida execução pode ser promissor em análises de autocicatrização de fissuras em matrizes a base de cimento.

As bactérias por serem os seres mais antigos do planeta Terra e serem resistentes a condições extremas do ambiente, podem em termos biológicos serem excelentes agentes na produção de biomateriais de reparos de estruturas quando incorporados à matriz cimentícia. No entanto, é necessário evoluir os estudos quanto as tecnologias e procedimentos, na forma de inclusão das bactérias na matriz cimentícia, na sua alimentação, nos processos de análises para então desenvolver produtos realmente eficazes para recuperação de fissuras em estruturas reais.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como os trabalhos desenvolvidos sobre a temática da presente pesquisa são recentes no Brasil, muitas das variáveis que interferem na precipitação de CaCO_3 ainda não são claras e precisam ser estudadas, sugerem-se os seguintes estudos futuros:

- Analisar comparativamente a utilização de outras concentrações de esporos bacterianos, além da 10^5 esporos mL^{-1} .
- Avaliar a utilização de outras fontes de nutriente e de Cálcio, além do extrato de levedura e acetado de cálcio.
- Selecionar e prospectar bactérias, presentes em cavernas, capazes de produzir elevados teores de carbonato de cálcio.
- Produzir corpos de provas de argamassa não armados e neste produzir espessuras semelhantes de fissura, de modo a facilitar a análise comparativa da eficiência de cicatrização por meio de ensaios físicos, mecânicos e de imagem.
- Explorar as potencialidades da técnica de excitação por impulso na determinação dos módulos elásticos e de amortecimento para avaliação do processo de autocicatrização em matrizes cimentícias.
- Analisar a ação das bactérias no processo de autocicatrização de fissuras quando aplicadas em estruturas reais a base de cimento, levando em consideração as condições ambientais reais.

REFERÊNCIAS

- ABDULKAREEM, M. et al. Evaluation of effects of multi-varied atmospheric curing conditions on compressive strength of bacterial (*Bacillus subtilis*) cement mortar. **Construction and Building Materials**, v. 218, p. 1–7, 2019.
- ACHAL, V. et al. Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by *Sporosarcina pasteurii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 433–438, 2009.
- ACHAL, V. et al. Biomineralization for sustainable construction - A review of processes and applications. **Earth-Science Reviews**, v. 148, p. 1–17, 2015.
- ACHAL, V.; MUKERJEE, A.; REDDY, M. S. Biogenic treatment improves the durability and remediates the cracks of concrete structures. **Construction and Building Materials**, v. 48, p. 1–5, 2013.
- ACHAL, V.; MUKHERJEE, A.; REDDY, M. S. Biocalcification by *Sporosarcina pasteurii* using corn steep liquor as the nutrient source. **Industrial Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 170–174, 2010.
- ACHAL, V.; MUKHERJEE, A.; REDDY, M. S. Effect of calcifying bacteria on permeation properties of concrete structures. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1229–1234, 2011.
- AL-JAROUDI, S. S. et al. Use of X-ray powder diffraction for quantitative analysis of carbonate rock reservoir samples. **Powder Technology**, v. 175, n. 3, p. 115–121, 2007.
- ALAZHARI, M. et al. Application of expanded perlite encapsulated bacteria and growth media for self-healing concrete. **Construction and Building Materials**, v. 160, p. 610–619, 2018.
- ANNEZA, L. H. et al. Identification of bacteria and the effect on compressive strength of concrete. **MATEC Web of Conferences**, v. 47, p. 1–5, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR NM 248: Agregados - Determinação da composição granulométrica. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**, p. 1–6, 2003.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR NM 45: Agregados – Determinação da massa unitária e do volume de vazios. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**, p. 1–18, 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 9575 - Impermeabilização - Seleção e projeto. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**, p. 1–14, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. 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**, p.

1–9, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15575-2 - Edificações habitacionais - Desempenho Parte 2: Requisitos para os sistemas estruturais.

Associação Brasileira de Normas Técnicas, p. 1–31, 2013.

BAHR, O. et al. Young's modulus and Poisson's ratio of concrete at high temperatures: Experimental investigations. **Materials and Design**, v. 45, p. 421–429, 2013.

BANG, S. S. et al. Microbial calcite, a bio-based smart nanomaterial in concrete remediation. **International Journal of Smart and Nano Materials**, v. 1, n. 1, p. 28–39, 2010.

BANG, S. S.; GALINAT, J. K.; RAMAKRISHNAN, V. Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 4–5, p. 404–409, 2001.

BANG, S. S.; RAMAKRISHNAN, V. Microbiologically-enhanced crack remediation (MECR). **Proceedings of the international symposium on industrial application of microbial genomes**, p. 1–13, 2001.

BERGH, J. M. VAN DER et al. Preliminary approach to bio-based surface healing of structural repair cement mortars. **Construction and Building Materials**, v. 248, p. 1–10, 2020.

BHASKAR, S. et al. Effect of self-healing on strength and durability of zeolite-immobilized bacterial cementitious mortar composites. **Cement and Concrete Composites**, v. 82, p. 23–33, 2017.

BRANDÃO, A. **Qualidade e Durabilidade das estruturas de Concreto Armado - Aspectos de projecto**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 1998.

BRASILEIRO, L. L.; MATOS, J. M. E. Revisão bibliográfica: reutilização de resíduos da construção e demolição na indústria da construção civil. **Cerâmica**, v. 61, n. 358, p. 178–189, 2015.

BRITISH STANDARD. BS 1199: Specifications for Building sands from natural sources. **British Standard**, n. May, p. 1–13, 1976.

BUNDUR, Z. B.; KIRISITS, M. J.; FERRON, R. D. Biomineralized cement-based materials: Impact of inoculating vegetative bacterial cells on hydration and strength. **Cement and Concrete Research**, v. 67, p. 237–245, 2015.

CAETANO, G. **Modelos Preditivos de Dano Aplicados a Estruturas de Concreto Atacadas por Reação Álcali-silica: Uma Revisão Sistemática da Literatura**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2017.

CHEN, H.; QIAN, C.; HUANG, H. Self-healing cementitious materials based on bacteria and nutrients immobilized respectively. **Construction and Building Materials**, v. 126, p. 297–303, 2016.

CHUNXIANG, Q. et al. Corrosion protection of cement-based building materials by surface deposition of CaCO₃ by *Bacillus pasteurii*. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 4, p. 1273–1280, 2009.

ÇULLU, M.; ARSLAN, M. The effects of chemical attacks on physical and mechanical properties of concrete produced under cold weather conditions. **Construction and Building Materials**, v. 57, p. 53–60, 2014.

CWALINA, B. Biodeterioration of concrete. **Architecture Civil Engineering Environment**, n. 4, p. 133–140, 2008.

DE BELIE, N.; DE MUYNCK, W. 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**, v. 2, p. 291–292, 2009.

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, W. et al. Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. **Construction and Building Materials**, v. 22, p. 875–885, 2008a.

DE MUYNCK, W. et al. Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. **Cement and Concrete Research**, v. 38, n. 7, p. 1005–1014, 2008b.

DE MUYNCK, W.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 2, p. 118–136, 2010.

DHAMI, N. K.; REDDY, S. M.; MUKHERJEE, A. Biofilm and Microbial Applications in Biomineralized Concrete. **Advanced Topics in Biomineralization**, n. 2, p. 137- 164, 2012.

DHAMI, N. K.; SUDHAKARA REDDY, M.; MUKHERJEE, A. Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritages. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 304, p. 1–12, 2014.

DRUGĂ, B. et al. Interaction between wastewater microorganisms and geopolymer or cementitious materials: Biofilm characterization and deterioration characteristics of mortars. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 134, p. 58–67, 2018.

FAVATO, R. A. et al. Isolation of Bacteria Associated to Concrete: Future Studies on the Production of Bioconcrete. **Anais do III Congresso Paranaense de Microbiologia**, v. 2, 2018.

FIGUEIREDO, E. P.; MEIRA, G. Boletín Técnico: Corrosão das armaduras de concreto. **Asociación Latinoamericana de Control de Calidad, Patología y Recuperación de la Construcción - ALCONPAT**, p. 1–28, 2013.

GAMBALE, P. G. **Estudo Do Calor De Hidratação Do Concreto Massa E Contribuição Ao Cálculo Térmico E À Previsão De Fissuras De Retração**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2017.

GHELLERE, P. et al. 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). **XVI CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE PATOLOGIA DA CONSTRUÇÃO e XVIII CONGRESSO DE CONTROLE DE QUALIDADE NA CONSTRUÇÃO**, p. 2278–2292, 2021.

GHOSH, S. K. **Self-healing Materials: Fundamentals, Design Strategies, and Applications**. Weinheim, Alemanha: WILEY-VCH, 2009.

GÓIS, T. DE S. **Estudo da Corrosão do Concreto Microbiologicamente Induzida (CCMI) em Estruturas de Saneamento**. [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2016.

GOLLAPUDI, U. K. et al. A new method for controlling leaching through permeable channels. **Chemosphere**, v. 30, n. 4, p. 695–705, 1995.

GUPTA, S. G.; RATHI, C.; KAPUR, S. Biologically Induced Self Healing Concrete: A Futuristic Solution for Crack Repair. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 85–89, 2013.

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

GUPTA, S.; PANG, S. D.; KUA, H. W. Autonomous healing in concrete by bio-based healing agents – A review. **Construction and Building Materials**, v. 146, p. 419–428, 2017.

HELMI, F. M. et al. Calcium carbonate precipitation induced by ureolytic bacteria *Bacillus licheniformis*. **Ecological Engineering**, v. 90, p. 367–371, 2016.

HOLLMANN, C. F. **Avaliação da influência de aditivos cristalizantes na resistência à penetração de íons cloreto em concretos fissurados**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2020.

HUANG, H. et al. Self-healing in cementitious materials: Materials, methods and service conditions. **Materials and Design**, v. 92, p. 499–511, 2016.

HUNG, C. C.; SU, Y. F.; SU, Y. M. Mechanical properties and self-healing evaluation of strain-hardening cementitious composites with high volumes of hybrid pozzolan materials. **Composites Part B: Engineering**, v. 133, p. 15–25, 2018.

JANG, I. et al. Effects of spray-dried co-cultured bacteria on cement mortar. **Construction and Building Materials**, v. 243, p. 1–9, 2020.

JONKERS, H. M. et al. Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 2, p. 230–235, 2010.

JONKERS, H. M.; SCHLANGEN, E. Self-healing of cracked concrete: A bacterial approach. **Proceedings of the 6th International Conference on Fracture Mechanics of Concrete and Concrete Structures**, v. 3, p. 1821–1826, 2007.

JONKERS, H. M.; SCHLANGEN, E. Development of a bacteria-based self healing concrete. **Proceedings of the International FIB Symposium 2008 - Tailor Made Concrete Structures: New Solutions for our Society**, p. 425–430, 2008a.

JONKERS, H. M.; SCHLANGEN, E. A two component bacteria-based self-healing concrete. **Concrete Repair, Rehabilitation and Retrofitting II**, p. 119–120, 2008b.

KHALIQ, W.; EHSAN, M. B. Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques. **Construction and Building Materials**, v. 102, p. 349–357, 2016.

KIM, H. K. et al. Microbially mediated calcium carbonate precipitation on normal and lightweight concrete. **Construction and Building Materials**, v. 38, p. 1073–1082, 2013.

KOCÁB, D. et al. Experimental analysis of the influence of concrete curing on the development of its elastic modulus over time. **Materials and Technology**, v. 51, n. 4, p. 657–665, 2017.

KRISHNAPRIYA, S.; VENKATESH BABU, D. L.; PRINCE ARULRAJ, G. Isolation and identification of bacteria to improve the strength of concrete. **Microbiological Research**, p. 1–37, 2015.

KUA, H. W. et al. Biochar-immobilized bacteria and superabsorbent polymers enable self-healing of fiber-reinforced concrete after multiple damage cycles. **Cement and Concrete Composites**, v. 100, p. 35–52, 2019.

LEE, H. X. D.; WONG, H. S.; BUENFELD, N. R. Self-sealing of cracks in concrete using superabsorbent polymers. **Cement and Concrete Research**, v. 79, p. 194–208, 2016.

LINDGÅRD, J. et al. Alkali-silica reactions (ASR): Literature review on parameters influencing laboratory performance testing. **Cement and Concrete Research**, v. 42, n. 2, p. 223–243, 2012.

LORS, C. et al. Microbiologically induced calcium carbonate precipitation to repair microcracks remaining after autogenous healing of mortars. **Construction and Building Materials**, v. 141, p. 461–469, 2017.

LUCAS, S. S. et al. Study of self-healing properties in concrete with bacteria encapsulated in expanded clay. **Science and Technology of Materials**, v. 30, p. 93–98, 2018.

LUO, M.; QIAN, C. X.; LI, R. Y. Factors affecting crack repairing capacity of bacteria-based self-healing concrete. **Construction and Building Materials**, v. 87, p. 1–7, 2015.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAGESWARI, M. E.; KUMAR, R. P.; RAGHUNANDHAN, M. E. . Improvement of concrete durability by bacterial mineral precipitation. **International Journal of Latest Engineering Research and Applications (IJLERA)**, v. 2, n. 3, p. 84–97, 2017.

MAHESWARAN, S. et al. Strength improvement studies using new type wild strain bacillus cereus on cement mortar. **Current Science**, v. 106, n. 1, p. 50–57, 2014.

MARVASI, M. et al. Physiological requirements for carbonate precipitation during biofilm development of *Bacillus subtilis* mutant Massimiliano. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Ecology**, v. 71, p. 341–350, 2010.

MARVASI, M.; DAVILA-VAZQUEZ, Y. C.; MARTINEZ, L. C. Laboratory Activity to Effectively Teach Introductory Geomicrobiology Concepts to Non-Geology Majors. **Journal of Microbiology e Biology Education**, v. 14, n. 2, p. 206–212, 2013.

MENEZES, C. B. A. et al. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 466–482, 2010.

MIHASHI, H.; NISHIWAKI, T. Development of engineered self-healing and self-repairing concrete-state-of-the-art report. **Journal of Advanced Concrete Technology**, v. 10, n. 5, p. 170–184, 2012.

MONDAL, S. et al. *Deinococcus radiodurans*: A novel bacterium for crack remediation of concrete with special applicability to low-temperature conditions. **Cement and Concrete Composites**, v. 108, p. 1–11, 2020.

MONDAL, S.; GHOSH, A. (DEY). Spore-forming *Bacillus subtilis* vis-à-vis non-spore-forming *Deinococcus radiodurans*, a novel bacterium for self-healing of concrete structures: A comparative study. **Construction and Building Materials**, v. 266, p. 1–10, 2021.

MUHAMMAD, N. Z. 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.

NAIN, N. et al. Enhancement in strength parameters of concrete by application of *Bacillus* bacteria. **Construction and Building Materials**, v. 202, p. 904–908, 2019.

NEELADHARAN, C. et al. Application of *Bacillus Subtilis* Bacteria for Improving Properties and Healing of Cracks in Concrete. **International Journal of Advanced Research Trends in Engineering and Technology (IJARTET)**, v. 5, n. 5, p. 118–123, 2018.

NEVES JUNIOR, A. **Captura de CO₂ em materiais cimentícios através de carbonatação acelerada**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

NEVILLE, A. M. **Propriedades do Concreto**. 5^o ed. Porto Alegre: Bookman, 2016.

NGUYEN, T. H. et al. Bacterial self-healing of concrete and durability assessment. **Cement and Concrete Composites**, v. 104, p. 1–15, 2019.

NOEIAGHAEI, T. et al. Biogenic deterioration of concrete and its mitigation technologies. **Construction and Building Materials**, v. 149, p. 575–586, 2017.

PACHECO-TORGAL, F.; LABRINCHA, J. A. Biotech cementitious materials: Some aspects of an innovative approach for concrete with enhanced durability. **Construction and Building Materials**, v. 40, p. 1136–1141, 2013.

PACHECO, F. **Análise da eficácia dos mecanismos de autocicatrização do concreto**. [s.l.] Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 2020.

PARKER, C. The Function of Thiobacillus Concretivorus (Nov. Spec.) in the Corrosion of Concrete Exposed to Atmospheres Containing Hydrogen Sulphide. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 23, n. 2, p. 91–98, 1945.

PEI, R. et al. Use of bacterial cell walls to improve the mechanical performance of concrete. **Cement and Concrete Composites**, v. 39, p. 122–130, 2013.

PICHELIN, A. et al. Sustainability, transfer and containment properties of concrete subject to delayed ettringite formation (DEF). **Cement and Concrete Composites**, v. 113, n. March, 2020.

QIAN, C. et al. Bio-mineralization on cement-based materials consuming CO₂ from atmosphere. **Construction and Building Materials**, v. 106, p. 126–132, 2016.

RAJCAKOWSKA, M. et al. Autogenous Self-Healing: A Better Solution for Concrete. **Journal of Materials in Civil Engineering**, v. 31, n. 9, p. 1–19, 2019.

RAMACHANDRAN, S. K.; RAMAKRISHNAN, V.; BANG, S. S. Remediation of concrete using micro-organisms. **ACI Materials Journal**, v. 98, n. 1, p. 3–9, 2001.

RAO, M. V. S. et al. Bioengineered Concrete - A sustainable self-healing construction material. **Research Journal of Engineering Sciences**, v. 2, n. 6, p. 45–51, 2013.

RECENA, F. A. P. **Retração do concreto**. 1. ed. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2014.

RUAN, S. et al. The use of microbial induced carbonate precipitation in healing cracks within reactive magnesia cement-based blends. **Cement and Concrete Research**, v. 115, p. 176–188, 2019.

SAHMARAN, M.; YILDIRIM, G.; ERDEM, T. K. Self-healing capability of cementitious composites incorporating different supplementary cementitious materials. **Cement and Concrete Composites**, v. 35, n. 1, p. 89–101, 1 jan. 2013.

SANCHEZ-SILVA, M.; ROSOWSKY, D. V. Biodeterioration of Construction Materials: State of the Art and Future Challenges. **Journal of Materials in Civil Engineering**, v. 20, n. 5, p. 352–365, 2008.

SANTOS, B. S.; ALBUQUERQUE, D. D. M.; RIBEIRO, D. V. Effect of the addition of metakaolin on the carbonation of Portland cement concretes. **Revista IBRACON de Estruturas e Materiais**, v. 13, n. 1, p. 1–18, fev. 2020.

SCHWANTES-CEZARIO, N. et al. Bioprecipitation of calcium carbonate induced by *Bacillus subtilis* isolated in Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 123, p. 200–205, 2017.

SCHWANTES-CEZARIO, N. et al. Crack filling in concrete by addition of *Bacillus subtilis* spores – Preliminary study. **DYNA (Colombia)**, v. 85, n. 205, p. 132–139, 2018.

SCHWANTES-CEZARIO, N. et al. Effects of *Bacillus subtilis* biocementation on the mechanical properties of mortars. **Revista IBRACON de Estruturas e Materiais**, v. 12, n. 1, p. 31–38, 2019.

SCHWANTES-CEZARIO, N. et al. Mortars with the addition of bacterial spores: Evaluation of porosity using different test methods. **Journal of Building Engineering**, v. 30, p. 1–10, 2020.

SCHWANTES-CEZARIO, N.; NOGUEIRA, G. S. F.; TORALLES, B. M. Biocimentação de compósitos cimentícios mediante adição de esporos de *Bacillus subtilis* AP91. **Revista de Engenharia Civil IMED**, v. 4, n. 2, p. 142–158, 2017.

SCRIVENER, K.; SNELLINGS, R.; LOTHENBACH, B. **A Practical Guide to Microstructural Analysis of Cementitious Materials**. 1st. ed. Boca Raton, FL. Broken Sound Parkway NW: CRC Press, 2016.

SEIFAN, M.; SAMANI, A. K.; BERENJIAN, A. Bioconcrete: next generation of self-healing concrete. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2591–2602, 2016.

SIDIQ, A.; GRAVINA, R.; GIUSTOZZI, F. Is concrete healing really efficient? A review. **Construction and Building Materials**, v. 205, p. 257–273, 2019.

SIERRA-BELTRAN, M. G.; JONKERS, H. M. Bio-Based Mortar for Concrete Repair. **Proceedings of the 14th International Conference Structural Faults and Repair**, p. 1–8, 2012.

SIERRA-BELTRAN, M. G.; JONKERS, H. M.; SCHLANGEN, E. Characterization of sustainable bio-based mortar for concrete repair. **Construction and Building Materials**, v. 67, p. 344–352, 2014.

SILVA, F. P. C.; PASSARINI, V. C.; SANTOS, F. C. S. Bioconcreto: a tecnologia para construção sustentável. **Inovae - Journal of Engineering, Architecture and Technology Innovation**, v. 5, n. 2, p. 41–58, 2017.

SINGH, H.; GUPTA, R. Cellulose fiber as bacteria-carrier in mortar: Self-healing quantification using UPV. **Journal of Building Engineering**, v. 28, p. 1–14, 2020.

SNOECK, D. et al. X-ray computed microtomography to study autogenous healing of cementitious materials promoted by superabsorbent polymers. **Cement and Concrete Composites**, v. 65, p. 83–93, 2016.

STOCKS-FISCHER, S.; GALINAT, J. K.; BANG, S. S. Microbiological precipitation of CaCO₃. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 11, p. 1563–1571, 1999.

STUCKRATH, C. et al. Quantification of chemical and biological calcium carbonate precipitation: Performance of self-healing in reinforced mortar containing chemical admixtures. **Cement and Concrete Composites**, v. 50, p. 10–15, 2014.

SU, Y. et al. Exploring the coupled mechanism of fibers and bacteria on self-healing concrete from bacterial extracellular polymeric substances (EPS). **Cement and Concrete Composites**, v. 116, p. 1–12, 2021.

TAN, L. et al. Effect of carbonation on bacteria-based self-healing of cementitious composites. **Construction and Building Materials**, v. 257, p. 1–13, 2020.

THOMAS, W. DE A. **Contribuição ao Estudo do Módulo de Elasticidade Estático e Dinâmico de Concretos Contendo Agregados Basálticos: Análise Experimental e Proposta de Modelo de Correlação**. [s.l.] Universidade Federal da Integração Latino-Americana, 2020.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

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.

VAN TITTELBOOM, K. et al. Use of bacteria to repair cracks in concrete. **Cement and Concrete Research**, v. 40, n. 1, p. 157–166, 2010.

VAN TITTELBOOM, K.; DE BELIE, N. Self-healing in cementitious materials - A Review. **Materials**, v. 6, n. 6, p. 2182–2217, 2013.

VERMA, R. K. et al. Bio-Mineralization and Bacterial Carbonate Precipitation in Mortar and Concrete. **Bioscience and Bioengineering**, v. 1, n. 1, p. 5–11, 2015.

VIEIRA, J. A. **Biodeposição de CaCO₃ em materiais cimentícios : contribuição ao estudo da biomineralização induzida por Bacillus subtilis**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

VIJAY, K.; MURMU, M.; DEO, S. V. Bacteria based self healing concrete – A review. **Construction and Building Materials**, v. 152, p. 1008–1014, 2017.

WANG, J. 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, J. et al. A chitosan based pH-responsive hydrogel for encapsulation of bacteria for self-sealing concrete. **Cement and Concrete Composites**, v. 93, p. 309–322, 2018.

WANG, J. Y. et al. Potential of applying bacteria to heal cracks in concrete. **2nd International Conference on Sustainable Construction Materials and Technologies**, p. 1807–1818, 2010.

WANG, J. Y. et al. Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial

spores. **Cement and Concrete Research**, v. 56, p. 139–152, 2014a.

WANG, J. Y. et al. Application of hydrogel encapsulated carbonate precipitating bacteria for approaching a realistic self-healing in concrete. **Construction and Building Materials**, v. 68, p. 110–119, 2014b.

WARSCHEID, T.; BRAAMS, J. Biodeterioration of stone: A review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 46, n. 4, p. 343–368, 2000.

WEI, S. et al. Microbial mediated deterioration of reinforced concrete structures. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 8, p. 748–754, 2010.

WIKTOR, V.; JONKERS, H. M. Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. **Cement and Concrete Composites**, v. 33, n. 7, p. 763–770, 2011.

WU, M.; JOHANNESSON, B.; GEIKER, M. A review: Self-healing in cementitious materials and engineered cementitious composite as a self-healing material. **Construction and Building Materials**, v. 28, n. 1, p. 571–583, 2012.

XU, J.; WANG, X. Self-healing of concrete cracks by use of bacteria-containing low alkali cementitious material. **Construction and Building Materials**, v. 167, p. 1–14, 2018.

XU, J.; YAO, W. Multiscale mechanical quantification of self-healing concrete incorporating non-ureolytic bacteria-based healing agent. **Cement and Concrete Research**, v. 64, p. 1–10, 2014.

ZHANG, J. et al. Immobilizing bacteria in expanded perlite for the crack self-healing in concrete. **Construction and Building Materials**, v. 148, p. 610–617, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela I – Principais publicações relacionadas à biomineralização de materiais a base de cimento

Autor	Número de citação^{1*}	Tempo de citação²	Citação/ano³
(JONKERS et al., 2010)	935	11	85
(WIKTOR; JONKERS, 2011)	649	10	65
(WANG et al., 2014a)	430	7	61
(VAN TITTELBOOM et al., 2010)	676	11	61
(WANG et al., 2012)	442	9	49
(KHALIQ; EHSAN, 2016)	220	5	44
(DE MUYNCK et al., 2008b)	545	13	42
(WANG et al., 2014b)	278	7	40
(DE MUYNCK et al., 2008a)	492	13	38
(TZIVILOGLOU et al., 2016)	150	5	30
(BANG; GALINAT; RAMAKRISHNAN, 2001)	594	20	30
(LUO; QIAN; LI, 2015)	176	6	29
(ALAZHARI et al., 2018)	85	3	28
(ACHAL; MUKERJEE; REDDY, 2013)	197	8	25
(ZHANG et al., 2017)	94	4	24
(XU; WANG, 2018)	70	3	23
(KRISHNAPRIYA; VENKATESH BABU; PRINCE ARULRAJ, 2015)	111	6	19
(ACHAL et al., 2009)	218	12	18
(BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015)	93	6	16
(XU; YAO, 2014)	115	7	16
(RUAN et al., 2019)	29	2	15
(CHUNXIANG et al., 2009)	179	12	15
(SIERRA-BELTRAN; JONKERS; SCHLANGEN, 2014)	99	7	14
(BANG et al., 2010)	150	11	14
(BHASKAR et al., 2017)	51	4	13
(CHEN; QIAN; HUANG, 2016)	67	5	13
(KIM et al., 2013)	103	8	13
(ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2011)	133	10	13
(KUA et al., 2019)	24	2	12
(GUPTA; KUA; PANG, 2018)	37	3	12
(PEI et al., 2013)	95	8	12
(GOLLAPUDI et al., 1995)	283	26	11
(DE BELIE; DE MUYNCK, 2009)	115	12	10
(JONKERS; SCHLANGEN, 2008a)	135	13	10
(NAIN et al., 2019)	18	2	9
(NGUYEN et al., 2019)	16	2	8
(DE KOSTER et al., 2015)	50	6	8
(STUCKRATH et al., 2014)	58	7	8
(JONKERS; SCHLANGEN, 2008b)	105	13	8

Autor	Número de citação^{1*}	Tempo de citação²	Citação/ano³
(HELMI et al., 2016)	37	5	7
(ACHAL; MUKHERJEE; REDDY, 2010)	81	11	7
(JANG et al., 2020)	6	1	6
(LORS et al., 2017)	25	4	6
(SINGH; GUPTA, 2020)	5	1	5
(WANG et al., 2018)	15	3	5
(LUCAS et al., 2018)	14	3	5
(SCHWANTES-CEZARIO et al., 2017)	21	4	5
(MAHESWARAN et al., 2014)	38	7	5
(ABDULKAREEM et al., 2019)	8	2	4
(WANG et al., 2010)	41	11	4
(JONKERS; SCHLANGEN, 2007)	57	14	4
(SCHWANTES-CEZARIO et al., 2019)	6	2	3
(QIAN et al., 2016)	13	5	3
(BANG; RAMAKRISHNAN, 2001)	54	20	3
(SCHWANTES-CEZARIO et al., 2020)	2	1	2
(BERGH et al., 2020)	2	1	2
(TAN et al., 2020)	2	1	2
(SCHWANTES-CEZARIO et al., 2018)	2	3	1
(MONDAL; GHOSH, 2021)	0	0	0
(SU et al., 2021)	0	0	0
(MONDAL et al., 2020)	0	1	0
(NEELADHARAN et al., 2018)	1	3	0
(MAGESWARI; KUMAR; RAGHUNANDHAN, 2017)	0	4	0

^{1*}Número de citações indicadas no Google scholar em consulta realizada no mês de janeiro de 2021.

² Diferença temporal entre a data da consulta do número de citação e o ano da publicação do artigo.

³ Número de citação por ano dividido pelo tempo de citação.

Na tabela 1 tem-se um critério utilizado para identificar a relevância dos artigos científicos publicados, levando em consideração as citações por ano ao invés somente o número de citações.

Fonte: Autora (2020).