ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO BACILLUS COM POTENCIAL PARA USO EM BIOCIMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ARGAMASSAS[1]

ALMEIDA, J., Universidade de Passo Fundo, e-mail: jupira@upf.br; THOMÉ, A., Universidade de Passo Fundo, e-mail: thome@upf.br; TONIAL, F., Universidade de Passo Fundo, e-mail: fabianatonial@upf.br; SIQUEIRA, G. N., Universidade de Passo Fundo, e-mail: gabriel.nsiqueira@gmail.com

ABSTRACT

This study had as aim to isolate bacteria of the genus Bacillus from soil samples, in order to carry out an investigation of its potential in the production of urease, so that it can be used in biocementation. From a clayish latossoil in the horizont B, a soil sample was extracted, diluted in saline solution and put through a temperature of 80°C in order to separate only colonies of bacteria that produce urease. From the solution, a solid biomass was produced in which the colonies got sporulated. After that, the colonies were revitalized so they could be used in the manufacture of mortar. A pilot test was made utilizing the bacterias instead of cement in the mortar and after 28 days the specimen was tested in its compression and traction. The results did not reach the minimum of resistance established by the technical rules but pozzolanic activity could be observed because the sample with no bacterial use was 50% less resistent than the rest. Therefore, it is possible to replace other cement materials for urease production bacteria.

***Key words**: Bacillus. Biomortar. Biocementation.*

1 INTRODUÇÃO

O Brasil atualmente apresenta uma produção anual média de 103 milhões de toneladas de argamassa por ano. Esta produção corresponde cerca de 2% da produção total, sendo que a maior parte é produzida no canteiro de obras (IDEIES, 2015).

A argamassa quando produzida sem controle tecnológico pode levar a um baixo desempenho nas suas propriedades. A resistência mecânica da argamassa é uma das principais características, conferindo êxito nas mais diversas funções de aplicação da mesma.

Dentre os componentes utilizados na confecção de argamassas temos o cimento, responsável por 88% das emissões de CO_2 na atmosfera, o aumento de CO_2 é responsável pelas mudanças climáticas e aquecimento global, tais efeitos agravaram-se com o passar dos últimos anos, nos levando a buscar por novas tecnologias que busquem não agredir o meio ambiente (ALSHALIF *et al*., 2016).

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

As buscas de novas técnicas visando reduzir a emissão de CO_2 veem resultando no estudo da utilização da atividade microbiológica, essa técnica consiste na produção de carbonato de cálcio em materiais derivados do cimento. Sendo uma técnica ambientalmente correta, a redução do CO_2 ocorre naturalmente no processo metabólico dos micro-organismos para que seja possível a produção do carbonato de cálcio (ALSHALIF *et al*., 2016; VERMA *et al*., 2015).

Bactérias com potencial ureolítico tem a capacidade de precipitar o carbonato de cálcio pela produção da enzima de urease, esta enzima é responsável por catalisar a hidrólise da ureia em CO_2 e amônia, resultando no aumento do pH e de concentração de carbonato no ambiente bacteriano. Quando estas bactérias entram em contato com um ambiente rico em cálcio a precipitação se forma em um mineral de estrutura definida, carbonato de cálcio na forma de calcita. (SIDDIQUE; CHAHAL, 2011).

A hidrólise da ureia é um processo metabólico comum entre uma grande gama de micro-organismos que estão presentes no solo, tornando-se ideal para estudos ligados a biotecnologia (SIDDIQUE; CHAHAL, 2011).

Pesquisas desenvolvidas por (ABO-EL-ENEIN *ET AL*., 2012) e (REDDY *ET AL*., 2011) comprovam o aumento de resistência a compressão da argamassa em até 33%, utilizando a precipitação de carbonato de cálcio na matriz da argamassa.

A precipitação de carbonato de cálcio levou a várias investigações sobre o uso de bactérias no concreto. Diferentes micro-organismos foram usados para aumentar a resistência à compressão da argamassa e para a remediação de fissuras (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; BANG, 2001).

Este trabalho busca analisar os efeitos da utilização de micro-organismos do gênero Bacillus nas propriedades mecânicas da argamassa. Para análise os prismas de argamassa foram submetidos a testes de resistência a compressão e tração na flexão, aos 28 dias, e para verificar a eficiência do método foi feita a comparação com uma amostra piloto e normas técnicas para argamassa.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Solo

Os micro-organismos utilizados para este estudo foram extraídos de uma amostra de solo, um latossolo de horizonte B. O perfil da extração do solo caracteriza-se por possuir um horizonte A pouco espesso e um horizonte B espesso. O horizonte B caracteriza-se por ser um latossolo de coloração vermelho escuro, argiloso de estrutura fraca de substrato basáltico (MAPA, 1973). A Figura 1 apresenta o perfil de extração do solo.

Figura 1 - Extração do solo



Fonte: Os autores

2.2 Isolamento das colônias

O solo coletado foi encaminhado ao laboratório de microbiologia para realização de isolamento de colônias do gênero Bacillus, produtores da enzima urease, responsável pela precipitação de carbonato de cálcio. Para realizar o isolamento dos micro-organismos 1g de solo foi adicionado em 10 ml de solução salina estéril e homogeneizado em agitador de tubos por 1 minuto como mostra a Figura 2.

Figura 2 - Preparo do solo



Fonte: Os autores

A mistura foi diluída 10 e 100 vezes em solução salina estéril. Para cada diluição, uma alíquota de 1000 µL foi coletada e submetida por 12 minutos a 80°C e 5 minutos a 4°C, conforme Figura 3.

Figura 3 - Diluição do solo em solução salina



Fonte: Os autores

Em seguida, 100 µL de cada alíquota foram transferidos para placas de Petri contendo Ágar Nutriente e espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski como na Figura 4. As placas foram mantidas em estufa a 28°C durante 24 - 48 horas.

Figura 4 - Espalhamento de solo diluído

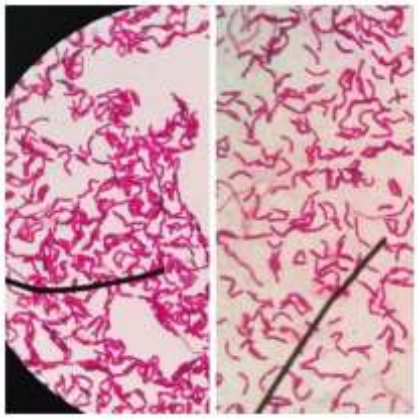


Fonte: Os autores

2.3 Coloração de Gram

A coloração de Gram diferencia as espécies bacterianas em dois grupos: Gram-positivos e Gram-negativos. Este método é baseado na capacidade das paredes celulares de bactérias Gram-positivas de reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante o tratamento com álcool, enquanto que as paredes celulares de bactérias Gram-negativas não o fazem (NOSOUHIAN; MOSTOFINEJAD; 2016). O teste foi utilizado para determinar a morfologia dos micro-organismos, uma vez que Bacillus possuem uma forma de bastonete, como mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Coloração de Gram



Fonte: Os autores

2.4 Teste de Urease

A enzima de urease produzida pelos micro-organismos é responsável pela hidrólise da ureia presente no ambiente. A liberação de dióxido de carbono a partir do processo de hidrólise combinado com íons de cálcio resulta na deposição de carbonato de cálcio (RAO *et al.*, 2013).

O ensaio de urease foi realizado para garantir que os micro-organismos que foram selecionados fossem produtores de urease. A mudança de tom de cor do meio de amarelo para rosa indica que a bactéria é produtora de urease, conforme Figura 6.

Figura 6 - Teste de Urease



Fonte: Os autores

2.5 Meio de crescimento e biomassa

A partir do crescimento bacteriano em placa de Ágar Nutriente, cada amostra foi inoculada em 250 ml de Caldo Nutriente na concentração

aproximada de 10^8 UFC/ml. A concentração bacteriana foi determinada por contagem em Câmara de Neubauer. O Caldo foi mantido à 26°C por 24 horas à 120 rpm. Em seguida o cultivo foi centrifugado à 7000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o sedimento foi coletado e misturado a 12,5g de esterco de ave seco. A mistura foi seca em temperatura ambiente. A Figura 7 demonstra a biomassa utilizada na produção da bioargamassa.

Figura 7 - Biomassa



Fonte: Os autores

A biomassa tem a função de conservar os micro-organismos por um período maior, deixando-os em estado de latência, mas em um meio nutritivo, podendo ser armazenado para posterior uso, assim como os demais materiais utilizados na argamassa. O esterco de aves seco foi escolhido por ser rico em N-P-K (Nitrogênio, Fósforo e Potássio).

A etapa de secagem é o período onde ocorre a esporulação bacteriana, onde os micro-organismos ficam supersaturados e sem água, eles se protegem para manterem-se vivos, em estado de latência, até que seja dada condições ótimas para que haja a quebra dos esporos posteriormente, etapa da revitalização.

2.6 Produção da bioargamassa

Para a produção da bioargamassa utilizou-se como base trabalhos já desenvolvidos pelo projeto *Eco-Cement* (NEAPOLIS UNIVERSITY, 2015), o estudo foi adaptado em buscas de possíveis resultados positivos, por se tratar de micro-organismos do gênero *bacillus* ainda sem identificação, apenas produtores de urease.

A biomassa foi revitalizada em solução de água e ureia, em banho-maria, a uma temperatura de 30°C, por aproximadamente 3 horas, mexendo suavemente a cada 15 minutos. O processo de revitalização será responsável por auxiliar os micro-organismos na quebra dos esporos produzidos a fim de se manterem vivos. A presença da água e da ureia fará com que haja a reativação dos processos enzimáticos dos micro-organismos levando-os a romper os esporos, ativando o processo metabólico de urease dos micro-organismos contidos na biomassa, sendo a enzima urease essencial para que ocorra a precipitação do carbonato de cálcio para o processo da biocimentação.

Após a revitalização, o material foi coado e utilizado na confecção da argamassa feita com traço em percentuais, sendo 1% biomassa (revitalizada

com ureia), 23% de água, 46% de calcário calcítico (como fonte de cálcio), 12% de cinza de casca de arroz (como agente hidráulico) e 18% de areia (como agregado). Foram confeccionados corpos de (Figura 8), rompidos aos 28 dias, para testar a sua resistência mecânica.

Figura 8 - Bioargamassa



Fonte: Os autores

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Resistência mecânica

Através da Tabela 1, percebe-se que as amostras Bio (possuem adição de micro-organismos) tiveram um acréscimo notável de resistência à compressão em comparação a amostra Branco (amostra sem adição de micro-organismos).

Segundo os autores Reddy *et al*. (2011) e Abo-El-Enein *et al*. (2012), o aumento de resistência se dá devido à produção do carbonato de cálcio na microestrutura da argamassa.

No momento da retirada dos moldes a amostra Bio 3 rompeu-se impedindo o ensaio de tração. Porém, nota-se que os valores de resistência à tração na flexão não atingiram os limites mínimos de desempenho impostos pela NBR 13279 que determina as resistências para as aplicações da argamassa, enquanto os resultados obtidos nos ensaios a compressão demonstraram valores acima do mínimo exigido.

Tabela 1 - Resultados médios dos ensaios mecânicos

Identificação da amostra	**Resistência à compressão (MPa)**	**Resistência à tração na flexão (MPa)**
	Média	*Média*

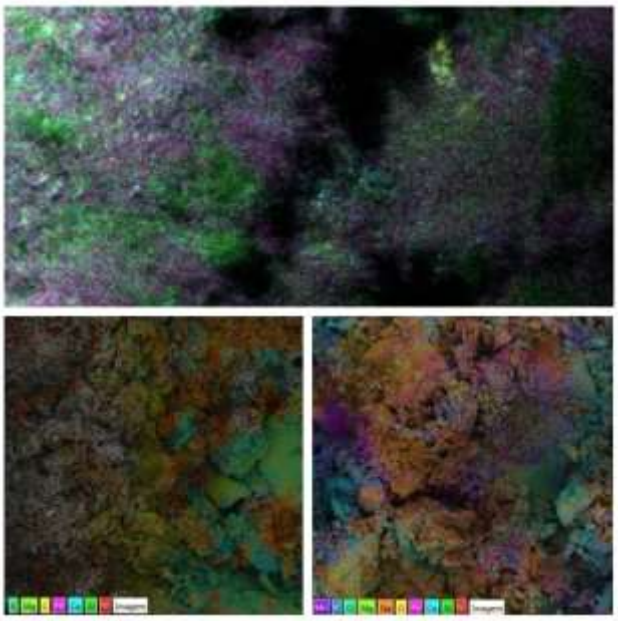
Bio 1	2,13	0,09
Bio 2	2,18	0,07
Bio 3	1,73	**
Branco	1,41	0,05

Fonte: Os autores

3.2 Análise da microestrutura

Para a análise da microestrutura foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), esta análise teve como objetivo a verificação da formação de carbonato de cálcio, com a obtenção da imagem, determinou-se a composição das amostras. O MEV é capaz de produzir imagens de alta ampliação e resolução, possibilitando analisar a fundo a microestrutura da argamassa, para que seja possível identificar se houve ou não a precipitação, conforme a Figura 9.

Figura 9 – Análise da microestrutura utilizando MEV

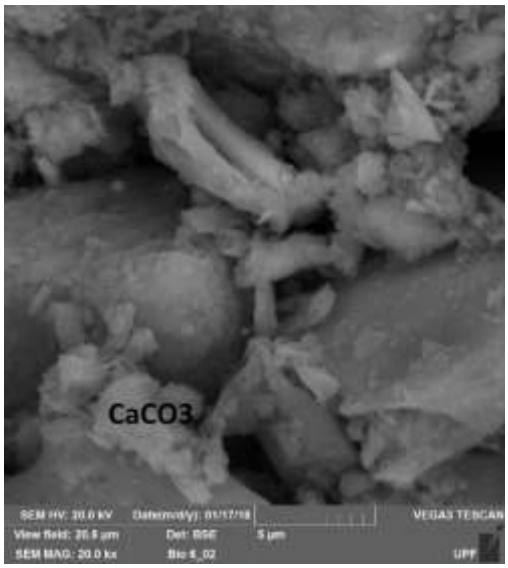


Fonte: Os autores

O mapa químico obtido a partir da varredura demonstra grande quantia de cálcio (cloração verde) presente nas amostras analisadas, constatando que ocorreu a precipitação do carbonato de cálcio.

Analisando a formação cristalina da Figura 10, pode-se notar que a formação é próxima do que é descrito por Siddique; Chahal (2011), que diferentes bactérias podem precipitar quantias e formas diferentes de carbonato de cálcio. Como não se sabe quais as bactérias que estavam presentes no solo, isso dificulta analisar mais profundamente a formação dos cristais.

Figura 10 - Formação cristalina



Fonte: Os autores

4 CONCLUSÕES

A bioargamassa foi testada em relação às resistências à tração na flexão e à compressão, obtendo resultados médios abaixo dos valores mínimos exigidos pelas Normas Técnicas, porém se observou que entre as amostras com bactérias e sem bactérias, houve um aumento de 50% de resistência para as amostras que continham biomassa, apontando que houve produção de calcita.

Tratando-se de uma técnica nova, onde o objetivo era a substituição total do cimento, obteve-se êxito no teste piloto. Após a identificação dos micro-organismos far-se-á novos ensaios para encontrar uma dosagem que atenda a todos os padrões normativos exigidos para as argamassas.

REFERÊNCIAS

ABO-EL-ENEIN, S. A. *et al*. Application of microbial biocementation to improve the physico-mechanical properties of cement mortar. **HBRC Journal**, Cairo, v. 9, n. 1, p. 36-40, 12 February 2012. ISSN 1687-4048. Disponivel em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687404812000260?via%3Dihub#!>. Acesso em: 17 mar. 2018. Doi: https://doi.org/10.1016/j.hbrcj.2012.10.004.

ALSHALIF, A., F. *et al.* Carbon Dioxide (CO2) Sequestration In BioConcrete, An Overview, **MATEC Web of Conferences**, n. 103, 2016. Disponível em:

<https://www.matec-conferences.org/articles/matecconf/pdf/2017/17/matecconf_iscee2017_05016.pdf> Acesso em: 22 mar. 2018. Doi: 10.1051/matecconf/20171030

BALAM, N. H.; MOSTOFINEJAD, D.; EFTEKHAR, M. Use of carbonate precipitating bacteria to reduce water absorption of aggregates, **Construction and Building Materials**, v. 141, p. 565-577, October 2017. ISSN 0950-0618 Disponivel em: <https://www.researchgate.net/profile/Nafise_Balam/publication/315177272_Use_of_carbonate_precipitating_bacteria_to_reduce_water_absorption_of_aggregates/links/59e700b3a6fdcc0e882d4649/Use-of-carbonate-precipitating-bacteria-to-reduce-water-absorption-of-aggregates.pdf>.
Acesso em: 18 mar. 2018. Doi: https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.03.042.

IDEIES INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO EDUCACIONAL E INDUSTRIAL DO ESPIRITO SANTO. **Análise de Competitividade do Setor das Indústrias de Argamassa do Estado do Espírito Santo,** Vitória, Espírito Santo, 2015. Disponível em: <http://www.invistanoes.es.gov.br/images/contratos-de-competitividade/analise-dos-setores/analise_moagem.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2018.

MAPA MNISTÉRIO DA AGRICULTURA, ABASTECIMENTO E PECUARIA. **LEVANTAMENTO DE RECONHECIMENTO DOS SOLOS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**. Recife, 1973.

NOSOUHIAN, F.; MOSTOFINEJAD, D. BALAM, N. H.; MOSTOFINEJAD, D.; EFTEKHAR, M. Use of carbonate precipitating bacteria to reduce water absorption of aggregates, **Aci Materials Journal**, v. 113, n. 3, May-June 2016. Disponivel em: <https://www.researchgate.net/profile/Nafise_Balam/publication/315177272_Use_of_carbonate_precipitating_bacteria_to_reduce_water_absorption_of_aggregates/links/59e700b3a6fdcc0e882d4649/Use-of-carbonate-precipitating-bacteria-to-reduce-water-absorption-of-aggregates.pdf>. Acesso em: 18 mar. 2018. Doi: 10.14359/51688701.

RAMACHANDRAN, S. K.; RAMAKRISHNAN, V.; BANG, S. S. Remediation of Concrete Using Micro-Organisms. **ACI Materials Journal**, v. 98, n. 1, p. 99-234, January-February 2001. Disponivel em: <http://sphinx.murdoch.edu.au/units/extern/BIO301/teach/download/previous%20years/Chemostat/B.%20pasteuri%20literature%20examples/Concrete%20remediation%20with%20B.%20pasteurii.pdf>. Acesso em: 17 mar. 2018.

RAO, M. *et al*. Bioengineered Concrete - A Sustainable Self-Healing Construction Material. **Research Journal of Engineering Sciences**, Hyderabad, v. 2, n. 6, p. 45-51, June 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/284593385_Bioengineered_concrete-A_sustainable_self-healing_construction_material>. Acesso em: 20 mar. 2018.

REDDY , V. S. *et al*. Strength Enhancement of Cement Mortar using Microorganisms - An Experimental Study. **International Journal of Earth Sciences and Engineering**, India, v. 04, n. 06, p. 933-936, October 2011. ISSN 0974-5904. Disponivel em: <https://www.researchgate.net/publication/268329038_Strength_Enhancement_of_Cement_Mortar_using_Microorganisms_-An_Experimental_Study >. Acesso em: 16 mar. 2018.

SIDDIQUE, R.; CHAHAL, N. K. Effect of ureolytic bacteria on concrete properties. **Construction and Building Materials**, Patiala, v. 25, n. 10, p. 3791-3801, 11 April 2011. ISSN 0950-0618 Disponivel em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950061811001504?via%3Dihub>. Acesso em: 17 mar. 2018. Doi: https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2011.04.010.

VERMA, R. K. *et al*. Bio-Mineralization and Bacterial Carbonate Precipitation in Mortar and Concrete**. Public Science Frameword, Roorkee**, v. 1, n. 1, p. 5-11, 4 April 2015. Disponivel em: <http://www.publicsciencefframework.org/journal/allissues/bio.html>. Acesso em: 22 mar. 2018.

NEAPOLIS UNIVERSITY. **Project Eco-Cement**. 2012-2015. Disponível em:< ttp://www.eco-cement.eu/download/ECO-CEMENT%20WP7%20D7.74%20WORKSHOPS,%20CONFERENCES%20AND%20CONGRESS.pdf>. Acesso em: 17 mar. 2018.