



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
CURSO DE ENGENHARIA CIVIL

DIEGO PADILHA DA CRUZ MEDEIROS

**USO DE BACTÉRIAS (*BACILLUS SUBTILIS* E *BACILLUS CEREUS*) NA PRODUÇÃO
DE BIOCONCRETO**

João Pessoa

2020

Diego Padilha da Cruz Medeiros

Uso de bactérias (*Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*) na produção de Bioconcreto

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso Engenharia Civil do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, Campus João Pessoa-PB, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Civil.

Orientador: Professor Givanildo Alves de Azeredo, Dsc.

Co-orientador: Professor José Soares do Nascimento, Dsc.

João Pessoa

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M488u Medeiros, Diego Padilha da Cruz.

Uso de bactérias (*Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*)
na produção de Bioconcreto / Diego Padilha da Cruz
Medeiros. - João Pessoa, 2020.

50 f.

Orientação: Givanildo Alves de Azeredo.
Coorientação: José Soares do Nascimento.
Monografia (Graduação) - UFPB/CT.

1. Fissuras, regeneração, calcita, Bioconcreto. I.
Azeredo, Givanildo Alves de. II. Título.

UFPB/BC

FOLHA DE APROVAÇÃO

DIEGO PADILHA DA CRUZ MEDEIROS

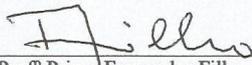
**USO DE BACTÉRIAS (*BACILLUS SUBTILIS* E *BACILLUS CEREUS*) NA
PRODUÇÃO DE BIOCONCRETO**

Trabalho de Conclusão de Curso em 01/04/2020 perante a seguinte Comissão Julgadora:



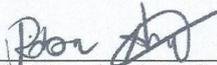
Prof.º Givanildo Alves de Azeredo
Departamento de Engenharia Civil e Ambiental do CT/UFPB

APROVADO



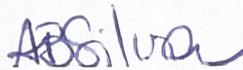
Prof.º Primo Fernandes Filho
Departamento de Engenharia Civil e Ambiental do CT/UFPB

APROVADO



Prof.º Robson Arruda dos Santos
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia da Paraíba

APROVADO



Prof.ª Andrea Brasiliano Silva
Matrícula Siape: 1549557
Coordenadora do Curso de Graduação em Engenharia Civil

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de viver. Agradeço também a meus pais, José e Rejane, não somente por terem me oferecido tudo o que foi possível para que eu estudasse, mas, especialmente, por terem inculcado em mim a importância do estudo. À minha irmã, Isabele, deixo aqui meu reconhecimento da importância de seus conselhos em minha vida. Outro reconhecimento que devo fazer é que sem a ajuda de Larissa, que esteve comigo desde o primeiro minuto nesta empreitada, não teria conseguido. Além deles, agradeço a todos os meus amigos que foram verdadeiros irmãos nesta caminhada e espero que continuemos a ser até o fim de nossas vidas.

Encerra-se aqui um ciclo de 5 anos que foi muito importante para meu crescimento como estudante, profissional e ser humano. Serei eternamente grato à Universidade Federal da Paraíba por todas as oportunidades que me foram oferecidas e por todo conhecimento adquirido. Essa gratidão se estende especialmente a meu orientador, professor Givanildo, pela parceria nesta pesquisa e a meu co-orientador, professor José Nascimento, pois sem este não teria sido possível realizar este trabalho, sendo, portanto, fundamental desde o início.

RESUMO

As fissuras são danos inerentes e recorrentes quando se trata do concreto. Frequentemente, requerem intervenções financeiramente onerosas e que fazem uso de produtos químicos que são prejudiciais à saúde e ao meio ambiente. No intuito de apresentar uma solução eficaz a esse problema, foi desenvolvido o Bioconcreto, que faz uso de agentes microbianos (bactérias) capazes de precipitar calcita ($CaCO_3$) incorporados à matriz de concreto, tornando possível o preenchimento das fissuras. Tendo isso em vista, este trabalho teve como objetivo desenvolver estudos experimentais comparativos utilizando corpos de prova de Bioconcreto contendo as bactérias *Bacillus subtilis* e *B. cereus* com a finalidade de testar o fechamento das fissuras provocadas no Bioconcreto. A metodologia consistiu em saturar a argila expandida (agregado graúdo), que funciona como cápsula protetora para as bactérias, em líquido aquecido a 80°C contendo lactato de cálcio e agentes microbianos, obedecendo-se os tempos necessários. As análises consistiram em verificações visuais realizadas no primeiro e no décimo dia pós-provocação de fissuras e no ensaio de absorção de água por capilaridade (não normatizado). Os resultados demonstraram que as bactérias foram eficazes na recuperação das fissuras e indicaram que *B. subtilis* possui uma capacidade regenerativa do Bioconcreto mais significativa quando comparada à *B. cereus*.

Palavras-chave: Fissuras, regeneração, calcita, Bioconcreto.

ABSTRACT

Cracks are inherent and recurring damage when it comes to concrete. They often require financially costly interventions that use chemicals that are harmful to health and the environment. In order to present an effective solution to this problem, Bioconcrete was developed, which uses microbial agents (bacteria) capable of precipitating calcite ($CaCO_3$) incorporated into the concrete matrix, making it possible to fill the cracks. With this in mind, this work aimed to develop comparative experimental studies using Bioconcrete specimens containing *Bacillus subtilis* and *B. cereus* bacteria in order to test the closure of the fissures caused in the Bioconcrete. The methodology consisted of saturating the expanded clay (coarse aggregate), which works as a protective capsule for bacteria, in a liquid heated to 80°C containing calcium lactate and microbial agents, obeying the necessary times. The analyzes consisted of visual checks carried out on the first and tenth days after crack provocation and in the capillary water absorption test (not standardized). The results showed that the bacteria were effective in recovering the fissures and indicated that *B. subtilis* has a more significant regenerative capacity of the Bioconcrete when compared to *B. cereus*.

Keywords: Fissures, regeneration, calcite, Bioconcrete.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fissura por assentamento plástico.....	13
Figura 2 - Fissura por dessecação superficial.....	13
Figura 3 - Fissura por deformação excessiva da fôrma.....	13
Figura 4 – Fissuração de pilares por dilatação de vigas.....	14
Figura 5 - Fissuração de viga subarmada submetida à flexão.....	14
Figura 6 - Fissuras devido à retração em viga.....	15
Figura 7 - Fissuração em pilar devido à expansão do concreto causada por corrosão.....	15
Figura 8 - Argila expandida impregnada com esporos de bactérias e compostos orgânicos para utilização em Bioconcreto.....	18
Figura 9 - Resistência à compressão de corpos de prova de controle e de Bioconcreto feitos a partir de fontes de cálcio variadas.....	19
Figura 10 – Autocicatrização em corpos de prova de controle (A) e em corpos de prova de Bioconcreto (B).....	21
Figura 11 – (a) Estrutura bacteriana. (b) Parede celular carregada negativamente e íons positivos em volta. (c) Biomineral produzido pela ligação dos íons à parede celular.....	22
Figura 12 – Morfologia bacteriana. A – Cocos, B – Bastonetes, C – Espiroquetas.....	24
Figura 13 - Esporo de Bacillus dentro (endósporo) de bactérias (estrutura não corada - verde claro) e célula vegetativa corada em vermelho.....	25
Figura 14 – Agrupamentos em cadeia de B. subtilis pela coloração de Gram.....	26
Figura 15 - B. cereus "eclodindo" do endósporo.....	28
Figura 16 - Fluxograma da sequência metodológica.....	29
Figura 18 - Bactérias Bacillus cereus (A) e seus esporos (B); Bactérias Bacillus subtilis (C) e seus esporos (D).....	33
Figura 19 - Suspensão bacteriana correspondente concentração de concentração de 3×10^8 UFC/mL.....	34
Figura 20 - Argila expandida após a mistura das bactérias e lactato de cálcio.....	35
Figura 21 - Corpos de prova de Bioconcreto após moldagem.....	36
Figura 22 - Fissuras provocadas em corpo de prova contendo B.cereus sendo (a) 1 dia de vida e (b) 10 dias de vida.....	40
Figura 23 - Fissuras provocadas em corpo de prova da bactéria B. subtilis sendo (a) 1 dia de vida e (b) 10 dias de vida.....	41
Figura 24 - Fissuras provocadas em corpo de prova no tratamento controle sendo (a) 1 dia de vida e (b) 10 dias de vida.....	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 JUSTIFICATIVA	10
1.2 OBJETIVO GERAL	10
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 FISSURAÇÃO DO CONCRETO	11
2.1.1 Fissuração do concreto no estado fresco	12
2.1.2 Fissuração do concreto no estado endurecido	14
2.2 BIOCONCRETO	16
2.2.1 Trabalhos recentes significativos no desenvolvimento do Bioconcreto.....	17
2.2.2 O agregado graúdo: argila expandida.....	18
2.2.3 O composto orgânico reagente: lactato de cálcio	19
2.3 BIOMINERALIZAÇÃO	20
2.4 Os agentes microbianos do bioconcreto	23
2.4.1 <i>Bacillus subtilis</i>	26
2.4.2 <i>Bacillus cereus</i>	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.2 PREPARO DOS ISOLADOS BACTERIANOS.....	33
3.3 EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1 PROCESSO DE IMPREGNAÇÃO, CURA E INDUÇÃO DE FISSURAS EM BIOCONCRETO	37
4.2 AVALIAÇÃO VISUAL NA RECUPERAÇÃO DO BIOCONCRETO.....	40
4.3 ENSAIO DE ABSORÇÃO DE ÁGUA POR CAPILARIDADE (NÃO NORMATIZADO) EM BIOCONCRETO	43
5. CONCLUSÃO	45
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	46
REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

Na atual conjuntura do mercado brasileiro da construção civil, com uma economia ainda instável, deve-se buscar meios para aumentar a vida útil das estruturas ao invés de construí-las do zero. Soma-se a esse fato, uma tendência mercadológica de se investir cada vez mais em produtos “verdes”, ou seja, menos agressivos ao meio ambiente. Mesmo assim, cerca de 7% de todo o CO_2 produzido pelo homem ainda são oriundos da produção de cimento (JONKERS et al., 2010). O cimento é um dos insumos do concreto e este, por sua vez, é um dos materiais mais consumidos pela engenharia civil brasileira. Assim, outras soluções mais limpas precisam ser buscadas sem abrir mão da competitividade, eficiência e economicidade.

Nesse contexto de sustentabilidade, destacam-se diversas soluções ecológicas para o concreto, como é o caso, por exemplo, do uso de resíduos de construção e demolição como agregados, uso de cinza do bagaço de cana-de-açúcar e geopolímeros. Nesse enquadramento, surgiu o Bioconcreto, solução de origem natural que visa aliar a microbiologia à engenharia civil, promovendo o preenchimento de fissuras com carbonato de cálcio precipitado a partir de reações metabólicas de bactérias. Esse método não tem por objetivo reabilitar estruturas que estão em fase avançada de degradação (trincas); o intuito é prolongar a vida útil do concreto, ao impedir que agentes corrosivos e degradantes consigam adentrar no elemento estrutural.

Além de ser mais durável, o Bioconcreto é considerado uma metodologia ativa no combate à fissuração, isto é, este material possui elementos intrínsecos à sua matriz que são capazes de combater continuamente as rachaduras. Em outras palavras, significa dizer que o Bioconcreto dispensa o uso repetido de agentes cicatrizantes, pois, à medida que novas fissuras aparecem, atingindo novas partes da estrutura, outras bactérias também passam a contribuir com o processo de regeneração. Soma-se a isso, a contribuição à sustentabilidade, visto que existe o consumo de CO_2 na reação realizada pela bactéria, reduzindo a emissão deste poluente.

Por se tratar de um tema recente e pouco abordado especialmente no Brasil, existe um vasto campo de pesquisa e a necessidade de se entender a influência de diversas variáveis, como o tipo de bactéria (por exemplo), nas propriedades do Bioconcreto. Nesse sentido, este trabalho se propõe a estudar de forma comparativa a eficiência de duas bactérias (*Bacillus subtilis* e *B. cereus*) no fechamento de rachaduras no concreto. O intuito é avaliar a capacidade destas bactérias no fechamento de fissuras e contribuir com o desenvolvimento das pesquisas sobre este material.

1.1 JUSTIFICATIVA

A adição de bactérias ao concreto é, atualmente, uma metodologia eficaz no combate à fissuração, tornando-se, portanto, uma solução capaz de poupar recursos financeiros e tempo. Além disso, por ter como potencializador de autocicatrização um agente não industrializado, o Bioconcreto é considerado um material ambientalmente correto. O estudo mais aprofundado deste tema poderá possibilitar: o aumento da vida útil de estruturas de concreto; a diminuição do consumo de materiais que, em sua produção, poluem com o dióxido de carbono (CO_2) o planeta; o barateamento e a acessibilidade do método e o conhecimento sobre a eficiência dos agentes de autocicatrização.

1.2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver estudos experimentais comparativos utilizando corpos de prova de Bioconcreto contendo as bactérias *Bacillus subtilis* e *B. cereus* com a finalidade de testar o fechamento das fissuras provocadas no Bioconcreto.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a utilização de duas bactérias diferentes quanto a sua ação regenerativa no Bioconcreto;
- Realizar verificação visual do fechamento das fissuras de quatro tratamentos de corpos de prova;
- Observar a capacidade de absorção de água por capilaridade dos corpos de prova;
- Avaliar o efeito da mistura (líquido de saturação contendo bactérias, lactato de cálcio e argila expandida) realizada em frasco aberto ou fechado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FISSURAÇÃO DO CONCRETO

O concreto é um dos materiais de construção mais usados e possui uma alta tendência em formar fissuras. Essas fissuras diminuem significativamente a vida útil do concreto e levam a altos custos de reparação (SEIFAN et al., 2016). Segundo Dal Molin (1988), o efeito de fissuração é tão antigo quanto o uso do concreto e sua ocorrência se dá, majoritariamente, pela ausência do controle de qualidade nas diversas fases de construção, afetando não somente a segurança e o conforto, como também o psicológico dos usuários.

As fissuras podem ser consideradas como a manifestação patológica característica das estruturas de concreto, sendo mesmo o dano de ocorrência mais comum e aquele que, a par das deformações muito acentuadas, mais chama a atenção dos leigos, proprietários e usuários aí incluídos, para o fato de que algo de anormal está a acontecer (SOUZA & RIPPER, 1998).

Os conceitos de vida útil e durabilidade são indissociáveis. O primeiro representa o limite de tempo que a edificação é capaz de atender de forma satisfatória às expectativas de desempenho dos usuários. Já o segundo representa a resistência da edificação à agressividade a que ela está exposta (SOUZA & RIPPER, 1998). A norma brasileira de desempenho ABNT NBR 15575 (2013) preconiza que a vida útil de projeto de estruturas de concreto armado é de, no mínimo, 50 anos. Contudo torna-se um desafio atingi-la sobretudo devido à fissuração deste material.

Os problemas patológicos, salvo raras exceções, apresentam manifestações externas características, a partir das quais se pode deduzir qual a natureza, a origem e os mecanismos dos fenômenos envolvidos, bem como se podem estimar suas prováveis consequências. Esses sintomas, também denominados lesões, danos, defeitos ou manifestações patológicas, podem ser descritos e classificados, orientando um primeiro diagnóstico, a partir de minuciosas e experientes observações visuais (MONTEIRO, 2005, p. 1110).

Dessa forma, torna-se de suma importância conhecer as causas das manifestações patológicas para que seja possível escolher uma solução capaz de combatê-las, visto que cada

método possui suas vantagens e suas limitações. No caso do Bioconcreto, apesar de contribuir para o meio ambiente e ser eficiente, ainda é uma tecnologia cara.

Embora não seja possível extinguir totalmente o surgimento das fissuras, existem muitas técnicas para repará-las. Já foi demonstrado que métodos usuais de reparação com aplicação de produtos químicos ou polímeros são prejudiciais à saúde e ao meio ambiente, e além disso, seus efeitos possuem uma curta duração (SEIFAN et al., 2016).

O efeito de fissuração do concreto armado pode ser classificado em: fissuras ocorridas ainda no estado fresco e fissuras ocorridas no estado endurecido. O estado fresco é aquele em que se pode moldar a forma da peça estrutural, enquanto que o estado endurecido impossibilita esta moldagem (DAL MOLIN, 1988). Os exemplos de cada estado de fissuração serão mostrados nos itens 2.1.1 e 2.1.2 deste trabalho. Todavia, como se trata de uma breve revisão bibliográfica e o cerne deste trabalho não se trata de um estudo aprofundado sobre fissuração, não serão discutidos os pormenores de cada exemplo.

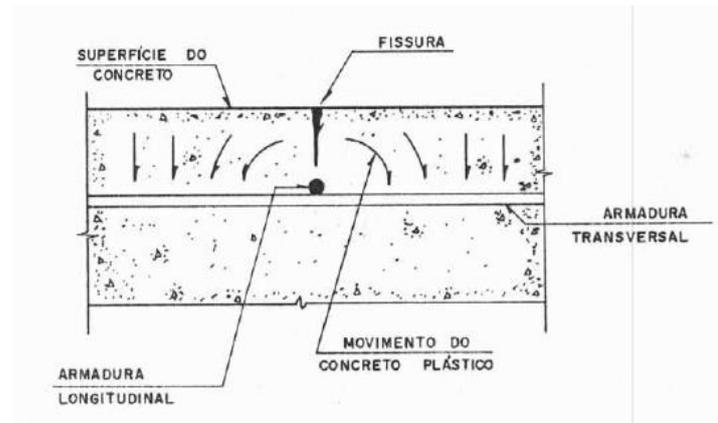
2.1.1 Fissuração do concreto no estado fresco

Andrade et al. (2005) advertem que erros de execução, principalmente no que tange à concretagem, podem levar ao comprometimento da durabilidade da estrutura e de sua segurança. Para Dal Molin (1988), as fissuras que podem ser controladas pelo cálculo estrutural são aquelas oriundas das cargas, porém as demais fissuras podem ser atenuadas por cuidados tomados no projeto e também na execução. A autora afirma ainda que as causas de fissuração do concreto no estado fresco podem ser divididas em:

- 1) Assentamento plástico;
- 2) Dessecação superficial;
- 3) Deformação excessiva da fôrma.

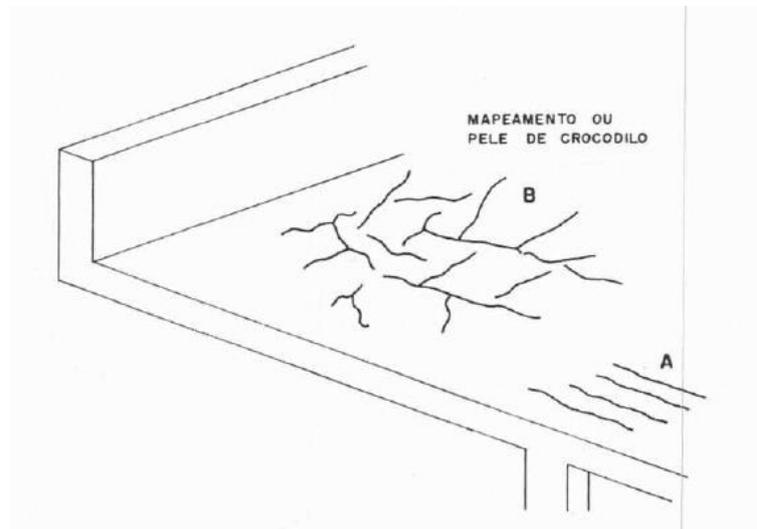
Essas três causas podem ser vistas, respectivamente, nas Figuras 1, 2 e 3:

Figura 1 – Fissura por assentamento plástico



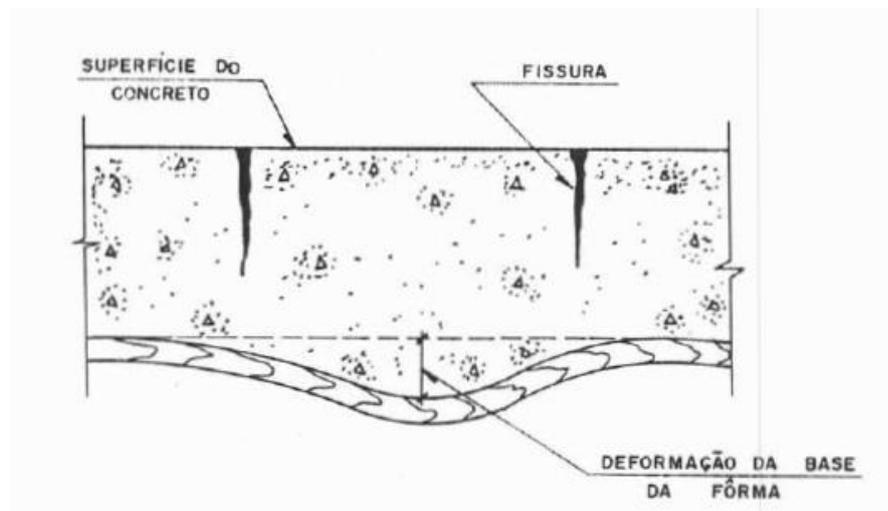
Fonte: Dal Molin, 1988.

Figura 2 - Fissura por dessecação superficial



Fonte: Dal Molin, 1988.

Figura 3 - Fissura por deformação excessiva da fôrma



Fonte: Dal Molin, 1988.

2.1.2 Fissuração do concreto no estado endurecido

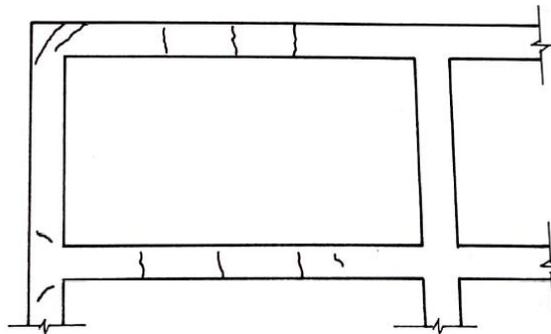
Thomaz (1989) classifica as causas de fissuração de estruturas de concreto armado, não considerando aquelas oriundas do mau uso da edificação ou de acidentes e sendo todas essas ocorridas pós-processo de endurecimento do concreto, em:

- 1) Movimentações provocadas por variações térmicas e de umidade;
- 2) Atuação de sobrecargas ou concentração de tensões;
- 3) Deformabilidade excessiva das estruturas;
- 4) Recalques diferenciados das fundações;
- 5) Retração de produtos à base de ligantes hidráulicos;
- 6) Alterações químicas de materiais de construção.

Contudo, algumas causas de fissuras podem causar danos mais facilmente em elementos estruturais de concreto, enquanto outras podem prejudicar com mais facilidade alvenarias e revestimentos, por exemplo.

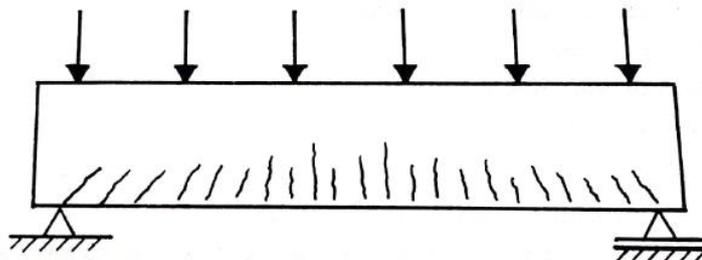
Dentre as causas citadas anteriormente que afetam de forma mais significativa o concreto, estão: a dilatação térmica, as sobrecargas, a retração e a corrosão. Os efeitos de fissuração provenientes dessas causas podem ser vistos respectivamente da Figura 4 à 7.

Figura 4 – Fissuração de pilares por dilatação de vigas



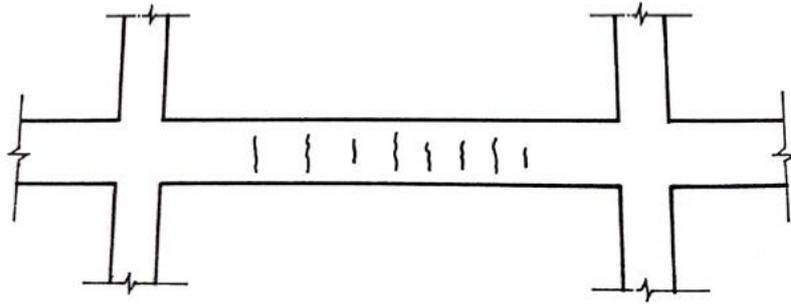
Fonte: Thomaz, 1989.

Figura 5 - Fissuração de viga subarmada submetida à flexão



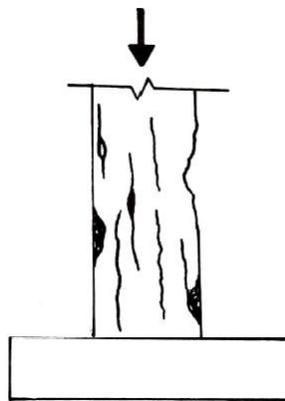
Fonte: Thomaz, 1989.

Figura 6 - Fissuras devido à retração em viga



Fonte: Thomaz, 1989.

Figura 7 - Fissuração em pilar devido à expansão do concreto causada por corrosão



Fonte: Thomaz, 1989.

2.2 BIOCONCRETO

A fissuração do concreto é um fenômeno comum. Sem o tratamento adequado e imediato, as fissuras tendem a se espalhar e eventualmente requerem custos elevados de reparação. Mesmo que seja possível reduzir a extensão destas capilaridades fazendo-se uso de tecnologias avançadas, sua remediação no concreto tem sido matéria de pesquisa durante muitos anos. Há um número expressivo de produtos comercialmente aptos ao reparo destas fissuras: epóxi estrutural, resinas, argamassa epóxi e outras substâncias sintéticas. Estes materiais são frequentemente usados no tratamento de fissuras de concreto. Todavia, como este problema continua a aparecer durante um longo período de tempo, soluções de efeito pontual precisam ser aplicadas repetidas vezes (RAMACHANDRAN et al., 2001).

Tendo isso em vista, começou-se a utilizar bactérias no tratamento de fissuração do concreto, pois elas possuem a capacidade de precipitar carbonato de cálcio, quando expostas a um sal ácido e a um reagente como água ou oxigênio. Mesmo essa utilização de bactérias sendo um método não convencional, ela se baseia no velho conceito de biomineralização, que é um fenômeno natural e frequente. A precipitação de calcita induzida através de bactérias é uma alternativa ambientalmente inócua quando comparada a alternativas como polímeros sintéticos usados atualmente (RAMACHANDRAN et al., 2001).

A utilização de bactérias na autocicatrização faz com que o Bioconcreto seja classificado como método ativo no combate à fissuração. Isso ocorre porque os agentes microbianos estão incorporados à matriz de concreto, reagindo imediatamente ao início do processo de fissuração. Diferentemente de métodos passivos, que só são capazes de agir quando são aspergidos ou injetados na peça estrutural “doente”, o Bioconcreto consegue regenerar-se de forma mais eficiente, principalmente, quando se trata de fissuras internas (SEIFAN et al., 2016).

Mesmo que o concreto já possua uma autocicatrização que lhe é inerente, visto que nem todas as partículas de cimento conseguem ser hidratadas no seu processo de mistura, essa autocura não consegue atingir os patamares do Bioconcreto (JONKERS, 2011). Um agente de auto cicatrização integrado à matriz de concreto pouparia tanto dinheiro como inspeção manual, aumentando a durabilidade do concreto sem fazer uso de produtos poluentes (JONKERS et al., 2010).

Devido às condições extremas no interior da matriz de concreto como, por exemplo: alcalinidade elevada ($\text{pH} > 11$), ausência de nutrientes e ambiente extremamente seco, o agente auto cicatrizante do Bioconcreto deve ser um micro-organismo capaz de resistir a esses fatores.

Certas bactérias, como as do gênero *Bacillus*, são notoriamente conhecidas pela capacidade de resistir a essas condições de agressividade elevada (SEIFAN et al., 2016).

A eficiência de autocicatrização em amostras com fissuras induzidas e impregnadas por esporos bacterianos micro encapsulados foi demonstrada com base nos resultados experimentais da microscopia de luz e no teste de permeabilidade à água. Os corpos de prova com bactérias apresentaram uma taxa de cicatrização muito maior quando comparados aos sem bactérias: 18% a 50% da área de fissura curada em séries não-bacterianas e 48% a 80% da área de fissura curada na série bacteriana. A largura máxima de trincas curada nas amostras da série de bactérias foi de 970 μm , que foi muito maior (cerca de 4 vezes) do que na amostra de série não bacteriana (máx. 250 μm) (WANG et al., 2014).

2.2.1 Trabalhos recentes significativos no desenvolvimento do Bioconcreto

Em 2010, Jonkers et al. desenvolveu um estudo o qual apontava a eficácia da utilização no concreto de bactérias (juntamente com compostos orgânicos) capazes de precipitar carbonato de cálcio com o intuito de induzir o fechamento de fissuras neste material que é amplamente utilizado na construção civil. Ainda neste estudo, o autor apontou uma superioridade do uso do lactato de cálcio em relação aos demais compostos orgânicos, porque este conferia maior resistência à compressão ao concreto em relação aos demais. Entretanto, como observou-se que a viabilidade das bactérias era por volta de 7 dias, visto que, com as reações secundárias de hidratação, os poros do concreto tinham suas dimensões reduzidas podendo até esmagar os micro-organismos, no ano de 2011, Jonkers apresentou um trabalho em que utilizava a argila expandida como cápsula protetora para as bactérias, de modo a mantê-las aptas à regeneração do concreto. Ainda no ano de 2011, Wiktor e Jonkers desenvolveram um estudo no qual apontavam a proporção dos materiais para utilização no traço de Bioconcreto. Em 2013, Dhami et al. utilizou a bactéria *B. cereus* para precipitar calcita e realizou ensaios para mensurar a eficiência deste micro-organismo no fechamento das fissuras, também neste ano, Mors e Jonkers propuseram uma nova metodologia para a impregnação dos agentes bacterianos na argila expandida como uma alternativa à impregnação a vácuo, barateando e simplificando o procedimento. Já em 2014, Wang et al. comprovou, mais uma vez, que os agentes microbianos conferem ao concreto uma maior capacidade de auto cicatrização. Todos estes trabalhos foram determinantes no desenvolvimento do Bioconcreto e influenciaram diversas pesquisas ao redor do mundo, como também este trabalho.

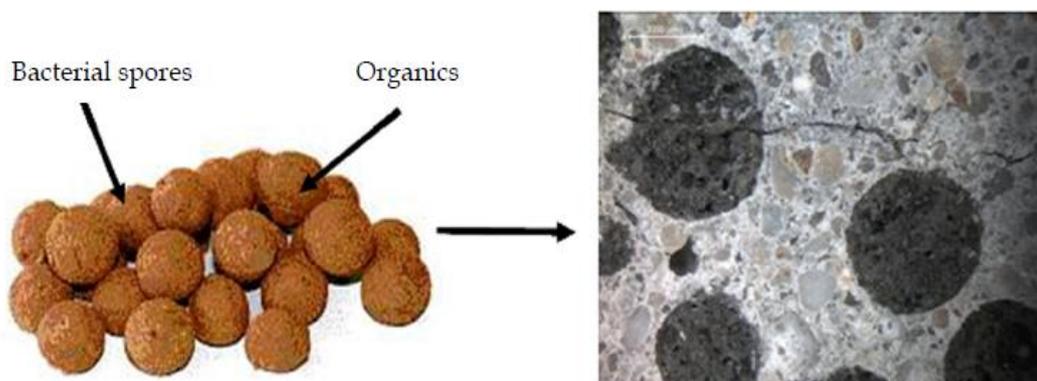
2.2.2 O agregado graúdo: argila expandida

Algumas bactérias possuem a capacidade de sobreviver em estado seco até 50 anos, entretanto, quando misturadas ao concreto, só conseguem resistir de um a dois meses. Isso ocorre devido ao fechamento dos poros do concreto, pois partículas cimentícias não hidratadas no processo inicial de mistura acabam por reagir secundariamente à entrada de água na estrutura e formam, assim, cristais que diminuem os poros a tamanhos menores que $1\ \mu\text{m}$, tamanho médio dos esporos de *Bacillus* (JONKERS, 2011).

Devido ao ambiente hostil no interior do concreto, é preferível encapsular ou imobilizar bactérias em um suporte de proteção antes de adicioná-las ao concreto (WANG et al., 2014). Dessa forma, é preciso proteger esses organismos vivos de serem esmagados pelo preenchimento dos vazios do concreto. É preciso, então, impregnar essas bactérias em argilas expandidas que servem como agregado graúdo ao concreto leve e de cápsula protetora para o agente cicatrizante (JONKERS, 2011).

Na Figura 8, vê-se a cápsula protetora das bactérias, a argila, impregnada por esses agentes microbianos e também pelo composto orgânico. Posteriormente à essa impregnação, é possível utilizar a argila para produzir concreto leve capaz de se regenerar, ou seja, Bioconcreto.

Figura 8 - Argila expandida impregnada com esporos de bactérias e compostos orgânicos para utilização em Bioconcreto



Fonte: Jonkers, 2011.

As microcápsulas são resistentes ao alto pH do concreto e à umidade. Elas são flexíveis sob alta umidade (como na água) e se tornam quebradiças com baixa umidade. Isso significa que as cápsulas podem suportar o processo de mistura e são facilmente quebradas quando as rachaduras aparecem. Após a rachadura, as microcápsulas na zona da rachadura quebram. Na presença de água nas fissuras, os esporos nas cápsulas quebradas podem germinar e precipitar carbonato de cálcio (CaCO_3) para preencher essas aberturas (WANG et al., 2014).

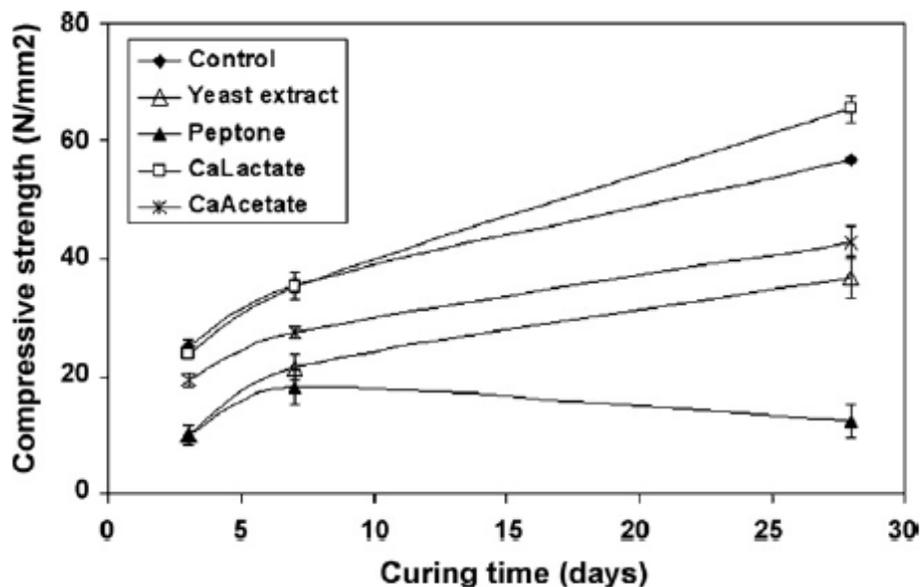
2.2.3 O composto orgânico reagente: lactato de cálcio

Algumas bactérias fazem uso de sais orgânicos (por exemplo, lactato de cálcio) como fonte de energia em reações de conversão metabólica que acabam por produzir cristais de carbonato de cálcio (SEIFAN et al., 2016). A utilização de lactato de cálcio (ou outros sais como acetato de cálcio, peptona e extrato de levedura) no processo de impregnação de agentes biológicos em argila expandida garante o aumento da eficiência do processo de autocura do Bioconcreto. Isso se deve à produção de 6 mols de carbonato de cálcio ao todo quando essas substâncias são misturadas com certas bactérias no líquido de saturação do agregado graúdo (JONKERS, 2011).

Dentre os vários compostos orgânicos mencionados anteriormente, todos resultaram, quando utilizados, em diminuição dramática da resistência à compressão. A única exceção é o lactato de cálcio que resultou em um aumento de 10% na resistência à compressão em comparação com amostras controle (JONKERS et al., 2010).

No gráfico (Figura 9) é possível perceber que o lactato de cálcio realmente se sobressai em relação aos outros sais no que tange à capacidade de conferir mais resistência à compressão para o concreto.

Figura 9 - Resistência à compressão de corpos de prova de controle e de Bioconcreto feitos a partir de fontes de cálcio variadas



Fonte: Jonkers et al., 2010.

Além disso, o uso de lactato de cálcio não promove o ataque de íons cloretos, como é o caso do sal cloreto de cálcio, o que torna sua utilização preferível por não afetar negativamente a durabilidade da estrutura de concreto (SEIFAN et al., 2016).

2.3 BIOMINERALIZAÇÃO

Biomíneralização é o processo pelo qual organismos vivos precipitam minerais inorgânicos na forma de conchas, esqueletos, dentes etc. Este é um fenômeno muito antigo, produzido por seres vivos há milhões de anos e que atrai muita atenção devido a suas potencialidades (XU et al., 2007).

No universo da Biomíneralização, a introdução de produtos metabólicos, liberação de alguns cátions por células, ou até a “construção” de uma parede celular eletricamente carregada, sob certas circunstâncias, induzirão a precipitação de minerais. Quando este fenômeno acontece, dá-se o nome de mineralização biologicamente induzida. Um desses minerais inorgânicos é a calcita ($CaCO_3$) (LOWENSTAM et al., 1989).

A calcita é um dos melhores *fillers* para o concreto devido à sua alta compatibilidade com as substâncias cimentícias. Ela pode ser obtida através de um processo biológico de indução mineral que ocorre na presença de uma fonte de cálcio (SEIFAN et al., 2016).

O $CaCO_3$ microbiano é considerado um material ecológico e econômico, com um potencial promissor para uma ampla gama de aplicações na engenharia, como consolidação e proteção de superfícies de concreto e pedra, reparo de defeitos e falhas (rachaduras), cimentação ou consolidação de partículas soltas (solo e areia) etc. O princípio básico da aplicação da calcita microbiana no concreto autocicatrizante é que bactérias e outros agentes relevantes são adicionados à matriz do concreto durante o processo de mistura. Quando rachaduras aparecem, as bactérias ao redor das superfícies das rachaduras são ativadas (por umidade, O_2 etc.) e precipitam o $CaCO_3$ para preencher as rachaduras (WANG et al., 2014).

Os carbonatos de cálcio precipitados atuam como ligantes entre as partículas soltas do substrato e reduzem os poros no interior de suas partículas, consolidando-os. Essa capacidade das células bacterianas de produzir aglutinantes de calcita as tornou ferramentas úteis hoje em dia para lidar com problemas relacionados à consolidação de materiais de construção (DHAMI et al., 2013).

Algumas bactérias conhecidas como ureolíticas são capazes de produzir e secretar enzimas, as ureases, que promovem a hidrólise da ureia. Essa reação produz íons como a amônia

(NH_4^+), através da qual a célula bacteriana produz energia para sobreviver, e carbonato (CO_3^{2-}) que posteriormente vêm se unir com íons Ca^{2+} produzindo cristais de calcita (REIS, 2017).

A hidrólise da ureia é o método mais usual de se realizar a MICP (do inglês, *Microbial-Induced Carbonate Precipitation*). Os íons Ca^{2+} se ligam à parede celular, que é carregada negativamente e depois os íons CO_3^{2-} se juntam aos anteriores em um processo químico que acaba por matar a célula, mas que produz $CaCO_3$ (REIS, 2017). Uma outra forma de se realizar a MICP que, embora seja menos usual, possui a vantagem de não produzir agentes corrosivos às barras de aço e que ainda consome CO_2 é a conversão metabólica bacteriana de sais ácidos orgânicos como lactato de cálcio e acetato de cálcio (JONKERS, 2011).

Muito embora concretos com altas concentrações de cimento já possuam a capacidade de autocicatrização (JONKERS, 2011), existe uma clara superioridade na eficiência de fechamento de fissuras (cerca de quatro vezes mais) quando se aplicam agentes microbianos voltados para esse intuito na matriz de concreto (WANG et al., 2014). Essa superioridade pode ser vista na Figura 10.

Figura 10–Autocicatrização em corpos de prova de controle (A) e em corpos de prova de Bioconcreto (B)



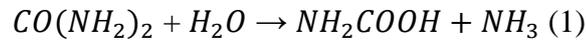
Fonte: Jonkers, 2011.

Portanto, destrinchando-se os métodos mais consagrados de MICP, tem-se:

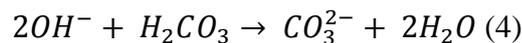
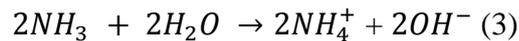
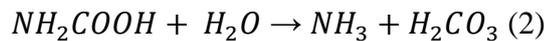
1) Hidrólise de Ureia

Através da hidrólise da ureia, promovida pela atividade bacteriana, é possível produzir um mol de ácido carbâmico e um mol de amônio, como pode ser visto na equação 1. Após a reação inicial, ocorre dessa vez a hidrólise do ácido carbâmico, resultando em um mol de

amônio e um mol de ácido carbônico. Então, o amônio reage com a água, formando dois mols de amônia e dois mols de hidroxila. Depois os dois mols de hidroxila reagem com o ácido carbônico (H_2CO_3), produzindo carbonato (CO_3^{2-}) e água (SEIFAN et al., 2016):



(Micro-organismo)



Por fim, os íons de cálcio (Ca^{2+}) conseguem se ligar à parede celular carregada negativamente e essa, por sua vez, se liga aos carbonatos formados no processo descrito acima, ocorrendo, então, a precipitação do carbonato de cálcio (Figura 11). A precipitação de carbonato de Cálcio ocorre da seguinte forma:

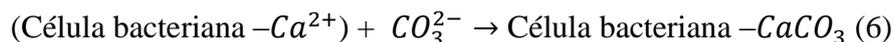
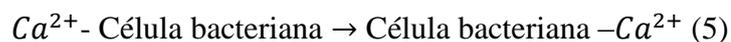
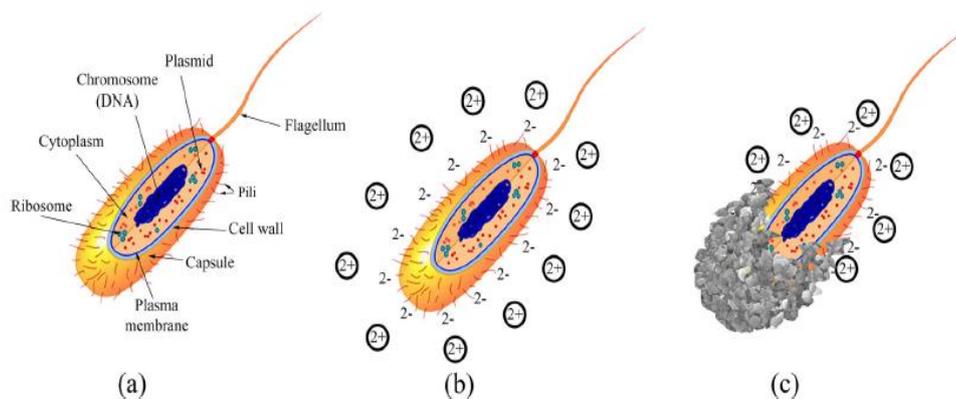


Figura 11– (a) Estrutura bacteriana. (b) Parede celular carregada negativamente e íons positivos em volta. (c) Biomineral produzido pela ligação dos íons à parede celular



Fonte: SEIFAN et al., 2016.

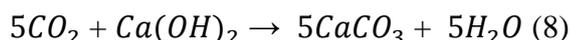
2) Conversão metabólica bacteriana de sais orgânicos

Quando a estrutura passa pelo processo de fissuração, o agregado leve é rompido e o oxigênio entra no concreto, entrando em contato com a bactéria e reagindo de acordo com a seguinte equação (JONKERS et al., 2010):



(Conversão metabólica)

A quantidade de moléculas de cristais de carbonato de cálcio aumenta quando ocorre a reação do dióxido de carbono, produzido anteriormente, com a portlandita ($Ca(OH)_2$) presente no concreto, de acordo com a equação 8 (JONKERS et al., 2010):



Como dito no capítulo 1, Introdução, nesse processo há o consumo de dióxido de carbono (CO_2), tornando-se ecologicamente bastante proveitoso fazer uso dele para precipitar carbonato de cálcio. A indústria da construção civil é responsável direta por boa parte da poluição mundial e, portanto, o uso de bactérias no concreto vem como uma medida de diminuição dos impactos ambientais gerados pelo homem (REIS, 2017).

Além disso, quando comparada ao método anterior, a conversão metabólica permite que a estrutura tenha uma vida útil mais longa, visto que o amônio (NH_3) não é um produto da bioprecipitação. Pode-se afirmar, então, que o consumo de oxigênio e a formação de cristais de carbonato de cálcio evitam a entrada de agentes corrosivos nos poros do material, o que evita a degradação das barras de aço (SEIFAN et al., 2016).

Desse modo, o uso exclusivo de lactato de cálcio e agente microbiano parece ser uma alternativa ecologicamente mais sustentável e que promete uma maior longevidade à estrutura de concreto. É por isso, então, que este método foi escolhido para este trabalho.

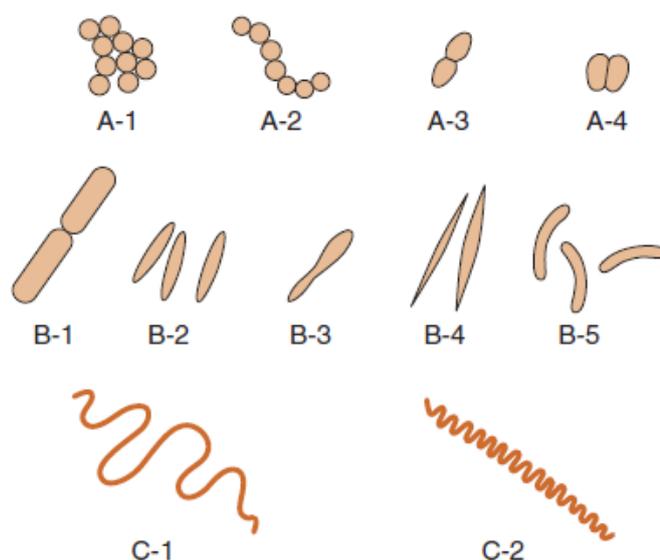
2.4 OS AGENTES MICROBIANOS DO BIOCONCRETO

As bactérias são seres vivos unicelulares extremamente pequenos que apresentam diversas formas e tamanhos. Apesar de se considerar as bactérias como seres potencialmente perigosos para nós humanos e para os demais seres vivos, a verdade é que somente uma pequena fração realmente é perigosa, e grande parte possui diversas aplicações que, sem elas, a vida como conhecemos hoje não seria possível (TORTORA et al., 2012).

O tamanho destes seres varia, de maneira geral, de 1 a 5 μm . As bactérias ainda podem ser classificadas em patogênicas e não patogênicas. O primeiro grupo é aquele capaz de infeccionar seres vivos, acometendo-os com doenças e comprometendo a saúde deles. Já o segundo, não traz consequências maléficas à saúde dos animais. (TRABULSI et al., 2015).

Classificam-se as bactérias em três grupos básicos de acordo com suas formas: cocos, bacilos e espiroquetas (Figura 12). Os cocos têm formato esférico, os bacilos, formato de bastonete e as espiroquetas, espiralado (LEVINSON, 2011).

Figura 12– Morfologia bacteriana. A – Cocos, B – Bastonetes, C – Espiroquetas



Fonte: Levinson, 2011.

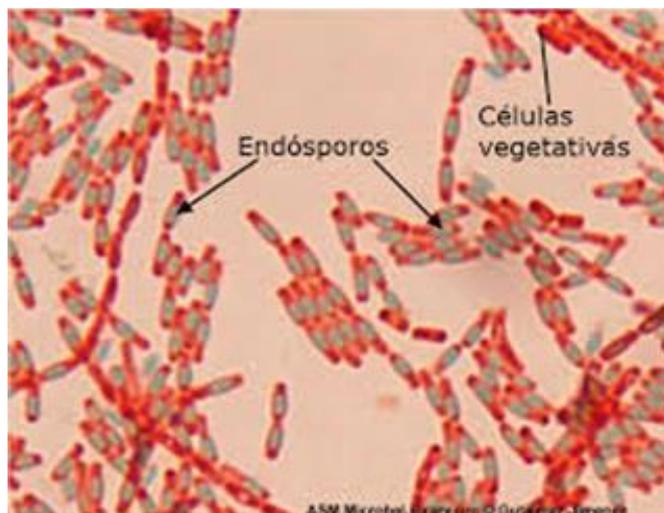
Os bastonetes têm o formato cilíndrico, com extremidades retas, como visto em B – 1 (Figura 12). Dentre estes, há o gênero *Bacillus* (LEVINSON, 2011). Duas espécies deste gênero foram utilizadas neste trabalho (*Bacillus cereus* e *B. subtilis*).

As bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas por possuírem a capacidade de produzir esporos (TRABULSI et al., 2015). Os esporos são estruturas extremamente resistentes que são formadas quando as bactérias estão inseridas em um meio que possui poucos nutrientes – carbono e nitrogênio, ou em condições adversas a multiplicação. Eles não são eliminados com a fervura (100°C), mas somente a 121°C durante 30 minutos. Quando estão na forma de esporos possuem atividade metabólica nula, sendo capazes de sobreviver centenas de anos e quando entram em contato com nutrientes e água conseguem germinar em uma célula vegetativa (LEVINSON, 2011).

Portanto, quando o meio em que a bactéria está inserida se torna um ambiente desfavorável, devido à ausência de água e nutrientes, formam-se endósporos. Essa característica é importante porque, mesmo que a célula na forma vegetativa morra (o que ocorre geralmente a 70°C), os endósporos podem sobreviver a condições térmicas muito mais severas, como ficar durante horas em água fervente (TRABULSI et al., 2015).

Na Figura 13, observa-se a existência de esporos bacterianos e de células vegetativas e que o diâmetro médio de um esporo de *Bacillus* é por volta de 1µm.

Figura 13 - Esporo de *Bacillus* dentro (endósporo) de bactérias (estrutura não corada - verde claro) e célula vegetativa corada em vermelho



Fonte: Nascimento, 2013.

Quando incorporadas à matriz de concreto, as bactérias enfrentam condições extremas, como, por exemplo, alcalinidade elevada. Essa característica é mais forte principalmente em concretos jovens cujo pH varia entre 11 e 13 (JONKERS et al., 2010). Outra dificuldade para esses micro-organismos é que peças estruturais recém concretadas tendem a transferir grandes quantidades de calor, podendo chegar, dependendo do tamanho da peça, à temperatura de 85°C entre os 3 e 4 dias (CARNEIRO et al., 2011). Nestas condições torna-se possível a sobrevivência dos esporos de *Bacillus*, mas é inviável a utilização de outros gêneros menos resistentes de bactérias.

Além dessas características resistivas, alguns micro-organismos são capazes de precipitar cristais como resultado de seu crescimento em *habitats* diferentes. A formação de cristais é atribuída à composição do meio usado no crescimento heterotrófico da bactéria e este é um fenômeno comum na natureza. O crescimento heterotrófico de diferentes gêneros de bactérias tais como *Bacillus*, *Arthrobacter* e *Rhodococcus* em sais ácidos orgânicos (acetato, lactato, citrato, succinato, oxalato, malato e glioxilato) resulta na produção de carbonato. Essas bactérias utilizam compostos orgânicos como fonte de energia. Baseado nas fontes de sais e carbonos presentes no meio, essas bactérias são capazes de produzir vários cristais como carbonato de cálcio e carbonato de magnésio. Os gêneros *Bacillus* e *Arthrobacter* acima mencionados são capazes, ainda, de fazer isso em meio alcalino. (SEIFAN et al., 2016).

Em conclusão, pode-se afirmar que as bactérias do gênero *Bacillus* são candidatas promissoras a agente de autocicatrização do concreto e provavelmente de outros materiais cimentícios. Isso ocorre porque os esporos bacterianos incorporados ao material cimentício são

capazes de converter lactato de cálcio incorporado em carbonato de cálcio, após a ativação pela entrada de nutrientes nas fissuras (JONKERS et al., 2010).

2.4.1 *Bacillus subtilis*

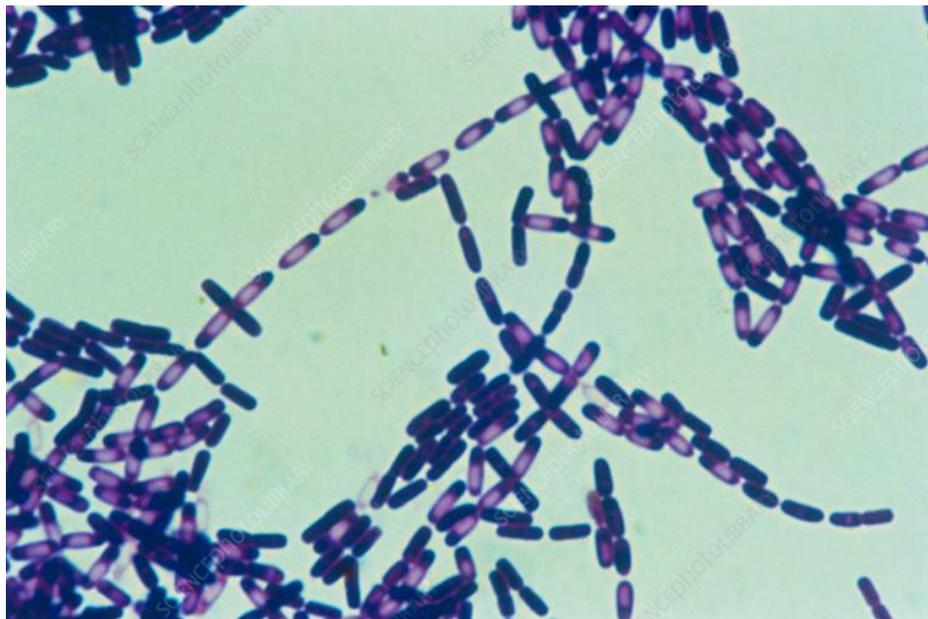
As bactérias *B. subtilis* tem como habitat o solo, mas podem, ainda, viver nas raízes e tecidos das plantas, onde conseguem se proteger de outros seres vivos. Além disso, promovem o crescimento das plantas através do aumento da fixação de nitrogênio e nutrientes e também conseguem controlar as enfermidades desses vegetais. (LANNA FILHO et al., 2010).

B. subtilis é uma bactéria muito resistente, sendo esta característica encontrada justamente por conseguir realizar o processo de esporulação. Esta bactéria é utilizada inclusive como indicador biológico de eficiência do processo de esterilização por calor seco. Após a esterilização do meio, se não houver crescimento dos esporos, significa dizer que o meio está estéril (TRABULSI et al., 2015).

Além de resistente, esse micro-organismo possui a capacidade de induzir a precipitação de carbonato de cálcio assim como outras espécies de *Bacillus*, por exemplo: *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis*, *B. cohnii* e *B. lentus* (OMOREGIE, 2016).

Na Figura 14, observa-se uma das formas de aparição deste micro-organismo na natureza.

Figura 14– Agrupamentos em cadeia de *Bacillus subtilis* pela coloração de Gram



Fonte: Durham, 2020.

Quando aplicada de forma direta, ou seja, sem cápsula protetora, a *B. subtilis* é capaz de fechar fissuras de até 85nm e aumentar a resistência à compressão em 16,6%. Já, sob mesmas condições, *B. cereus*, possui a capacidade de aumentar a resistência à compressão em 27,8% e uma capacidade ainda não determinada de preenchimento de aberturas (CASTRO-ALONSO et al., 2019).

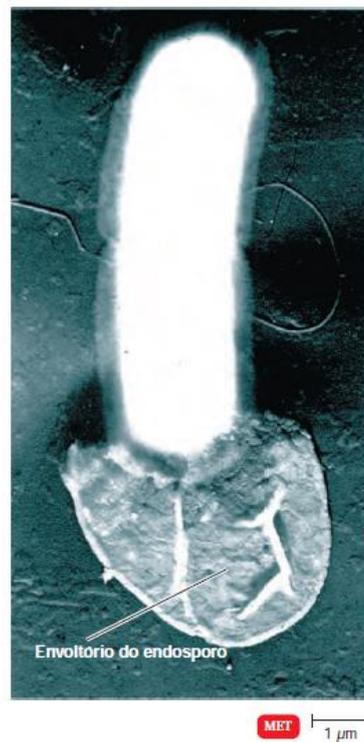
2.4.2 *Bacillus cereus*

As bactérias *B. cereus* são comumente encontradas no solo e são facilmente espalhadas para muitos tipos de alimentos, especialmente de origem vegetal (arroz e macarrão), mas também são frequentemente isoladas de carne, ovos e laticínios. Infelizmente, este micro-organismo está relacionado a diversos casos de intoxicação alimentar por todo o mundo (GRANUM & LINDBÄCK, 2013).

Devido à resistência de seus esporos e à capacidade das células vegetativas de secretar enzimas capazes de degradar muitos materiais orgânicos, o gênero *Bacillus* representa indiscutivelmente o grupo de bactérias mais importante comercialmente. Dentro deste gênero destaca-se *B. cereus* na indústria farmacêutica de probióticos graças a sua capacidade de formar esporos incrivelmente resistentes ao calor (KRAMER & GILBERT, 1989).

Na Figura 15, percebe-se uma nova célula vegetativa da bactéria *B. cereus* saindo do esporo que a gerou.

Figura 15 - *Bacillus cereus* "eclodindo" do endósporo



Fonte: Tortora et al., 2012.

Além de sua já consagrada aplicabilidade industrial e comercial, *B. cereus* vem demonstrando um grande potencial de aplicabilidade também na área de biorremediação. De um estudo comparativo com 25 micro-organismos, apenas *B. carotarum*, *B. cereus*, *B. lentus*, e *B. licheniformis* demonstraram ser resistentes aos metais pesados: chumbo, zinco e cromo. Esta característica ratifica ainda mais a alta resistência dessa bactéria (GUPTA et al., 2014).

Muito embora exista um histórico de patogenicidade por parte deste micro-organismo, visto que isolados de *B. cereus* é capaz de produzir toxinas que causam diarreia. Isto ocorre porque esses isolados são pouco agressivos e possuem a capacidade de decompor substâncias orgânicas, vivendo, assim, harmonicamente no corpo de outros animais (SAVINI, 2016). Estas características torna possível o uso seguro deste ser vivo e também aumenta as chances de encontrá-lo mais facilmente em remédios, por exemplo. Desse modo, *B. cereus* é uma candidata promissora ao uso em Bioconcreto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

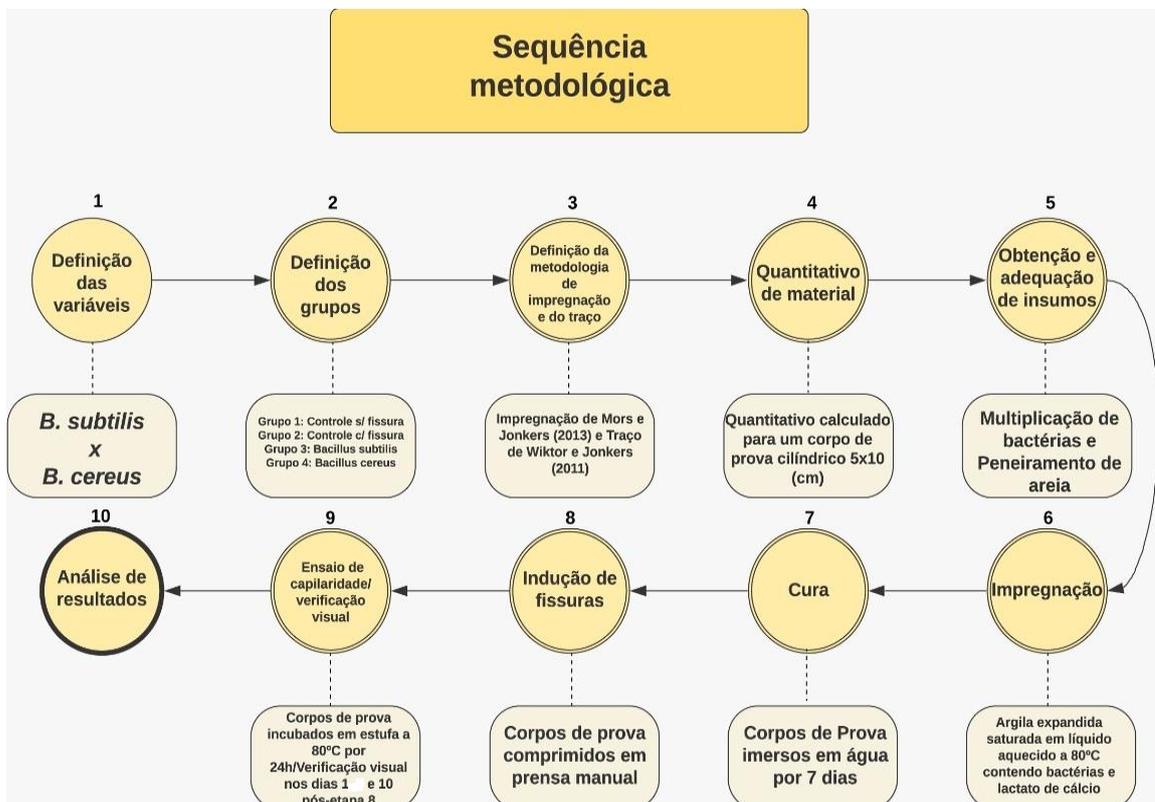
3.1 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa realizou-se no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia, no Centro de Ciências da Saúde e no Laboratório de Reologia do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, no Centro de Tecnologia, ambos localizados na Universidade Federal da Paraíba.

3.2 PREPARO DOS CORPOS DE AMOSTRAGEM E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A sequência metodológica utilizada pode ser visualizada na Figura 16, que apresenta um fluxograma em forma de resumo com todas as etapas do processo. As etapas de 1 a 4 compreendem o planejamento experimental, enquanto que as etapas de 5 a 9 compreendem o procedimento experimental propriamente dito.

Figura 16 - Fluxograma da sequência metodológica



Fonte: Autor, 2020.

Os corpos de prova foram definidos de modo a se comparar não somente os agentes microbianos entre si, como também com corpos de prova não impregnados por bactérias. Devido ao ensaio de capilaridade por absorção, foi adicionado o tratamento 1, que não possuía agentes microbianos e nos quais não seriam induzidas fissuras. Os tratamentos e seus componentes podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1 – Tratamentos utilizados na confecção do Bioconcreto

Tratamentos	Cimento CP II Z 32 RS	Areia fina	Argila expandida	Lactato de cálcio	<i>B.</i> <i>subtilis</i>	<i>B.</i> <i>cereus</i>	Fissuras
1	X	X	X	X			
2	X	X	X	X			X
3	X	X	X	X	X		X
4	X	X	X	X		X	X

Fonte: Autor, 2020.

A metodologia de Mors e Jonkers (2013) foi escolhida, visto que esta surge como uma alternativa à impregnação a vácuo que, embora seja mais eficiente, é muito mais custosa e de difícil acesso. Essa técnica alternativa é muito mais viável de ser executada, requisitando equipamentos menos caros e complexos, por isso foi escolhida para este estudo. O método consiste em imergir a argila expandida em um líquido de saturação composto por bactérias e lactato de cálcio. Nesse processo, o líquido de saturação é aquecido a 80°C, durante 30 minutos.

Devem ser respeitadas as seguintes concentrações:

- 1) 2kg de argila expandida para cada 1,5 l de água;
- 2) 350g de lactato de cálcio para cada l de água.

O traço de Bioconcreto utilizado neste trabalho, que é igual ao de Wiktor e Jonkers (2011), corresponde, em massa, a 1:2,41:0,76 – 0,5, podendo ser visualizado na Tabela 2.

Tabela2 - Traço utilizado para produção de Bioconcreto

Proporção de materiais dos corpos de prova	
Materiais	Massa (g)
Cimento	384
Água	192
Areia fina (0,125 mm - 1 mm)	929
Argila expandida (1-4 mm)	292
Relação a/c	0,5

Fonte: Wiktor e Jonkers, 2011.

Este quantitativo de materiais foi utilizado para corpos de prova prismáticos de dimensões 4x4x16 (cm), enquanto que as dimensões utilizadas neste trabalho foram as do corpo de prova cilíndrico 5x10 (cm). Portanto, na etapa 4, fez-se necessário adaptar o quantitativo de materiais do trabalho para um corpo de prova de volume menor. Desse modo, tem-se:

$$R = \frac{V1}{V2} \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo:

R = razão de proporcionalidade;

V1 = Volume do corpo de prova utilizado neste trabalho;

V2 = Volume do corpo de prova utilizado no trabalho de Wiktor e Jonkers (2011).

Neste caso, como V1 é um corpo de prova cilíndrico, tem-se que:

$$V1 = \left(\frac{\pi \times D^2}{4} \right) \times h \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo:

V1 = Volume do cilindro;

D = Diâmetro do cilindro;

h = Altura do cilindro.

Portanto:

$$V1 = \left(\frac{\pi \times 5^2}{4} \right) \times 10 = 196,25 \text{ cm}^3$$

Para V2, que é prismático, tem-se:

$$V2 = b \times h \times l \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo:

B = base do prisma;

H = altura do prisma;

L = largura do prisma.

Portanto:

$$V2 = 4 \times 4 \times 16 = 256,00 \text{ cm}^3$$

Desse modo:

$$R = \frac{196,25}{256,00} = 0,77$$

A razão de proporcionalidade “R” foi utilizada, então, para encontrar o quantitativo de material utilizado neste estudo, multiplicando-se esta razão pela quantidade de cada insumo da Figura 18. Para achar o valor de cada material por tratamento, multiplicou-se o resultado anterior por 4 (número de corpos de prova por tratamento). Por fim, o somatório final por insumo (Massa total) foi encontrado pela multiplicação da Massa por grupo vezes o número de grupos (4). Desse modo, a quantidade de material ficou de acordo com a Tabela 3:

Tabela 3 – Quantitativo de material para produção de 16 corpos de prova em Bioconcreto

Material	Massa por corpo de prova (g)	Massa por grupo (g)	Massa total (g)
Cimento	295	1178	4712
Areia	713	2850	11401
Argila expandida	224	896	3583
Relação a/c		-0,5-	

Fonte: Autor, 2020.

No caso do lactato de cálcio, a massa por grupo foi encontrada da seguinte forma:

- 1) Concentração de argila expandida de acordo com metodologia de impregnação de Mors e Jonkers (2013): 2kg para 1,5 l de água, o que corresponde a 1,33kg/l.
- 2) Volume do líquido de saturação por grupo, encontrado da seguinte maneira:

$$\frac{\text{Massa de argila expandida (Tabela 3)}}{\text{Concentração de Mors e Jonkers (2013)}} = \frac{896 \text{ g}}{1333 \text{ g/l}} = 0,674 \text{ l}$$

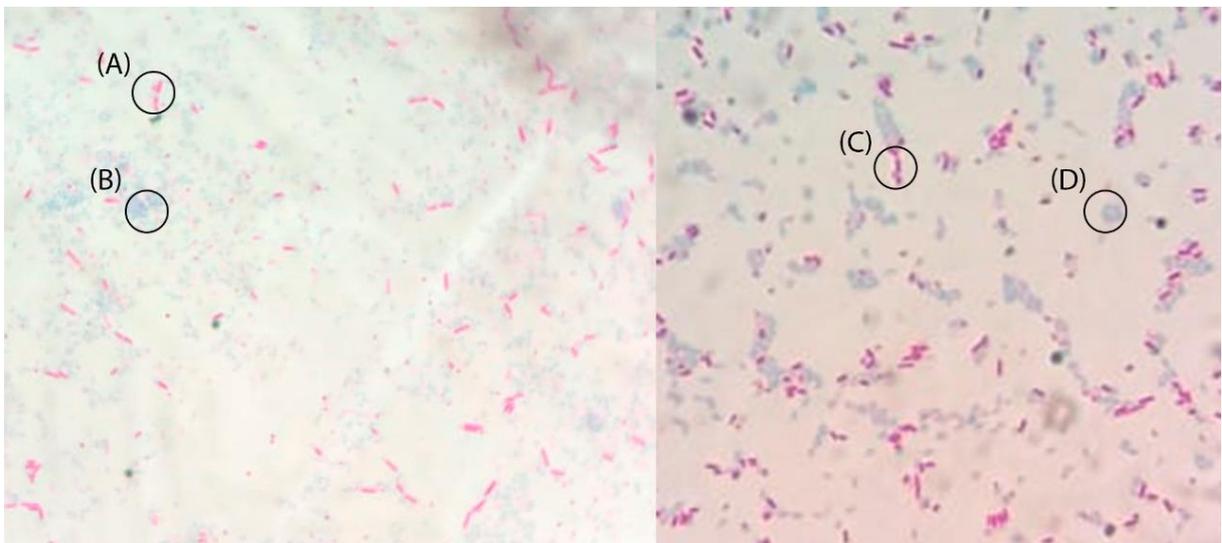
- 3) Concentração de lactato de cálcio de Mors e Jonkers (2013), 350 g/l, multiplicada pelo volume do líquido de saturação, 0,674 l, portanto:

$$\text{Massa por grupo} = \frac{350 \text{ g}}{\text{l}} \times 0,674 \text{ l} = 236 \text{ g.}$$

3.2 PREPARO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

As bactérias *Bacillus subtilis* e *B.cereus* foram cedidas pelo CCS (Centro de Ciências da Saúde) e pelo Cbiotec (Centro de Biotecnologia) ambos da UFPB, que as mantinham em sua coleção. A *B. subtilis* (linhagem UFPEDA 16), foi multiplicada em laboratório em placa de Petri contendo meio agar-nutritivo incubada em estufa a 37°C durante 48 horas. As bactérias *B. cereus*, foram multiplicadas a partir do Biovicerin (probiótico). As bactérias e seus esporos podem ser visualizados na Figura 18. Esta imagem foi obtida com o auxílio do microscópio Olympus CX 41. Observa-se na imagem (com ampliação de 1000 vezes) a presença das bactérias em cor rosa (vegetativa) e de seus esporos que estão na cor azul.

Figura 17 - Bactérias *Bacillus cereus* (A) e seus esporos (B); Bactérias *Bacillus subtilis* (C) e seus esporos (D)



Fonte: Autor, 2020.

3.3 EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO

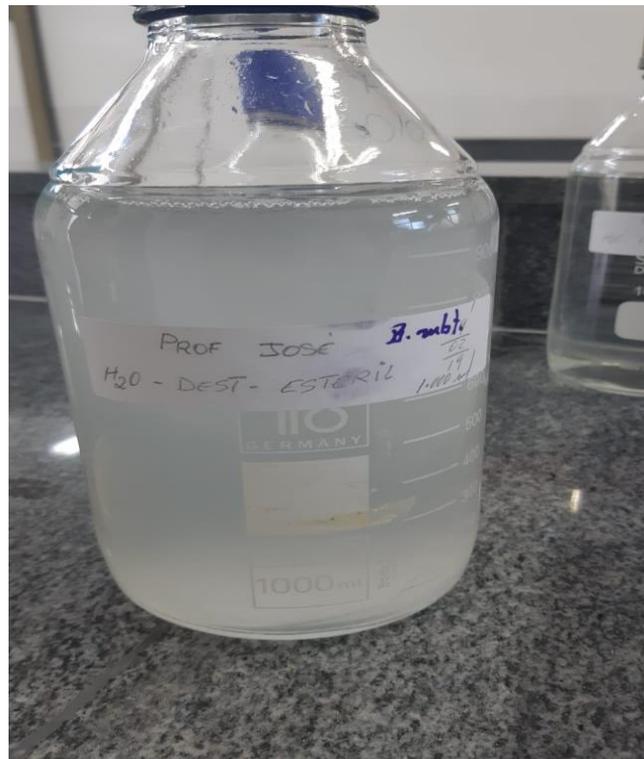
Partindo do quantitativo apresentado na Tabela 2, adquiriu-se os materiais necessários para a produção do Bioconcreto. Os materiais da Tabela 1 foram adquiridos na ordem que se segue e depois adequados ao uso neste trabalho, definindo a quinta etapa:

- 1) Agregado graúdo: argila expandida, tipo 2215 que possui granulometria de 15 mm a 22 mm. Essa granulometria é superior àquela utilizada no traço de Wiktor e Jonkers (2011);
- 2) Lactato de cálcio: adquirido em um laboratório especializado;

3) Areia fina: foram coletados 12kg de areia fina no LABEME (Laboratório de Ensaaios de Materiais e Estruturas) da UFPB (Universidade Federal da Paraíba) e peneirados no conjunto de peneiras compostos pelas peneiras 16 *mesh* e 140 *mesh*. Como estas peneiras possuem aberturas em milímetro de 1,19mm e 0,105mm, respectivamente, foi possível utilizar um agregado miúdo bastante similar ao utilizado no traço de Wiktor e Jonkers (2011);

Na sexta etapa ocorreu o procedimento de impregnação que foi realizado no Laboratório de Microbiologia do CCS, UFPB. Para este procedimento, o material de cada tratamento foi dividido em duas partes, sendo colocados em recipientes com 1 l de volume (frascos de Erlenmayer e os de vidro com tampa de rosca). Após essa divisão, preparou-se uma suspensão com as bactérias em água destilada esterilizada, em cada recipiente, na concentração de 3×10^8 UFC/mL (Figura 19). A concentração foi obtida, tomando-se o tubo 1 da escala de MacFarland (esta escala demonstra o grau de turbidez do líquido, indicando sua concentração bacteriana).

Figura 18- Suspensão bacteriana correspondente concentração de concentração de 3×10^8 UFC/mL



Fonte: Autor, 2020.

Em seguida, a suspensão bacteriana foi aquecida a 80°C sob agitação constante, de aproximadamente 20rpm. Então, adicionou-se à mistura 236g de lactato de cálcio e, dois minutos depois, a argila expandida. O processo de impregnação pode ser visto na Figura 20.

Figura 19 - Argila expandida após a mistura das bactérias e lactato de cálcio



Fonte: Autor, 2020.

Como a mistura acabou endurecendo bastante no processo de impregnação, foi necessário usar hastes metálicas e flexíveis para retirar as argilas expandidas que acabaram por aderir à substância esbranquiçada.

Assim, tendo sido realizado o procedimento de impregnação e a retirada das argilas expandidas dos recipientes, deu-se continuidade ao experimento. O próximo passo foi misturar os agregados ao aglomerante para que, desse modo, fosse produzido concreto e posteriormente ocorresse a moldagem dos corpos de prova. A mistura ocorreu em recipiente plástico e de forma manual, na seguinte sequência: água, argila expandida, areia fina e cimento. A sequência ocorreu dessa forma a fim de se diminuir a resistência do líquido de saturação que continha as argilas expandidas. Como o processo de mistura ocorreu de forma manual, a princípio o concreto encontrava-se extremamente difícil de se homogeneizar, o que levou à adição de 40mL de água, elevando a relação água/cimento para 0,53. Essa mudança foi repetida para todos os tratamentos, de forma que o traço continuou igual para todos.

Além disso, como o agregado graúdo utilizado neste trabalho possui granulometria bem superior à proposta por Mors e Jonkers (2013), ocorreu uma sobra excessiva de concreto em cada tratamento, o que levou à moldagem de um corpo de prova adicional, para cada um dos quatro tratamentos, que não foi usado como parâmetro na pesquisa. Essa unidade excedente somente foi usada para se testar a força necessária para se induzir as fissuras nos corpos de prova sem que houvesse sua ruptura total.

Desse modo, foram moldados ao todo 20 corpos de prova (4 tratamentos com 5 repetições em cada), que podem ser visualizados na Figura 19. Percebe-se nitidamente pela imagem que ocorreu segregação do agregado graúdo em relação à pasta de argamassa em algumas unidades.

Figura 20 - Corpos de prova de Bioconcreto após moldagem

Fonte: Autor, 2020.

Na sétima etapa, os corpos de prova passaram pelo processo de cura, ficando imergidos em água durante sete dias. Ao fim da cura, ficaram prontos para que fossem induzidas fissuras nos tratamentos 2, 3 e 4 por meio de prensa manual, compreendendo a oitava etapa. Por fim, na nona e última etapa, ocorreram as verificações visuais nos dias 1 e 10 pós-aberturas de fissuras e, ao fim dessas verificações, foi realizado um ensaio não normatizado de absorção de água, visto que o volume (inferior ao mínimo requerido pela norma) e o formato (deformado) dos corpos de prova impediam a realização de um ensaio regido pela ABNT NBR 9779 (2012). Dessa forma, os corpos de prova foram incubados em estufa a 80°C, mesma temperatura do processo de impregnação, a fim de se diminuir sua umidade, durante 24 horas. Depois, foram retirados da estufa e colocados sobre lâmina d'água durante duas horas. As massas secas e posteriormente as massas úmidas foram medidas, a fim de se mensurar a quantidade de água absorvida por cada tratamento e assim, gerar um indicador de preenchimento de fissuras, mesmo que não tenham sido seguidos os padrões da ABNT NBR 9779 (2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 PROCESSO DE IMPREGNAÇÃO, CURA E INDUÇÃO DE FISSURAS EM BIOCONCRETO

Percebeu-se que o líquido de saturação aquecido, somado ao lactato de cálcio, formou uma mistura branca pastosa que depois de algum tempo endureceu. Entretanto, houve um maior endurecimento da mistura nos frascos tampados em relação aos frascos abertos. Enquanto que os fechados levaram, em média, uma hora para formar uma substância homogênea esbranquiçada, os abertos levaram poucos minutos para isso. Os líquidos de saturação bacterianos demoraram ainda mais tempo para chegar a esse estado.

Esta observação permite inferir que o ar presente no meio externo e também as bactérias exercem algum tipo de influência no processo de impregnação aumentando o tempo para o endurecimento da mistura. Esta característica faz com que o ar e as bactérias funcionem como uma espécie de “retardadores de pega” do líquido de saturação e é importante conhecê-la, pois torna-se possível impregnar a bactéria e o lactato de cálcio em recipientes mais frágeis, como o vidro, e depois despejar a mistura em uma bandeja feita em material mais resistente, como o alumínio, para que a argila descansa, absorvendo os materiais.

Outra observação importante percebida foi a influência das bactérias na capacidade do líquido de saturação diluir o lactato de cálcio, ocorrendo, assim, nos recipientes que continham as bactérias, uma visível concentração de lactato de cálcio no fundo do frasco. Posteriormente, devido a isso e ao endurecimento já mencionado, alguns frascos de Erlenmeyer se romperam quando tentou-se retirar a argila expandida da mistura endurecida. Isso ratifica ainda mais a importância de se conhecer que o isolamento do recipiente em relação ao meio externo retarda o endurecimento do líquido de saturação. Na Figura 20, vê-se um dos frascos de Erlenmeyer que não resistiu às tensões provocadas pela tentativa de se retirar a argila expandida deste recipiente, como também a deposição excessiva de lactato de cálcio que ocorreu no fundo do frasco. Também é possível notar (à esquerda) um processo de embranquecimento mais acelerado no recipiente aberto em relação ao fechado.

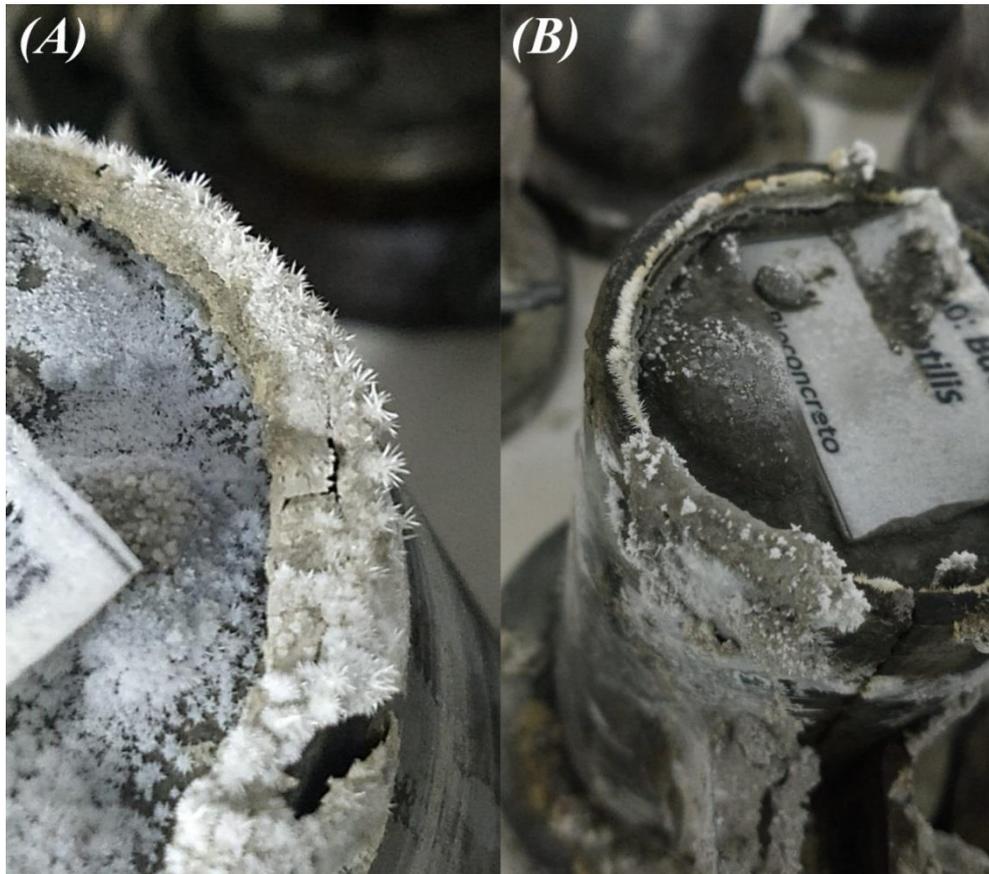
Figura 22– Frasco de Erlenmeyer quebrado contendo *Bacillus cereus* (A). Diferença na velocidade de embranquecimento da mistura (B)



Fonte: Autor, 2020.

Além dessas observações, foi constatado, poucas horas após o procedimento de moldagem ter se encerrado, o aparecimento de cristais em formato de agulha (Figura 21) em todos os corpos de prova dos tratamentos. Como ocorreu em todos os tratamentos, fica evidenciado que se trata de um produto do lactato de cálcio e não de um produto bacteriano. Ainda assim, ficou demonstrada a eficácia do processo de impregnação proposto por Mors e Jonkers (2013), que permite a existência dos materiais impregnados mesmo após a mistura da argila expandida com água, areia e cimento.

Figura 23 – Surgimento de cristais nos corpos de prova nas repetições com *Bacillus cereus* (A) e *Bacillus subtilis* (B)



Fonte: Autor, 2020.

Em relação ao processo de cura, observou-se, mesmo após sete dias imersos em água, que os corpos de prova bacterianos ainda apresentavam um estado não endurecido. Este fato levou à perda de um corpo de prova do tratamento 3 (*B. subtilis*) e da deformação de outros nos tratamentos com as duas bactérias, quando tentou-se realizar o processo de capeamento. Percebe-se que neste caso a bactéria agiu como um retardador de pega, dificultando a reação de hidratação do cimento. Provavelmente, o tempo de cura adotado foi insuficiente para os grupos bacterianos.

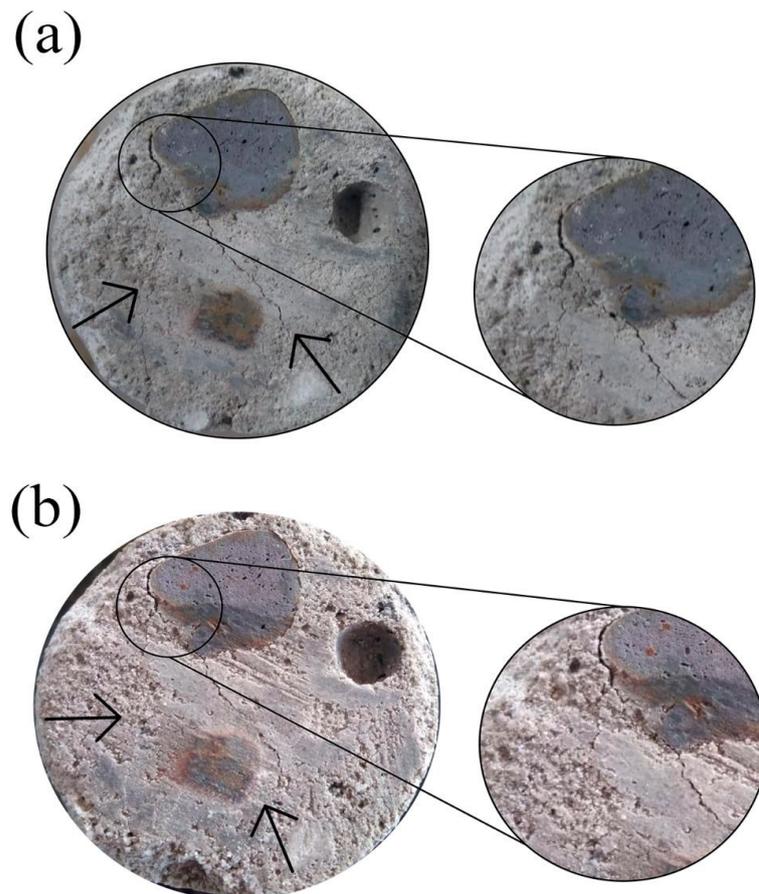
Desse modo, quando foram à prensa, os corpos de prova bacterianos do tratamento 4 (*B. cereus*) apresentaram as primeiras fissuras quando foram aplicadas cargas de 30 a 40kg. Já o tratamento 3 (*B. subtilis*) apresentou as primeiras fissuras com a aplicação de cargas de 50 a 60kg. Por fim, o tratamento 2 (controle) foi capaz de resistir a cargas de até 1000kg até que as primeiras fissuras fossem induzidas, o que demonstrou a baixa capacidade resistiva dos tratamentos com bactérias à compressão neste estudo. Muito embora o estudo da resistência à compressão não seja objeto deste trabalho, segundo JONKERS et al. (2010) o binômio bactéria-lactato de cálcio é capaz de aumentar a resistência à compressão, todavia nesta pesquisa obteve-

se um resultado divergente. Isto deve ter ocorrido, muito provavelmente, por conta do tipo de impregnação utilizada (o autor referido utilizou a impregnação a vácuo).

4.2 AVALIAÇÃO VISUAL NA RECUPERAÇÃO DO BIOCONCRETO

Observa-se, na Figura 22, que ocorreu uma diminuição nas espessuras das fissuras provocadas no corpo de prova do tratamento 4 (*B. cereus*), sendo mais visível a redução da fissura maior. Em (a) é possível perceber o tamanho original das fissuras no primeiro dia de vida do concreto e em (b) vê-se estas mesmas rachaduras 10 dias depois. No entanto, devido ao fato de ter sido feito o acompanhamento sem o auxílio de aparelhos adequados, não foi possível mensurar a intensidade da regeneração, obtendo-se então apenas uma análise visual qualitativa.

Figura 21 - Fissuras provocadas em corpo de prova contendo *B.cereus* sendo (a) 1 dia de vida e (b) 10 dias de vida



Fonte: Autor, 2020.

Na Figura 23, percebe-se o mesmo efeito de redução de fissuras em corpo de prova do tratamento3 (*B. subtilis*). Contudo, não é perceptível um avanço na redução das fissuras de

forma tão significativa na Figura 24, que corresponde ao tratamento 2 (corpos de prova de controle com fissuras). Isso ratifica os resultados de Jonkers (2011), que observou o preenchimento das fissuras, em repetições bacterianas imersas em água durante duas semanas. Porém, neste trabalho, não se visualizou o fechamento total dessas rachaduras, provavelmente, devido ao menor tempo de ação, ou seja, em apenas dez dias.

Figura 22 - Fissuras provocadas em corpo de prova com *B. subtilis* sendo (a) 1 dia de vida e (b) 10 dias de vida

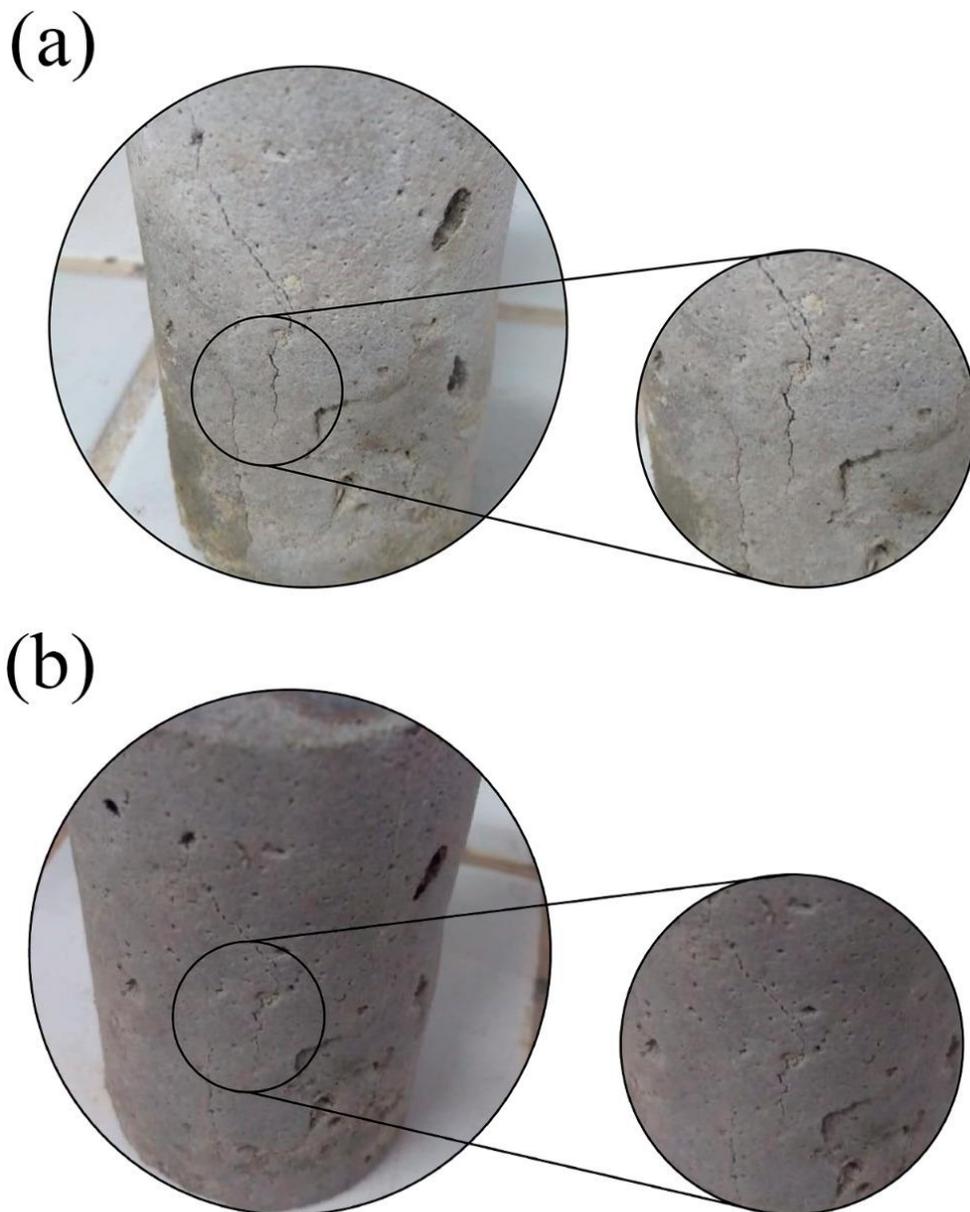
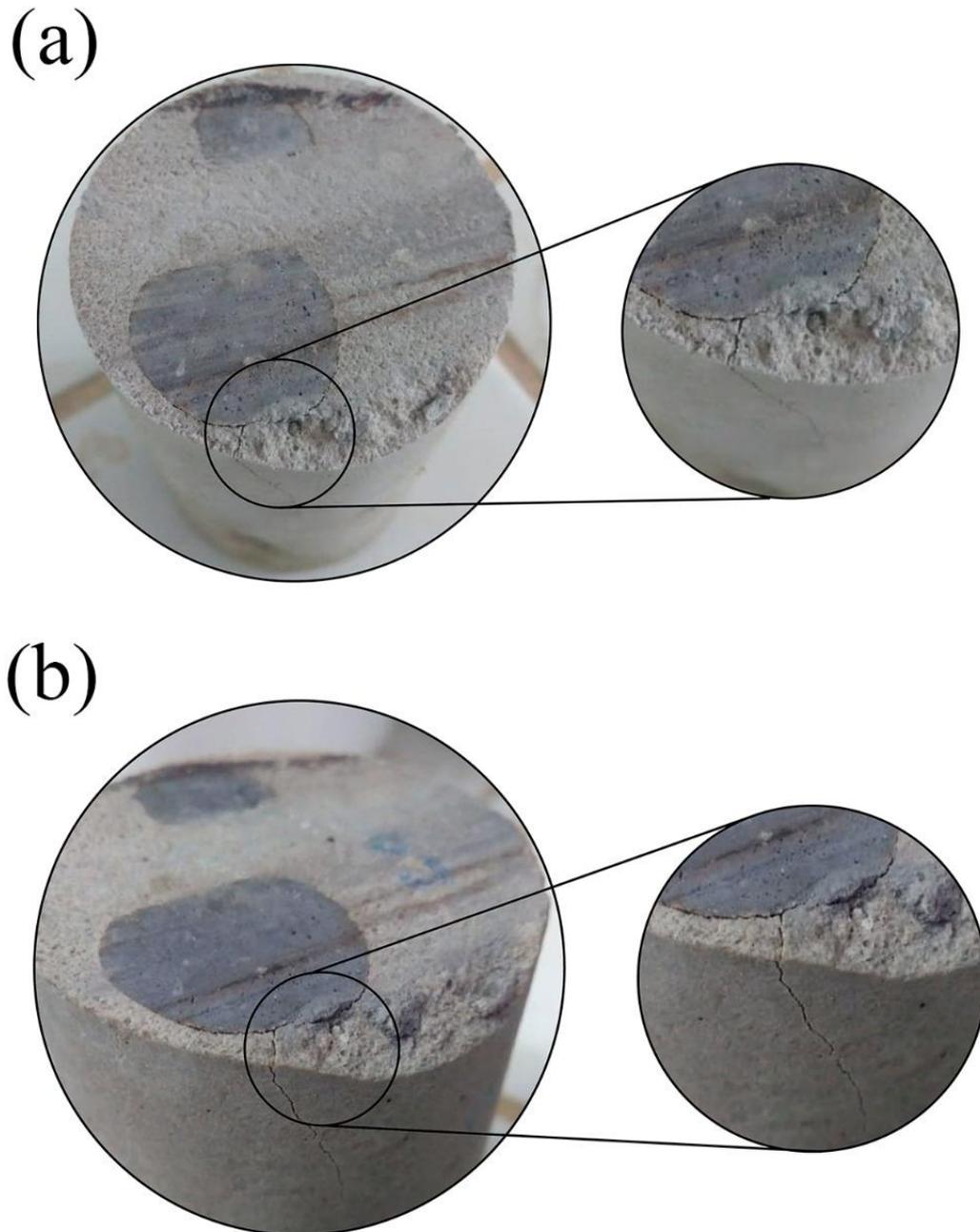


Figura 23 - Fissuras provocadas em corpo de prova no tratamento controle sendo (a) 1 dia de vida e (b) 10 dias de vida



Fonte: Autor, 2020.

Pela verificação visual, em face do tempo de ação e da não utilização de equipamentos adequados, não se tem um resultado conclusivo quanto à comparação de eficiência no preenchimento das fissuras entre as duas bactérias (*B. cereus* x *B. subtilis*). Somente é possível observar que os corpos de prova com bactérias foram mais eficazes do que os sem bactérias.

Como dito no item 2.4.1, Castro-Alonso (2019) apontou em seu estudo bibliográfico sobre Bioconcreto que quando aplicada sem cápsula protetora, a *B. subtilis* é capaz de fechar fissuras de até 85nm e a *B. cereus* possui uma capacidade ainda não definida de preenchimento de aberturas. Uma outra bactéria deste gênero, a *B. alkalinitrilicus*, de acordo com Wiktor e Jonkers (2011) é capaz de preencher fissuras até 0,46 mm. Contudo, análises comparativas entre esses micro-organismos mais aprofundadas ainda precisam ser feitas em maior quantidade para que seja possível balizar trabalhos futuros.

Nesse sentido, o ensaio de absorção de água por capilaridade surge como um indicador fundamental na comparação, fornecendo dados mais precisos, a fim de se depreender que não somente as diferenças dos tratamentos com bactérias em detrimento dos demais, como também diferenças de um tratamento bacteriano em relação ao outro.

4.3 ENSAIO DE ABSORÇÃO DE ÁGUA POR CAPILARIDADE (NÃO NORMATIZADO) EM BIOCONCRETO

O indicador utilizado neste trabalho para mensurar e comparar a regeneração dos corpos de prova foi o ensaio de absorção de água por capilaridade (não normatizado). Visto que a ascensão capilar é dada pelo inverso do diâmetro do poro, quanto mais água adentra na matriz de concreto, menores as dimensões dos interstícios dos corpos de prova. Observou-se que, após duas horas sobre lâmina d'água, os tratamentos com bactérias apresentaram maior altura de ascensão capilar. Essa constatação foi corroborada pela medição (e comparação) das massas secas e úmidas que indicou um maior ganho de massa nas repetições com bactérias. Observou-se que a altura de ascensão capilar do tratamento 3 (*B. subtilis*) atingiu o topo do corpo de prova, enquanto nos demais tratamentos esta ascensão não foi tão significativa. Este resultado indica que pode haver uma maior eficiência de regeneração do Bioconcreto quando foi utilizada a bactéria *B. subtilis* em relação à *B. cereus*.

Na Tabela 3, observa-se as medições das massas secas dos quatro corpos de prova de cada tratamento e posteriormente da massa úmida. Também foi possível observar o aumento na massa, que indica a ascensão capilar, dada pela razão entre a média 2 sobre a média 1.

Tabela 3 – Valores do ensaio de absorção de água por capilaridade (não normatizado)

Corpo de prova	Massa seca (g)			
	Tratamento 1 (controle sem fissuras)	Tratamento 2 (controle com fissuras)	Tratamento 3 (<i>B.subtilis</i>)	Tratamento 4 (<i>B.cereus</i>)
1	290,1	282,7	270,8	256,3
2	246,0	236,2	257,7	220,3
3	281,4	250,4	262,2	221,2
4	261,4	262,0	267,5	221,8
Média 1	269,7	257,8	264,6	229,9
Massa úmida (g)				
1	295,6	293,3	299,4	293,7
2	251,4	255,6	273,2	255,6
3	293,8	255,6	275,8	256,4
4	265,0	289,1	279,9	257,8
Média 2	276,4	273,9	282,0	265,9
Média 2/Média1	1,025	1,062	1,066	1,157

Fonte: Autor, 2020.

Diferentemente de Wang et al. (2014), que observou uma capacidade regenerativa até quatro vezes maior nos tratamentos com bactérias em relação aos controle, neste trabalho percebeu-se uma superioridade até duas vezes e meia maior. Esta observação pôde ser feita a partir da comparação do resultado do acréscimo de massa no tratamento 4, utilizando *B. cereus*, (15,7%) e do acréscimo no tratamento 2 (6,2%).

5. CONCLUSÃO

No que tange à verificação visual do preenchimento das fissuras, observa-se que as bactérias testadas são eficazes na regeneração de fissuras quando usadas em Bioconcreto. Em relação ao ensaio de absorção de água por capilaridade, pode-se concluir que o Bioconcreto com a bactéria *B. subtilis* apresenta uma maior capacidade de regeneração. Outra conclusão que se pode extrair deste trabalho é a existência de uma relação direta entre o tipo de recipiente utilizado no procedimento de impregnação (frasco aberto ou fechado) e o tempo de endurecimento do líquido de impregnação bacteriana. Além disso, percebe-se uma influência dos agentes microbianos sobre a capacidade de diluição do lactato de cálcio neste líquido, como também que os sete dias de cura utilizados para os tratamentos bacterianos foram insuficientes para hidratar completamente o material e endurecê-lo.

Por fim, conclui-se que o Bioconcreto é um material eficaz em sua proposta de tratamento autônomo de suas fissuras. Além disso, deve ser mais estudado e desenvolvido para que sirva como alternativa aos métodos convencionais que tradicionalmente apresentam grande potencial poluidor. Como qualquer material, o Bioconcreto também possui suas limitações, que se fazem mais latentes na questão do custo e da acessibilidade aos insumos, especialmente, os agentes microbianos e o lactato de cálcio.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros, sugere-se estudar a capacidade de outras bactérias do gênero *Bacillus* regenerarem o concreto e até mesmo fazer comparações deste gênero com outros que possuam a capacidade de precipitar calcita. Além disso, sugere-se também estudar a influência da granulometria dos agregados, em especial do agregado graúdo, argila expandida, na capacidade das bactérias de preencher fissuras em Bioconcreto.

No que tange à evolução do processo de impregnação, é importante procurar entender o porquê do líquido de saturação em frascos isolados em relação ao meio externo levarem muito mais tempo para adquirir consistência pastosa e cor branca em relação aos frascos abertos. Tendo isso em vista, deve-se evitar a utilização de recipientes frágeis que mantenham o líquido de impregnação em contato com o ar, já que dessa forma ocorre o endurecimento mais rápido, o que o pode ser indesejado. Sugere-se, do mesmo modo, buscar entender a influência da bactéria na diluição do lactato de cálcio no líquido de impregnação e como a menor dispersão de lactato de cálcio no recipiente influencia na cura do corpo de prova.

Torna-se importante também procurar realizar ensaios capazes de mensurar o desenvolvimento das bactérias e de seu processo de fechamento de fissuras de forma microscópica, visto que muitas vezes o resultado desse processo não é perceptível a olho nu ou até mesmo a ensaios de absorção de água. Essa dificuldade em medir a atividade das bactérias e o preenchimento da fissura é especialmente maior quando o corpo de prova possui poucas semanas de idade.

Desse modo, aconselha-se a utilização de ensaios como o MEV (Microscópio de Varredura Eletrônica), DRX (Difração de Raios X) e acompanhamento em microscópio óptico para a visualização de cristais e elementos que comprovem a precipitação de calcita induzida por micro-organismos.

Espera-se que este trabalho seja o primeiro passo para a pesquisa deste tema nesta universidade, servindo como base para o aprimoramento da metodologia e para a construção de um elo entre a Engenharia e a Microbiologia, que muitas vezes caminham de forma separada, mas que, quando unidas, podem promover um grande ganho para a sociedade.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, T; COSTA E SILVA, A. J. Patologia das estruturas. In: ISAIA, G.C (Editor). **Concreto: ensino, pesquisa e realizações**. v. 2. São Paulo: IBRACON, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15575**: Desempenho de edificações habitacionais. Rio de Janeiro, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9779**: Argamassa e concreto endurecidos - Determinação da absorção de água por capilaridade. Rio de Janeiro, 2012.

CARNEIRO, G. V. H. S.; GIL, L. K. S.; NETO, M. P. C. Calor de Hidratação no Concreto. **Monografia** (Graduação em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

CASTRO-ALONSO, M.J.; *et al.* Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation (MICP) and Its Potential in Bioconcrete: Microbiological and Molecular Concepts. **Frontiers in Materials**. v. 6, 2019.

DAL MOLIN, D.C.C. Fissuras em estruturas de concreto armado: análise das manifestações típicas e levantamento de casos ocorridos no estado do Rio Grande do Sul. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1988.

DHAMI, N.K.; MUKHERJEE, A.; REDDY, M.S.; Viability of calcifying bacterial formulations in fly ash for applications in building materials. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 40, p. 1403–1413, 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10295-013-1338-7#citeas>>. Acesso em: 28 jan. 2020.

DURHAM, J. Colony Of *Bacillus Subtilis* Bacteria. **SCIENCE PHOTO LIBRARY**, 2020. Disponível em <<https://www.sciencephoto.com/media/10904/view>>. Acesso em: 23 mar. 2020.

GRANUM, P.; LINDBÄCK, T. *Bacillus cereus*. p. 491-502. In: DOYLE, M.; BUCHANAN, R (editor). **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers** 4. ed. Washington, DC: ASM Press, 2013. Disponível em: <<https://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555818463.chap19?crawler=true>>. Acesso em: 15 mar. 2020.

GUPTA, M. K.; *et al.* Bioremediation Of Heavy Metal Polluted Environment Using Resistant Bacteria. **Journal of Environmental Research And Development**. v. 8, 2014.

JONKERS, H. M. Bacteria-based self-healing concrete. **Heron**, v. 56, n. 1–2, p. 5–16, 2011. Disponível em: <<http://heronjournal.nl/56-12/1.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2020.

JONKERS, H. M.; THIJSSSEN, A.; MUYZER, G.; *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. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925857409000202>>. Acesso em: 26 jan. 2020.

KRAMER, J.M.; GILBERT, R.J.; *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: DOYLE, M. P. **Food borne Bacterial Pathogens**. Nova Iorque, Nova Iorque: Marcel Dekker, INC., 1989. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=qBAguo2yYuAC&oi=fnd&pg=PA21&dq=BACILLUS+CEREUS&ots=90euP0A9YU&sig=zP1jcf_d_m05h8jEHYZaDVjMaIFc#v=onepage&q=BACILLUS%20CEREUS&f=false>. Acesso em: 15 mar. 2020.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H.M.; PINHO, R.S.C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v. 4, n. 2, p. 12–20, 2010.

LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. 10. ed. Porto Alegre: AMGH, 2011.

LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

LOWENSTAM, H. A.; WEINER, S. **On Biomineralization**. Nova Iorque: Oxford Univ. Press, 1989. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=16znCwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=biomineralization&ots=7wEy71Xb7x&sig=PfO4tbUIBrDeu5bEeXMAAyOUync#v=onepage&q=biomineralization&f=false>>. Acesso em: 27 jan. 2020.

MONTEIRO, E.B. Reabilitação de estruturas de concreto. In: ISAIA, G.C (Editor). **Concreto: ensino, pesquisa e realizações**. v. 2. São Paulo: IBRACON, 2005.

MORS, R. M.; JONKERS, H. M. Practical Approach for Production of Bacteria-Based Agent-Contained Light Weight Aggregates To Make Concrete Self-Healing. ICSHM 2013: **Proceedings of the 4th International Conference on Self-Healing Materials**, p. 240–243, 2013.

NASCIMENTO, J. S. Biologia de Microrganismos. In: Rafael Angel Torquemada Guerra. (Org.). **Ciências Biológicas: Cadernos CB Virtual 4**. 2ed, v. 4, p. 260-354. João Pessoa: Editora Universitária UFPB, 2013.

OMOREGIE, A.I. Characterization of ureolytic bacteria isolated from limestone caves of Sarawak and evaluation of their efficiency in biocementation. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) - Faculty of Engineering, Computing and Science, Swinburne University of Technology, 2016.

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.

REIS, L.G.V. Biotecnologia Microbiana da construção: potencial de biomineralização de bactérias ureolíticas de solo de cerrado e de rejeitos da construção civil. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

SEIFAN, M., SAMANI, A. K. & BERENJIAN, A. Bioconcrete: next generation of self-healing concrete. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 100, p. 2591–2602, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7316-z>>. Acesso em: 27 jan. 2020.

SOUZA, V. C.; RIPPER, T. **Patologia, recuperação e reforço de estruturas de concreto**. São Paulo: Pini, 1998.

THOMAZ, E. **Trincas em edifícios: causas, prevenção e recuperação**. São Paulo: Pini, 1989.

TORTORA, G. J.; FUNKE B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

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

WANG, J.Y. et al. Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores. **Cement and Concrete Research** v. 56, p. 139–152, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008884613002482>>. Acesso em: 26 jan. 2020.

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

XU, AW.; MA, Y; CÖLFEN, H. Biomimetic mineralization. **Journal of Materials Chemistry**, 17, p. 415–449, 2007.

SAVINI, V. **The Diverse Faces Of *Bacillus Cereus***. 1. ed. Londres: Academic Press, 2016.