

BIOCIMENTAÇÃO DE UM SOLO ARENOSO COM RECURSO A ENZIMAS: EFEITO DE DIVERSOS FATORES

Biocementation of a sandy soil with the use of enzymes: effect of some factors

João Paulo S.F. Carmona *

Paulo J. Venda Oliveira **

Luís J. L. Lemos ***

RESUMO – Neste trabalho apresentam-se os resultados de uma investigação laboratorial que visa analisar os ganhos de resistência e rigidez de um solo arenoso, através da precipitação de carbonato de cálcio (CaCO_3) por via enzimática, com base na adição de uma solução estabilizadora composta por água, ureia, cloreto de cálcio e a enzima *urease*. Inicialmente a eficiência da metodologia é analisada em tubos de ensaio com a determinação da massa de CaCO_3 precipitada, sendo posteriormente testada em provetes de solo, com base em resultados de ensaios de compressão não confinada. São analisados os efeitos da concentração de enzima *urease* e do tempo de cura, no ganho de resistência e rigidez do solo estabilizado. Constata-se com o aumento da concentração de *urease* (até 4 kU/L) e do tempo de cura (até 7 dias) um significativo aumento de resistência e rigidez do solo. Ensaios de raios-X e imagens de microscópio eletrónico confirmam a precipitação de CaCO_3 .

SYNOPSIS – This paper presents the results of a laboratory investigation with the aim of analysing the effect of enzymatically-induced calcium carbonate precipitation (CaCO_3) on the strength and stiffness of a sandy soil. The stabilizer solution is composed of: water, urea, calcium chloride and the *urease* enzyme. Initially, this process is studied in test-tube experiments by the evaluation of the amount of CaCO_3 precipitated. After this, the methodology is applied to stabilizing a soil based on the results of unconfined compressive strength tests. The effects of the amount of the *urease* enzyme and curing time used on the strength and stiffness of the stabilised soil are studied. An increase in the strength and stiffness of the stabilised soil is observed with the increase in the concentration of *urease* (less than 4 kU/L) and in the curing time (less than 7 days). X-ray power diffraction and scanning electron microscopy tests confirm the CaCO_3 precipitation.

Palavras Chave – Bioestabilização; biocimentação; precipitação de carbonato de cálcio; enzima urease.

Keywords – Biostabilization; biocimentation; calcium carbonate precipitation; urease.

1 – INTRODUÇÃO

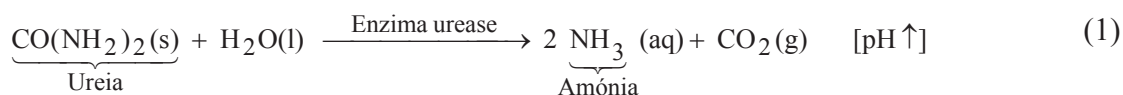
A expansão de inúmeras regiões metropolitanas do globo tem promovido a ocupação de formações geotécnicas de fracas características mecânicas, as quais, no passado, eram frequentemente preteridas para efeitos de construção. A utilização destas formações geotécnicas

* Engenheiro Civil. E-mail: jp_carmona@hotmail.com

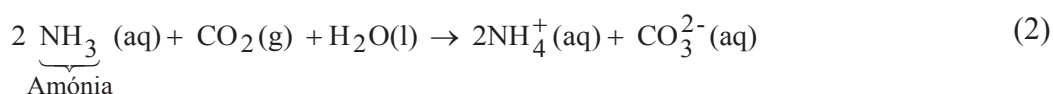
** Professor Auxiliar, Departamento de Engenharia Civil, Universidade de Coimbra.
E-mail: pjvo@dec.uc.pt

*** Professor Catedrático, Departamento de Engenharia Civil, Universidade de Coimbra.
E-mail: llemos@dec.uc.pt

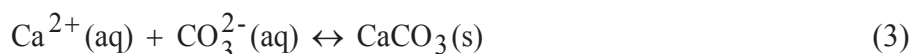
para fundação de obras geotécnicas, só é possível após o seu melhoramento e/ou reforço, de modo a garantir um adequado comportamento mecânico (resistência e rigidez) e hidráulico. Recentemente a biocimentação (ou biestabilização) de solos tem emergido com uma técnica alternativa para promover a estabilização de alguns solos problemáticos (DeJong *et al.*, 2010; DeJong *et al.*, 2013; Muynck *et al.*, 2010; Chou *et al.*, 2011). Sucintamente, a biocimentação de solos consiste na precipitação de carbonato de cálcio (CaCO_3), a partir da hidrólise da ureia acelerada pela enzima *urease* que atua como catalisador, originando a formação de amônia, a qual induz o aumento do valor de pH:



e a formação de íões carbonato (Hammes e Verstraete, 2002; Hammes *et al.*, 2003; Whiffin *et al.*, 2007):



Na presença de íões de cálcio (Ca^{2+}) e de íões carbonato a produção de carbonato de cálcio ocorre espontaneamente (Chou *et al.*, 2011; Burbank *et al.*, 2013) através da seguinte reação:



O carbonato de cálcio pode-se apresentar sob a forma de três cristais: calcite (carbonato mais estável em condições ambientais), aragonite (carbonato de elevada pressão) e vaterite (carbonato hidratado instável raramente encontrado na natureza (Al-Thawadi, 2011)).

A precipitação de CaCO_3 por hidrólise de ureia é um processo químico que depende da concentração de cálcio, concentração de carbono inorgânico dissolvido, pH do meio e disponibilidade de locais de nucleação (Hammes *et al.*, 2003).

Existem várias aplicações práticas da biocalcificação em engenharia, entre as quais se destacam a proteção e restauro de monumentos de calcário (Tiano *et al.*, 1999), remoção de contaminantes de águas freáticas (Fujita *et al.*, 2000), produção de argamassas biológicas (Muynck *et al.*, 2008) bem como o preenchimento de poros em reservatórios rochosos destinados a armazenamento de petróleo (Nemati e Voordouw, 2003).

A biocimentação, quando usada para estabilizar solos, promove a formação de ligações de CaCO_3 entre as partículas de solo, aumentando a resistência e rigidez do solo estabilizado (DeJong *et al.*, 2010; Whiffin *et al.*, 2007; Al Qabany e Soga, 2013; Van Paassen *et al.*, 2010; Mortensen *et al.*, 2011; Venda Oliveira *et al.*, 2015), com um resultado semelhante à cimentação natural (Al-Thawadi, 2011). Por outro lado, a deposição de CaCO_3 nos vazios e na envolvente das partículas de solo promove a diminuição da porosidade (Whiffin *et al.*, 2007) e da condutividade hidráulica do solo (Al Qabany e Soga, 2013; Yasuhara *et al.*, 2012). Em paralelo, diversos trabalhos de investigação têm mostrado que a biocimentação também altera o comportamento dos solos, tornando-os não colapsáveis (DeJong *et al.*, 2006) passando a exibir expansão volumétrica positiva durante ensaios de corte direto (Chou *et al.*, 2011), diminuindo por conseguinte o seu potencial de liquefação (Ivanov e Chu 2008; Van der Ruyt e van der Zon 2009; DeJong *et al.*, 2010; Inagaki *et al.*, 2011; Montoya *et al.*, 2012; Burbank *et al.*, 2011, 2013; Cheng *et al.*, 2013; Kalantary e Kahani, 2015).

A generalidade da investigação sobre biocimentação de solos baseia-se na precipitação de CaCO_3 por via microbiológica (MICP), utilizando diversos tipos de bactérias, tais como a

Sporosarcina pasteurii (Whiffin *et al.*, 2007; Chou *et al.*, 2011; Mortensen *et al.*, 2011; Venda Oliveira *et al.*, 2015), *Bacillus sphaericus* (Shirakawa *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2013) e *Idiomarina insulissae* (Venda Oliveira *et al.*, 2015). Como principais limitações desta via são apontadas a complexidade do cultivo e armazenamento de bactérias (Hamdan *et al.*, 2013), a variação da produção de *urease* por parte dos microrganismos (Whiffin, 2004) e a sua aplicação em solos finos ser limitada (Van Paassen, 2009), visto as bactérias terem um tamanho de 0,5 a 5 μm , idêntico às partículas de solos finos (Mitchell e Santamarina, 2005). De forma a contornar estas limitações, neste trabalho apresenta-se um processo alternativo de promover a biocimentação, consistindo na substituição do uso de microrganismos pela adição direta da enzima *urease* (Yasuhara *et al.*, 2012; Neupane *et al.*, 2013, 2015), a qual pode ser encontrada em diversas bactérias, fungos e plantas (Al-Thawadi, 2011), em particular numa espécie de feijão tropical, *Canavalia Ensiformis*. A via enzimática é um processo mais simples de promover a precipitação de CaCO_3 (Yasuhara *et al.*, 2012), como forma de alcançar uma melhoria uniforme das propriedades mecânicas do solo (Neupane *et al.*, 2015). Por outro lado, o tamanho da enzima *urease* é da ordem de 12 nm (Blakely e Zerner, 1984), o que sugere que a aplicação desta técnica possa ser também estendida a solos finos (Hamdan *et al.*, 2013). A principal desvantagem da utilização desta enzima reside no seu elevado custo, o qual no futuro poderá ser mitigado com o aumento da produção e eventual industrialização do processo de extração.

Apesar do diminuto número de trabalhos publicados sobre a precipitação de CaCO_3 em solos por via enzimática, estes tem mostrado que esta metodologia promove o aumento de resistência (Carmona, 2016; Carmona *et al.*, 2016a, 2016b) e a diminuição da permeabilidade e porosidade (Yasuhara *et al.*, 2012; Nemati e Voordouw 2003; Neupane *et al.*, 2013), estando diretamente relacionado com o teor de CaCO_3 precipitado, não obstante a elevada dispersão obtida (Yasuhara *et al.*, 2012; Neupane *et al.*, 2015a). Venda Oliveira *et al.* (2016) mostraram que esta técnica é potenciada em solos arenosos de granulometria extensa, sendo pouco eficaz em solos orgânicos. Alguns trabalhos também têm mostrado que a utilização de elevada concentração de enzimas e reagentes pode diminuir a eficácia do processo (Yasuhara *et al.*, 2012; Nemati e Voordouw 2003).

Tendo como cenário a incipiente investigação sobre a precipitação de CaCO_3 por via enzimática, o presente trabalho pretende contribuir para melhorar a compreensão desta temática. Assim, com base em resultados experimentais, é analisada a influência da concentração de *urease*, do tempo e condições de cura. Inicialmente, a eficiência do processo é testada em tubos de ensaio, através da determinação da massa de CaCO_3 precipitada e de ensaios de raios-X para confirmar o material precipitado. Posteriormente, a técnica é utilizada para estabilizar provetes de um solo arenoso, sendo a análise efetuada à luz dos resultados obtidos em ensaios não drenados de compressão não confinada (UCS), em termos de resistência e rigidez. Complementarmente, a presença de cristais de CaCO_3 é confirmada por ensaios de raios-X e por imagens obtidas por microscópio eletrónico (SEM).

2 – CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

2.1 – Solo natural

O solo arenoso utilizado neste trabalho é proveniente da região de Leiria, sendo constituído do ponto de vista granulométrico (E196, 1966) por 2,3% de argila, 3,5% de silte, 78,7% de areia e 15,5% de cascalho, exibindo por conseguinte um carácter não plástico. A classificação unificada (ASTM D 2487, 1998) indica tratar-se de uma areia mal graduada com silte e cascalho, designado por SP-SM com cascalho. A densidade das partículas sólidas (NP 83, 1965) assume o valor de 2,71. O ensaio de compactação (E197, 1966), referente a compactação leve em molde pequeno, remete para um teor ótimo em humidade (w_{opt}) de 12% e um peso volúmico seco máximo ($\gamma_{\text{dmáx}}$) de 17,3 kN/m^3 . O teor em matéria orgânica (OM), realizado pelo método de ignição (ASTM D

2974, 2000), indica um valor desprezável de 0,34%. O valor de pH do solo natural (BS 1377-3, 1990) é de 8,4, indicando a presença de um solo ligeiramente alcalino. O Quadro 1 resume a caracterização geotécnica do solo em estudo.

Quadro 1 – Caracterização geotécnica do solo natural

Granulometria (%)	G _s	w _{opt} (%)	γ _d ^{máx} (kN/m ³)	OM (%)	pH
Argila ≈ 2,3% Silte ≈ 3,5% Areia ≈ 78,7% Cascalho ≈ 15,5%	2,71	12,0	17,3	0,34	8,4

2.2 – Constituintes da solução estabilizadora

Os reagentes envolvidos na precipitação de CaCO₃ (adicionados ao solo no processo de bioestabilização) desempenham um papel primordial, uma vez que desencadeiam interações de natureza física, química e biológica com as partículas de solo. A solução estabilizadora é composta por:

- i) *Água*: destilada em laboratório a partir da rede pública.
- ii) *Ureia* [CO(NH₂)₂]: fornecida pela “Acros Organics”, é utilizada como fonte de íons carbonato, tendo uma pureza de 99,5% e uma massa molar de 60,06 g/mol.
- iii) *Cloreto de cálcio* [CaCl₂]: fornecida pela “Applichem Panreac”, é utilizado como fonte de íons de cálcio e tem uma pureza de 95% e uma massa molar de 110,99 g/mol.
- iv) *Urease*: esta enzima fornecida pela “Sigma-Aldrich” catalisa a hidrólise da ureia. De acordo com a ficha técnica, esta enzima é extraída da “*Canavalia ensiformes*” apresentado um valor ótimo de pH de 7,4, temperatura ótima de 60°C, e devendo a temperatura de armazenamento estar no intervalo 5°±3°C. O lote utilizado neste estudo tem a referência U1500 e tem uma atividade de 34310 U/g (1 U origina a libertação de 1,0 μmol de NH₃ por minuto, a 25°C e com um pH de 7,0). As instruções de preparação do produto remetem para a colocação de *urease* com uma concentração de 10 mg/mL numa solução tampão de fosfato de sódio 0,2 M, permitindo manter a solução com um pH constante próximo de 7.

3 – PROCEDIMENTO LABORATORIAL DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Previamente à realização de ensaios UCS para caracterização mecânica do solo estabilizado, efetuaram-se ensaios laboratoriais em tubos de ensaio para aferir a eficiência do processo de precipitação de CaCO₃. Seguidamente descrevem-se os procedimentos laboratoriais de preparação dos provetes para a realização de testes em tubos de ensaio e de ensaios UCS.

3.1 – Precipitação de CaCO₃ em tubos de ensaio

O procedimento de ensaio para a quantificação da massa de CaCO₃ precipitado em tubos de ensaio é baseado em Neupane *et al.* (2013). O procedimento de ensaio é ilustrado na Figura 1, sendo descrito nas seguintes fases:

- i) Dissolução de ureia-CaCl₂ (concentrações equimolares) em 10 mL de água destilada, até à dissolução completa dos reagentes.
- ii) A enzima *urease*, na concentração pretendida, é misturada com 10 mL de água destilada, procedendo-se à sua agitação durante 5 minutos.

- iii) As duas soluções são misturadas, perfazendo um volume total de 20 mL. Imediatamente após a mistura, inicia-se a hidrólise da ureia catalisada pela *urease*, processando-se a ligação de íons carbonato com íons de cálcio, com a consequente precipitação de CaCO_3 (Figura 2).
- iv) Os tubos de ensaio são colocados na vertical, numa sala com controlo de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) durante o tempo de cura predefinido.
- v) Após o tempo de cura especificado, a massa de CaCO_3 precipitada nos tubos de ensaio (Figura 2) é quantificada da seguinte forma: o conteúdo aquoso presente no tubo de ensaio (subprodutos da reação e o excesso de água) é extraído para um funil de vidro munido de papel de filtro; o tubo é lavado com água destilada, vertendo o conteúdo no mesmo funil com papel de filtro; o tubo de ensaio com o precipitado é seco em estufa durante 5 horas e pesado; o papel de filtro é lavado, sendo seco em estufa durante 2 horas e pesado.

A lavagem do tubo e do papel de filtro tem o objetivo de retirar os reagentes não precipitados, os quais, com a secagem em estufa, iriam precipitar por ação da temperatura.

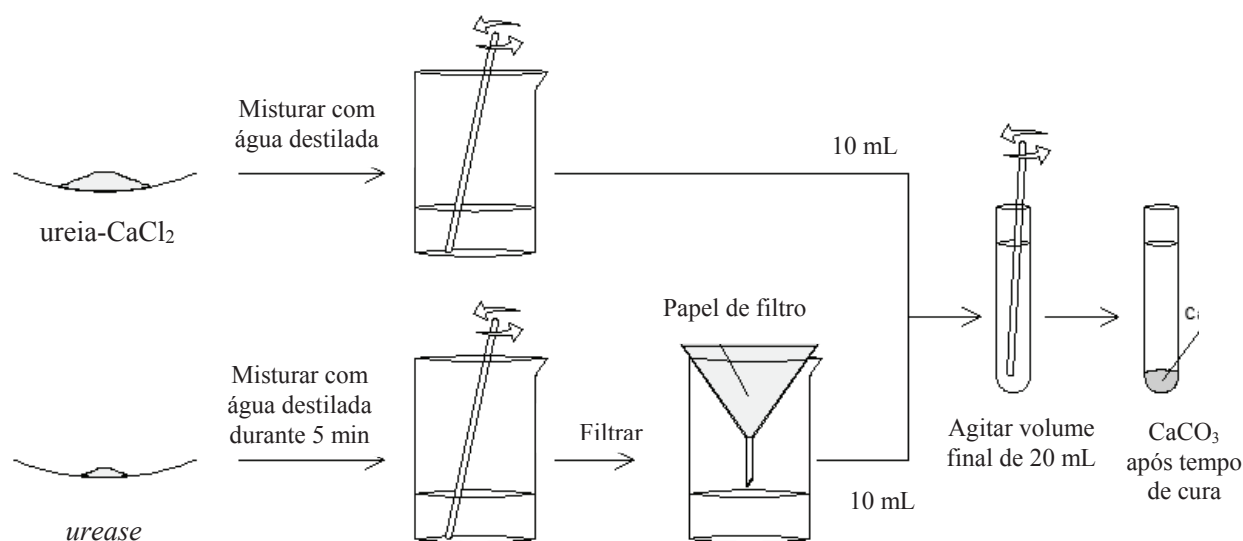


Fig. 1 – Quantificação da massa de CaCO_3 em tubos de ensaio (adaptado de Neupane *et al.*, 2013).



Fig. 2 – Ensaios em tubos de ensaio. Precipitação de CaCO_3 .

3.2 – Provetes de solo bioestabilizado

Os provetes de solos utilizados nos ensaios UCS são cilíndricos com 37 mm de diâmetro e 76 mm de altura, correspondendo a uma relação entre a altura e o diâmetro de 2:1 (NP EN 12390-1, 2010). Dadas as dimensões do provete, para que os resultados sejam fiáveis, a máxima dimensão das partículas de solo deve ser inferior a 3,35 mm (Head, 1982), pelo que neste trabalho só se utilizou a fração de solo inferior a 2 mm (Peneiro nº10, ASTM), correspondendo a 84,5% da fração granulométrica total.

Na Figura 3 apresenta-se um esquema ilustrativo do procedimento de preparação dos provetes de solo, sendo descrito pelas seguintes fases:

- Pesagem de cerca de 180 g de solo seco.
- Preparação de uma solução aquosa estabilizadora composta por uma determinada concentração equimolar de ureia- CaCl_2 e de *urease*. O volume da solução adotado é equivalente ao teor em água ótimo do ensaio Proctor normal.
- Mistura manual com uma espátula do solo com a solução aquosa, garantindo a sua homogeneidade.
- Preparação de moldes de PVC para execução dos provetes de solo, colocando uma camada fina de vaselina nas paredes interiores de maneira a facilitar a extração do provete de solo após cura. O molde é colocado sobre uma base rígida, sendo instalada uma alonga na abertura superior deste, para evitar desperdícios de material.
- Compactação dos provetes com 8 camadas e 4 pancadas por camada, de modo a obter o peso volúmico seco máximo obtido no ensaio Proctor normal. De modo a garantir a homogeneidade dos provetes, o topo de cada camada é escarificado ligeiramente com a ajuda de um garfo.

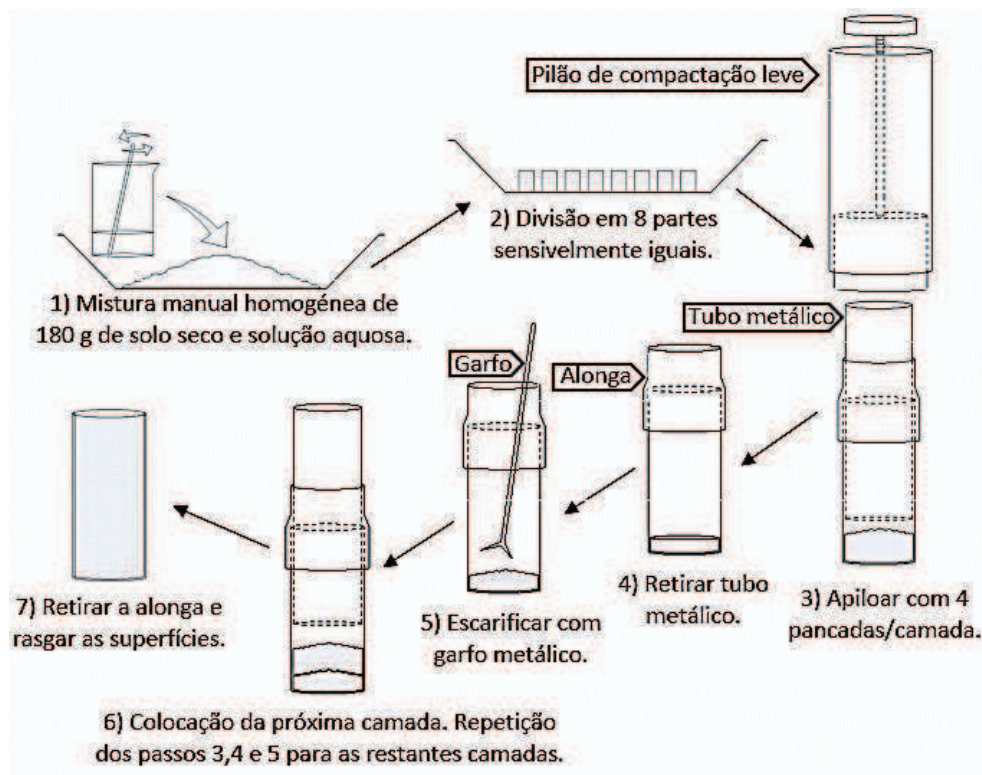


Fig. 3 – Esquema ilustrativo do procedimento de compactação dos provetes

- vi) Colocação dos provetes dentro de um saco plástico, por forma a manter o teor em água durante o tempo de cura, ficando armazenados em câmara termo-higrométrica (temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e humidade relativa de $95 \pm 5\%$) ou ao ambiente (temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e humidade relativa de $60 \pm 15\%$), conforme as condições de cura de ensaio.

Após o tempo de cura definido no programa de ensaios, a resistência mecânica dos provetes de solo é avaliada com base em ensaios UCS, executados com uma velocidade de corte de 1%/min.

4 – PROGRAMA DE ENSAIOS

No Quadro 2 apresenta-se o programa de ensaios efetuados em tubos de ensaio (provetas) e UCS. Em ambos os casos, analisam-se os efeitos da variação da concentração de *urease* e do tempo de cura. Adicionalmente, os ensaios UCS foram realizados considerando a cura em câmara húmida e em condições ambientais com menor humidade relativa ($60 \pm 15\%$). De modo a garantir a reprodutibilidade e a fiabilidade dos resultados, os ensaios realizados nos tubos de ensaio e UCS são repetidos 3 e 2 vezes, respetivamente. As concentrações de ureia- CaCl_2 e de *urease* foram estabelecidas com base nos trabalhos de Carmona (2016) e Venda Oliveira et al. (2016), enquadrando-se nos valores considerados por outros autores (Yasuhara et al., 2012; Nemati e Voordouw, 2003; Neupane et al., 2013).

Quadro 2 – Programa de ensaios.

Parâmetro em análise	Concentração ureia- CaCl_2 (mol/L)	Concentração <i>urease</i> (kU/L)	Tempo de cura (dias)	Ensaio	
				Provetas	UCS
Concentração de <i>urease</i>	0,75	1	14	X	
		2		X	X
		4		X	X
		8		X	X
		12			X
		24			X
Tempo de cura	0,75	4	1	X	X
			3		X
			7	X	X
			14	X	X
			21		X
			28	X	X

5 – APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DE RESULTADOS

5.1 – Influência da concentração de *urease*

A Figura 4 ilustra o efeito da concentração de *urease* na massa de CaCO_3 precipitado em tubos de ensaio, sendo os resultados confrontados com a massa de CaCO_3 teórica, admitindo que a reação de precipitação é completa:

$$m_t \text{ (g)} = C \times V \times M \quad (4)$$

sendo C a concentração equimolar de ureia- CaCl_2 em mol/L, V o volume da solução em L e M a massa molar de CaCO_3 (100,087 g/mol). Constata-se que o aumento da concentração de *urease* aumenta a eficiência da reação química, devido ao incremento da quantidade de ureia que é

hidrolisada, induzindo o aumento da massa de CaCO_3 precipitado. Com uma concentração de 8 kU/L de *urease* obtém-se uma elevada eficiência (96,2% em relação à massa teórica expectável, equação (4)). Resultados de ensaios de raios-X (XRD) confirmam que o material precipitado corresponde preponderantemente a cristais de calcite (Figura 5).

Os resultados de ensaios UCS (Figura 6) corroboram, de uma maneira geral, os resultados obtidos em tubos de ensaio. Assim, observa-se com o aumento da concentração de *urease* a melhoria das características mecânicas do solo estabilizado, nomeadamente o aumento de q_u (resistência à compressão não confinada) e E_{u50} (módulo de deformabilidade não drenado para 50% de q_u), estando este efeito associado a uma maior produção de CaCO_3 , que promove o incremento das ligações entre as partículas. Este feito é mais significativo para reduzidas concentrações de *urease* (até 4 kU/L) e para provetes curados ao ambiente. De facto, a melhoria das características mecânicas de provetes com solo biocimentado curados em câmara húmida, para concentrações de *urease* superiores a 4 kU/L, é negligenciável, tendo mesmo um efeito negativo para concentrações superiores a 12 kU/L.

Para elevadas de concentrações de *urease* (superior a 8 kU/L), o aumento da sua concentração não tem grande repercussão na eficiência do processo, muito possivelmente por escassez dos restantes reagentes (ureia e CaCl_2).

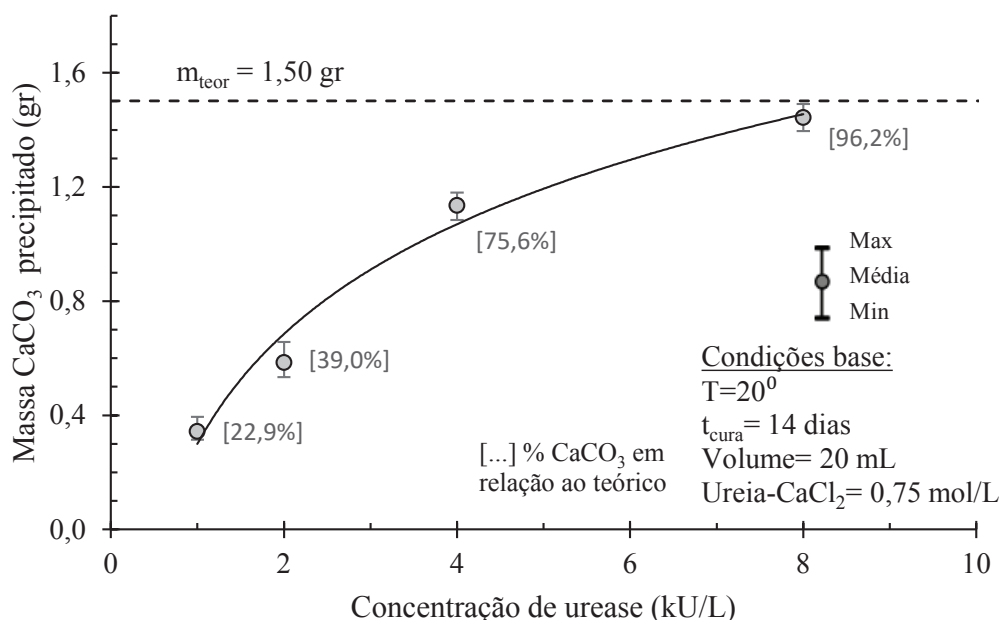


Fig. 4 – Determinação de CaCO_3 em tubos de ensaio. Efeito da dosagem de *urease*.

Os resultados obtidos na Figura 6 também mostram que a cura ao ambiente incrementa substancialmente o valor de q_u e de E_{u50} em relação aos provetes curados em câmara húmida, sendo este efeito potenciado com o aumento da concentração de *urease*. A influência das condições de cura no comportamento deve-se fundamentalmente ao efeito da sucção, a qual é extremamente elevada nos provetes curados ao ambiente devido à sua secagem, dado os provetes sujeitos a cura em câmara húmida apresentarem valores de teor em água mais elevados, o que, naturalmente, diminui a sucção e consequentemente a resistência obtida.

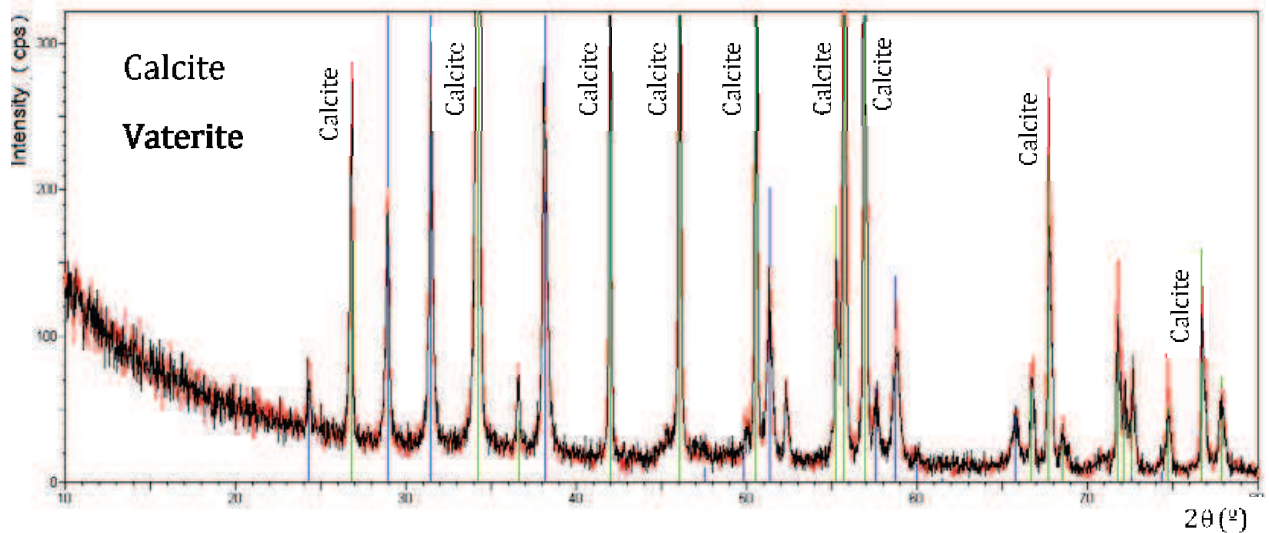


Fig. 5 – Ensaios em tubos de ensaio. Resultados XRD (Ureia- $\text{CaCl}_2 = 0,5 \text{ mol/L}$).

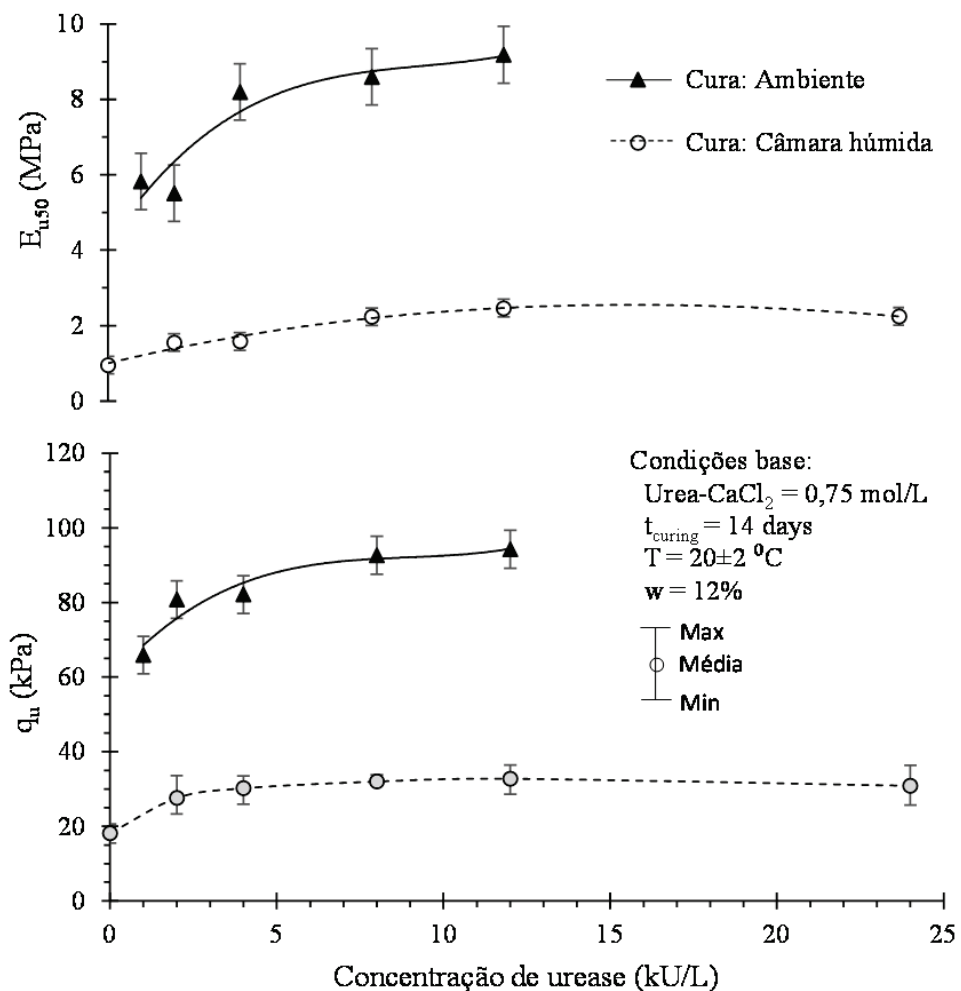


Fig. 6 – Ensaios UCS para cura em câmara húmida e ao ambiente. Influência da concentração de *urease* em termos de q_u e E_{u50} .

Resultados de ensaios XRD obtidos com o solo biocimentado e não estabilizado (Figura 7) mostram picos ligeiramente mais elevados de calcite (2θ igual a $26,809$ e $34,239$) e vaterite (2θ igual a $28,965$ e $31,492$) para o solo biocimentado, comprovando a existência de precipitação

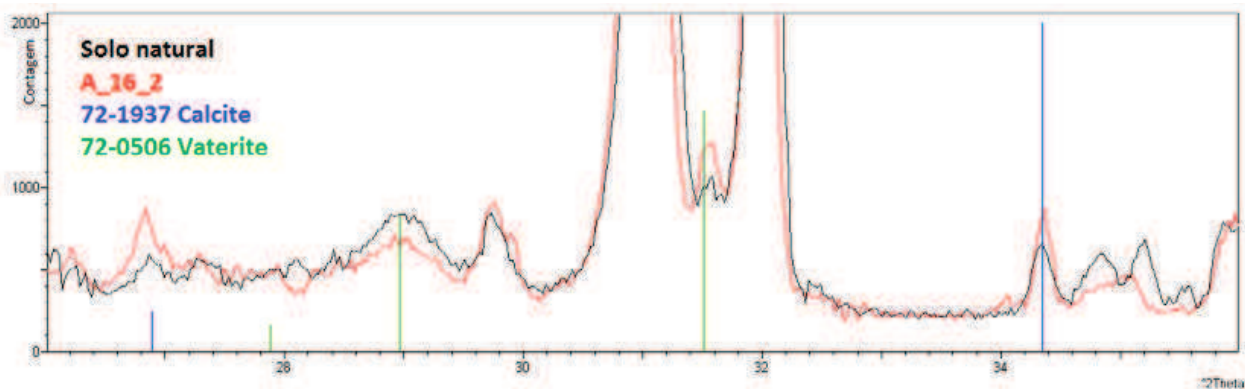


Fig. 7 – Ensaios XRD do solo natural e bioestabilizado.

destes cristais, pelo que se pode concluir que as reações químicas continuam a ocorrer na presença de solo, tal como observado em tubos de ensaio (Figura 5).

Em geral, o comportamento observado está em linha com o obtido noutros trabalhos científicos, tendo Neupane et al. (2013) também obtido uma diminuição da precipitação de CaCO_3 para concentrações de urease superiores a 9 kU/L (para 0,5 mol/L de CaCl_2), tendência esta também confirmada por Li et al. (2013) e Jimenez-Lopez et al. (2003) com outro tipo de enzimas. De acordo com Li et al. (2013), com o aumento da concentração de enzimas, estas tendem a ser adsorvidas pela superfície dos cristais de CaCO_3 , inibindo o seu crescimento, tendo um efeito negativo no processo de biocimentação.

5.2 – Influência do tempo de cura

A influência do tempo de cura na massa de CaCO_3 precipitada em tubos de ensaio é ilustrada na Figura 8. Observa-se a que a eficiência da reação (ou seja a hidrólise da ureia) aumenta com o tempo de cura, sendo este efeito mais preponderante para menores tempos de cura (até 7 dias), constatando-se com o incremento temporal a atenuação das reações químicas; por exemplo de 14 para 28 dias de cura, a eficiência da reação cresce somente cerca de 10% (de 75,6% para 85,5%). Este comportamento está em linha com o obtido experimentalmente por Nemati e Voordouw (2003) com tubos de ensaio.

A influência do tempo de cura na variação de q_u e E_{u50} de provetes de solo biocimentado curados em câmara húmida (Figura 9) indica que a hidrólise da ureia nestes provetes ocorre fundamentalmente nos primeiros 7 dias, observando-se com o aumento do tempo de cura, reduzida variação das características mecânicas. Comparando os resultados de ensaios UCS com os obtidos nos testes em tubos de ensaio (Figura 8) constata-se que a maior parte do processo de precipitação de CaCO_3 ocorre durante os primeiros 7 dias, constatando-se com o aumento do tempo de cura, para além de 7 dias, uma maior repercussão em tubos de ensaios do que com provetes de solo biocimentado.

Na Figura 9 também se observa que o efeito do tempo de cura em provetes curados ao ambiente é mais significativo que em provetes curados em câmara húmida. Julga-se que este comportamento, não é consequência direta do processo de bioestabilização, sendo fundamentalmente induzido pela secagem do provete, levando a um aumento da sucção e consequentemente da resistência e rigidez do provete.

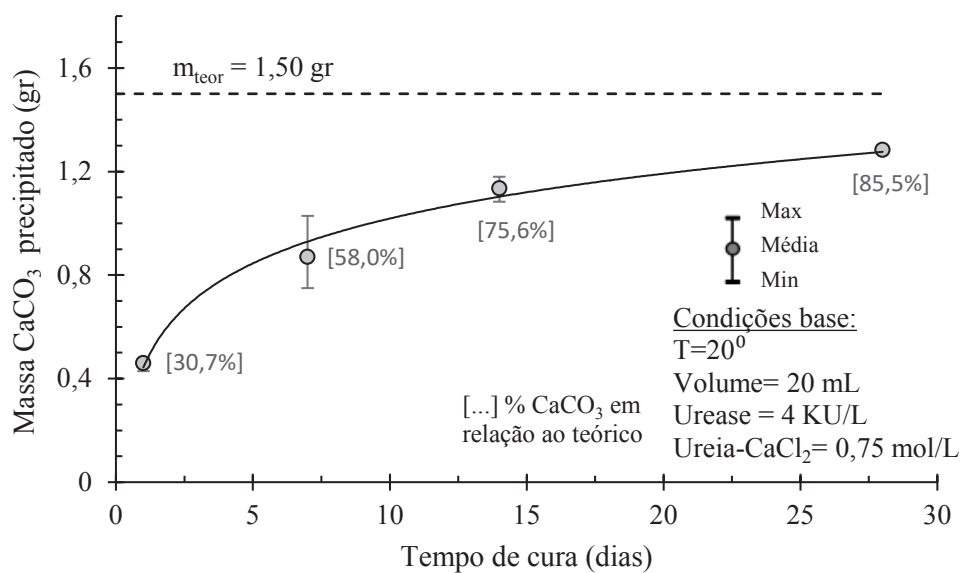


Fig. 8 – Determinação de CaCO_3 em tubos de ensaio. Efeito do tempo de cura.

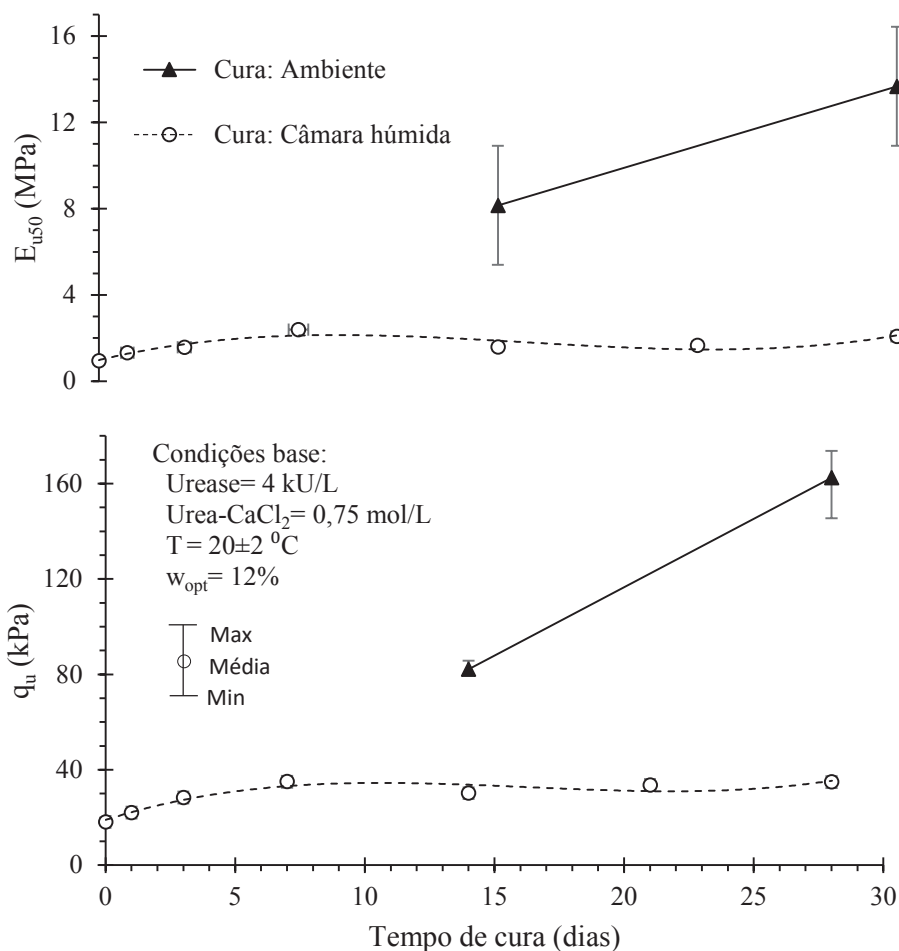


Fig. 9 – Ensaio UCS para cura em câmara húmida e ao ambiente. Influência do tempo de cura em termos de q_u e E_{u50} .

Na Figura 10 apresentam-se imagens obtidas em microscópico eletrônico (SEM) com análise da energia de dispersão de raios-X (EDX), obtidas com provetes de solo biocimentado (cura durante 28 dias em câmara húmida). Observa-se a existência de pequenas partículas (cristais) nos vazios do solo, cuja composição química (através da análise EDX) revela a existência de cálcio (Ca, 3,9%, 4,1% e 2,5% respectivamente para as análises 1, 3 e 4), o que parece indicar que essas partículas possam ser cristais de CaCO_3 . Estes resultados corroboram com os obtidos com raios-X em tubos de ensaios (Figura 7).

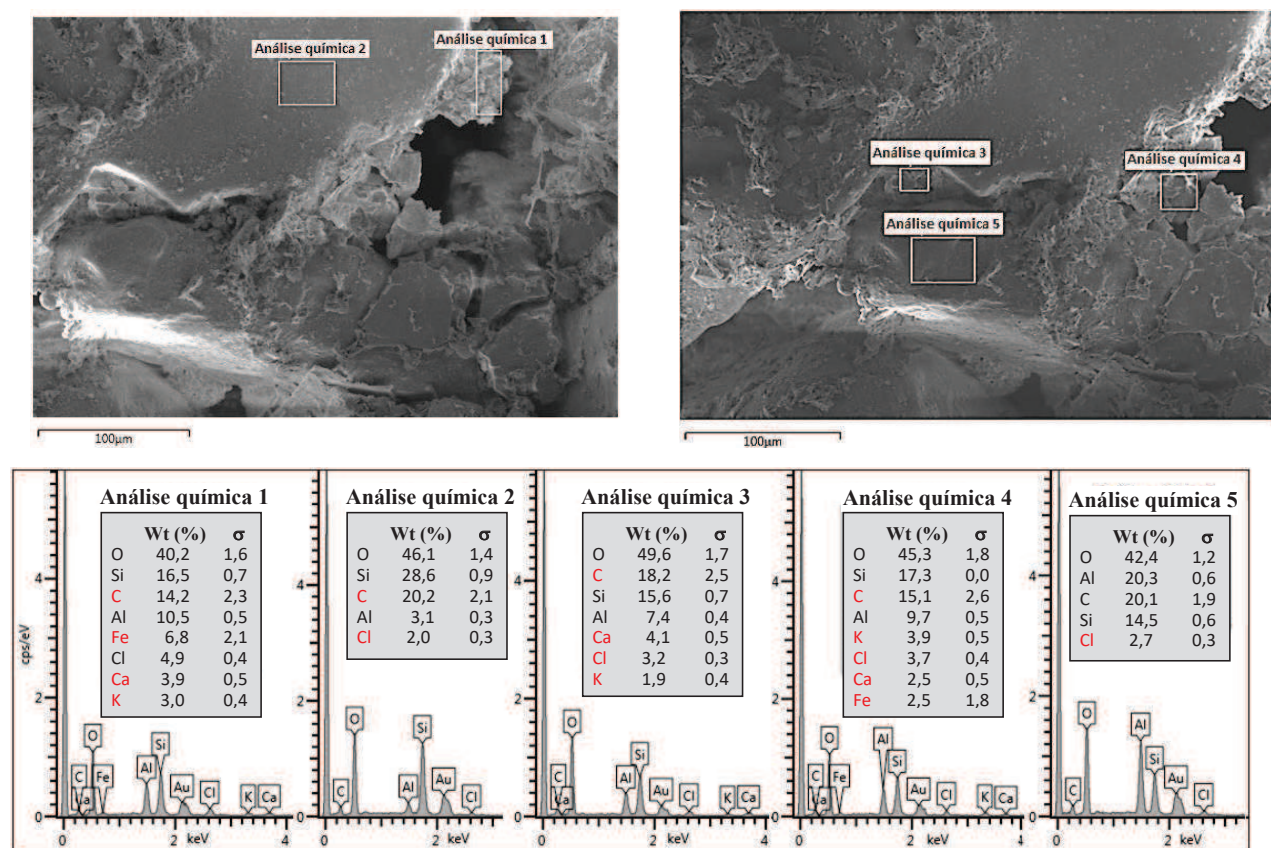


Fig. 10 – Ensaio SEM/EDX do solo estabilizado (Cura: 28 dias em câmara húmida)

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados de testes em tubos de ensaio para análise da eficiência do processo de precipitação de CaCO_3 e os resultados de ensaios UCS de provetes de solo biocimentado efetuados para se estudar a repercussão desta metodologia na melhoria das características mecânicas de um solo arenoso, pode-se concluir o seguinte:

- Resultados de testes em tubo de ensaios mostram que o aumento da concentração da enzima *urease* e do tempo de cura potencia a massa de CaCO_3 precipitada e consequentemente a eficiência da reação, sendo o reflexo de uma maior quantidade de ureia hidrolisada. Este efeito é mais significativo para pequenas concentrações de *urease* (inferiores a 8 kU/L) e tempos de cura inferiores a 7 dias. Ensaio de raios-X confirmam a precipitação de CaCO_3 .
- Resultados de ensaios UCS com provetes de solo biocimentado comprovam, em termos gerais, os resultados obtidos em tubo de ensaios, registrando-se o aumento de resistência e

rigidez com o aumento da concentração de *urease*. Contudo, este efeito é expressivo para concentrações de *urease* inferiores a 4 kU/L, constatando-se para maiores concentrações um efeito negligenciável (provetes curados ao ambiente) ou mesmo negativo (provetes curados em câmara húmida).

- O efeito do aumento do tempo de cura em provetes de solo biocimentado está em consonância com os resultados obtidos em tubos de ensaio, dado a melhoria das características mecânicas dos provetes bioestabilizados ocorrer, fundamentalmente, durante os primeiros 7 dias de cura.
- A cura ao ambiente induz maior resistência e rigidez que a cura efetuada em câmara húmida. Este facto não parece ser uma consequência direta do processo de biocimentação, mas ser induzido pelo aumento das tensões de sucção, devido à secagem dos provetes, quando curados ao ambiente.
- Resultados de ensaios DRX e SEM/EDX confirmam o aumento de CaCO_3 , comprovando a ocorrência de precipitação em meio poroso, tal como observado em tubos de ensaio.

Finalmente, salienta-se o facto do procedimento de biocimentação utilizado, apesar de originar uma melhoria no comportamento mecânico dos provetes, remete para valores de aumento de resistência e rigidez pouco significativos do ponto de vista prático, talvez devido ao volume de solução estabilizadora ser também reduzido. No futuro, será necessário estudar o efeito do aumento do volume de solução estabilizadora (por exemplo através de técnicas de multi-injeção) para incrementar o teor de CaCO_3 precipitado, de maneira a induzir um maior ganho de resistência mecânica.

7 – AGRADECIMENTOS

Os autores expressam os seus agradecimentos ao ISISE (UID/ECI/04029/2013) pelo apoio financeiro concedido a esta investigação.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al Qabany, A.; Soga, K. (2013). *Effect of chemical treatment used in MICP on engineering properties of cemented soils*. Géotechnique, Vol. 63, No. 4, pp. 331–339.
- Al-Thawadi, S.M. (2011). *Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand*. J. Adv. Sci. Eng. Res., Vol. 1, No. 1, pp. 98–114.
- ASTM D 2487 (1998). *Standard classification of soils for engineering purposes (Unified Soil Classification System)*. American Society for Testing and Materials.
- ASTM D 2974-00 (2000). *Standard test methods for moisture, ash, and organic matter of peat and other organic soils*. American Society for Testing and Materials.
- Blakely, R.L.; Zerner, B. (1984). *Jack Bean Urease: The First Nickel Enzyme*. Journal of Molecular Catalysis, Vol. 23, pp. 263–292.
- BS 1377-3 (1990). *Methods of test for soils for civil engineering purposes – part 3: chemical and electro-chemical tests*. British Standards Institution, London.
- Burbank, M.; Weaver, T.; Green, T.; Williams, B.; Crawford, R. (2011). *Precipitation of calcite by indigenous microorganisms to strengthen liquefiable soils*. Geomicrobiology Journal, Vol. 28, No. 4, pp. 301-312.

- Burbank, M.; Weaver, T.; Lewis, R.; Williams, T.; Williams, B.; Crawford, R. (2013). *Geotechnical tests of sands following bioinduced calcite precipitation catalyzed by indigenous bacteria*. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, Vol. 139, No. 6, pp. 928-936.
- Carmona, J.P.S.F (2016). *Utilização da Biotecnologia para a Estabilização de Solos: Precipitação de CaCO_3 por via Enzimática*. Dissertação de Mestrado, Dep. Eng^a Civil da FCTUC, Universidade de Coimbra.
- Carmona, J.P.S.F.; Venda Oliveira, P.J.; Lemos L.J.L. (2016a). *Biostabilization of a sandy soil using enzymatic calcium carbonate precipitation*. Procedia Engineering (3rd International Conference on Transportation Geotechnics, Guimarães, Portugal), Vol.143, pp. 1301–1308. DOI: 10.1016/j.proeng.2016.06.144.
- Carmona, João P.S.F.; Venda Oliveira, P.J.; Leal Lemos, L.J. (2016b). *Bioestabilização de um solo arenoso por intermédio da precipitação de carbonato de cálcio por via enzimática*. VIII Congresso Luso-Brasileiro de Geotecnia, Art. nº ABS_1299, FEUP, Porto.
- Cheng, L.; Cord-Ruwisch, R.; Shahin, M. A. (2013). *Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation at various degrees of saturation*. Canadian Geotechnical Journal, Vol. 50, No. 1, pp. 81-90.
- Chou, C. W.; Seagren E. A.; Aydilek A. H.; Lai M. (2011). *Biocalcification of sand through ureolysis*. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, Vol. 137, No. 12, pp. 1179-1189.
- Chu, J.; Stabnikov, V.; Ivanov, V. (2012). *Microbially induced calcium carbonate precipitation on surface or in the bulk of soil*. Geomicrobiology Journal, Vol. 29, No. 6, pp. 544-549.
- DeJong, J.; Fritzges, M.; Nüsslein, K. (2006). *Microbially Induced Cementation to Control Sand Response to Undrained Shear*. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering (ASCE), Vol. 132, No. 11, pp. 1381–1392.
- DeJong, J.T.; Mortensen, B. M.; Martinez, B.C.; Nelson D.C. (2010). *Bio-mediated soil improvement*. Ecological Engineering, Vol. 36, pp. 196-210.
- DeJong, J.T.; Soga, K.; Kavazanjian, E.; Burns, S.; van Paassen, L.A.; Al Qabany, A.; Aydilek, A.; Bang, S.S.; Burbank, M.; Caslake, L.F.; Chen, C.Y.; Cheng, X.; Chu, J.; Ciurli, S.; Esnault-Filet, A.; Fauriel, S.; Hamdan, N.; Hata, T.; Inagaki, Y.; Jefferis, S.; Kuo, M.; Laloui, L.; Larrahondo, J.; Manning, D.A.C.; Martinez, B.; Montoya, B.M.; Nelson, D. C.; Palomino, A.; Renforth, P.; Santamarina, J.C.; Seagren, E.A.; Tanyu, B.; Tsesarsky, M.; Weaver, T. (2013). *Biogeochemical processes and geotechnical applications: progress, oportunities and challenges*. Géotechnique Vol. 63, No. 4, pp. 287-301.
- E196 (1966). *Solos – Análise granulométrica*. Especificação do LNEC, Lisboa, Portugal.
- E197 (1966). *Solos – Ensaio de compactação*. Especificação do LNEC, Lisboa, Portugal.
- Fujita, Y.; Ferris, F.G.; Lawson, R.D.; Colwell, F.S.; Smith, R.W. (2000). *Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria*. Geomicrobiology Journal, Vol. 17, pp. 305-318.
- Hamdan N.; Kavazanjian J.E.; O'Donnell, S. (2013). *Carbonate Cementation via Plant Derived Urease*. Proceeding of the 18th International Conference on Soil Mechanics and Geotechnical Engineering, Paris, France.

- Hammes, F.; Verstraete, W. (2002). *Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation*. Rev. Environ. Sci. Biotechnol., Vol. 1, No. 1, pp. 3–7.
- Hammes, F.; Boon, N.; Villiers, J.; Verstraete, W.; Siliciliano, S.D. (2003). *Strain-Specific Ureolytic Microbial Calcium Carbonate Precipitation*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, No. 8, pp. 4901-4909.
- Head, K.H. (1982). *Manual of Soil Laboratory Testing, Volume 2: Permeability, Shear Strength and Compressibility Tests*. Pentech Press Limited. Plymouth, London.
- Inagaki, Y.; Tsukamoto, M.; Mori, H.; Nkajima, S. Ssaki, T.; Kawasaki, S. (2011). *A centrifugal model test of microbial carbonate precipitation as liquefaction countermeasure*. Japanese Geotechnical Journal, Vol. 6, No. 2, pp. 157-167 (em japonês).
- Ivanov, V.; Chu, J. (2008). *Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ*. Rev. Environ. Sci Biotechnol., Vol. 7, No. 2, pp. 139-153.
- Jimenez-Lopez, C.; Rodriguez-Navarro, A.; Dominguez-Vera, J.M.; Garcia-Ruiz, J.M. (2003). *Influence of lysozyme on the precipitation of calcium carbonate: A kinetic and morphologic Study*. Geochimica et Cosmochimica Acta, Vol. 67, No. 9, pp. 1667–1676.
- Kalantary, F.; Kahani, M. (2015). *Evaluation of the ability to control biological precipitation to improve sandy soils*. Procedia Earth and Planetary Science (World Multidisciplinary Earth Sciences Symposium), Vol. 15, pp. 278-284.
- Li, W.; Chen, W.S.; Zhou, P.P.; Yu, L.J. (2013). *Influence of enzyme concentration on bio-sequestration of CO₂ in carbonate form using bacterial carbonic anhydrase*. Chemical Engineering Journal, Vol. 232, pp. 149-156.
- Mitchell, J. K.; Santamarina, J. C. (2005). *Biological considerations in geotechnical engineering*. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, Vol. 131, No. 10, pp. 1222-1233.
- Montoya, B.; DeJong, J.; Boulanger, R.; Wilson, D.; Gerhard, R.; Ganchenko, A.; Chou, J. (2012). *Liquefaction Mitigation Using Microbial Induced Calcite Precipitation*. GeoCongress, pp. 1918-1927.
- Mortensen B. M.; Haber, M. J.; DeJong, J. T.; Caslake L. F.; Nelson D. C. (2011). *Effects of environmental factors on microbial induced calcium carbonate precipitation*. Journal of Applied Microbiology, Vol. 111, pp. 338-349.
- Muynck, W. D.; Debrouwer, D.; De Belie, N.; Verstraete, W. (2008). *Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials*. Cement Concr. Res., Vol. 38, No. 7, pp. 1005–1014.
- Muynck, W. D.; Belie, N. D.; Verstraete, W. (2010). *Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review*. Ecological Engineering, Vol. 36, pp. 118-136.
- Nemati, M.; Voordouw, G. (2003). *Modification of porous media permeability, using calcium carbonate produced enzymatically in situ*. Enzyme and Microbial Technology, Vol. 33, pp. 635-642.
- Neupane, D.; Yasuhara, H.; Kinoshita, N.; Unno, T. (2013). *Applicability of enzymatic calcium carbonate precipitation as a soil-strengthening technique*. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, Vol. 139, No. 12, pp. 2201-2211.

- Neupane, D.; Yasuhara, H.; Kinoshita, N.; Unno, T. (2015). *Distribution of mineralized carbonate and its quantification method in enzyme mediated calcite precipitation technique*. Soils and Foundations, Vol. 55, No. 2, pp. 447-457.
- NP 83 (1965). *Solos – Determinação da Densidade das Partículas Sólidas*. Norma Portuguesa Definitiva.
- NP EN 12390-1 (2010). *Ensaio do betão endurecido. Parte 1: Forma, dimensões e outros requisitos para o ensaio de provetes e para os moldes*. IPQ.
- Shirakawa, M. A.; Kaminishikawahara, K. K.; John, V. M.; Kahn, H.; Futai, M. M. (2011). *Sand bioconsolidation through the precipitation of calcium carbonate by two ureolytic bacteria*. Material Letters, Vol. 65, pp. 1730-1733.
- Tiano, P.; Biagiotti, L.; Mastromei, G. (1999). *Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: Methods of evaluation*. Journal of Microbiological Methods, Vol. 36, pp. 139-145.
- Van der Ruyt, M.; van der Zon, W. (2009). *Biological in situ reinforcement of sand in near-shore areas*. ICE – Geotechnical Engineering, Vol. 162, No. 1, pp. 81-83.
- Van Paassen, L. A. (2009). *Biogrout. Ground Improvement by Microbially Induced Carbonate Precipitation*. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Delft University of Technology, Netherlands.
- Van Paassen, L. A.; Ghose, R.; van der Linden, T. J. M.; van der Star, W. R. L.; van Loosdrecht, M. C. M. (2010). *Quantifying biomediated ground improvement by ureolysis: large-scale biogrout experiment*. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, Vol. 136, No. 12, pp. 1721–1728
- Venda Oliveira, P.J.; Costa, M.S.; Costa, J.N.P.; Nobre, M.F. (2015). *Comparison of the ability of two bacteria to improve the behaviour of a sandy soil*. Journal of Materials in Civil Engineering, Vol. 27, No. 1, pp. 06014025. DOI: 10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0001138.
- Venda Oliveira, P.J.; Freitas, L.D.; Carmona, J.P.S.F. (2016). *Effect of Soil Type on the Enzymatic Calcium Carbonate Precipitation Process Used for Soil Improvement*. Journal of Materials in Civil Engineering, pp. 04016263 [DOI:10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0001804].
- Whiffin, V. S. (2004). *Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement*. PhD Thesis. Murdoch University, Perth, Western Australia.
- Whiffin, V. S.; van Paassen, L. A.; Harkes, M. P. (2007). *Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique*. Geomicrobiology Journal, Vol. 24, No. 5, pp. 417-423.
- Yasuhara, H.; Neupane, D.; Hayashi, K.; Okamura, M. (2012). *Experiments and predictions of physical properties of sand cemented by enzymatically induced carbonate precipitation*. Soils and Foundations, Vol. 52, No. 3, pp. 539-549.