UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA RURAL

Uso de bactérias na reparação de fissuras no betão

Marina da Conceição da Silva Martins

Orientação: Professora Teresa Pinheiro-Alves

Coorientação: Professora Solange Oliveira

Mestrado em Engenharia Civil

Área de especialização: *Construção*

Dissertação

Évora, Maio de 2015

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA RURAL

Uso de bactérias na reparação de fissuras no betão

Marina da Conceição da Silva Martins

Orientação: Professora Teresa Pinheiro-Alves

Coorientação: Professora Solange Oliveira

Mestrado em Engenharia Civil

Área de especialização: *Construção*

Dissertação

Évora, Maio de 2015

RESUMO

A presença de micro fissuração em estruturas de betão é algo difícil de evitar. Uma deficiente cura, composição inadequada, condições climatéricas adversas e outras ações exteriores podem favorecer a sua aparição. Quando surjam, estas microfissuras poderão permitir a entrada de agentes agressivos e consequentemente reduzir a vida útil das estruturas. Nesta dissertação foi realizado um estudo que consistiu na introdução de bactérias *Bacillus cohnii* no betão com o intuído das mesmas fecharem as microfissuras que possam surgir.

Foram preparadas as bactérias, respetivos meios precursores e os betões onde foram introduzidas as bactérias, sendo consideradas várias situações para a incorporação das bactérias nos betões. Após o endurecimento dos betões foram induzidas fissuras por via mecânica. Para acompanhamento da evolução do fecho das fissuras foram efetuados um conjunto de ensaios, os quais permitiram verificar que foi possível fechar microfissuras até 0,34 mm.

Palavras-chave: *Self-healing Concrete*, Bactéria, *Bacillus cohnii*, Carbonato de Cálcio, Sustentabilidade, Betão.

ABSTRACT

Use of bacterium to repair cracks in concrete

The presence of micro-cracking in concrete structures is difficult to avoid. A deficient healing, inadequate composition, adverse weather conditions and other external actions may favor its emergence. When these micro-cracks arise may permit the entry of aggressive agents and consequently reduce the life of the structures. In this thesis we made a study that consisted in the introduction of bacteria *Bacillus cohnii* spores in the concrete with the aim of closing the micro-cracks. For this purpose, the bacteria, the calcium precursor and the concrete were prepared. Various situations for the incorporation of bacteria in concrete were considered. The concrete cracks were created after hardening with mechanical means. To follow the evolution of the closing of cracks were conducted a set of tests, which helped confirm that it is possible to close the micro-cracks up to 0,34 mm.

Keywords: Self-healing Concrete, Bacteria, *Bacillus cohnii*, Calcium Carbonate, Sustainability, Concrete.

AGRADECIMENTOS

Antes de mais gostaria de agradecer à minha orientadora Prof.ª Teresa Pinheiro-Alves por toda a disponibilidade, paciência e consideração demonstrada neste meu longo percurso. Ajudou, sem sombra de dúvidas, a despertar as minhas capacidades para a resolução de problemas neste projeto, tornando-o numa experiência extremamente enriquecedora. Agradeço à Prof.ª Solange Oliveira pela ajuda e disponibilidade, assim como, o permitir que utilizasse as instalações do laboratório de Microbiologia do Solo do ICAAM. À Doutora Marta Laranjo pela paciência e disponibilidade que demonstrou para me instruir na área da microbiologia um muito obrigado também. Todas foram incansáveis.

Ao laboratório «Hércules» pela pronta disponibilidade para execução de ensaios SEM/EDS e DRX, mais concretamente ao Prof.º António Mirão e ao técnico de laboratório Luís Dias. Um muito obrigado também ao Departamento de Geociências da Universidade de Évora (Laboratório de Geotecnia) e à professora Paula Faria pela disponibilidade demonstrada para execução de ensaios granulométricos, à Prof.ª Doutora Maria Ivone Clara pela disponibilidade do Laboratório de Virologia Vegetal do ICAAM para execução dos ensaios de Estereomicroscópio e à Prof.ª Doutora Maria Rosário Félix pelos conhecimentos transmitidos no âmbito deste último ensaio. Agradeço também à Prof.ª Ana Teresa Caldeira pela disponibilidade do laboratório do Centro de Química da Universidade de Évora para a execução do MPN.

Gostaria também de agradecer à Secil e Britobetão pela oferta do cimento e areia.

Gostaria de estender os meus agradecimentos aos meus colegas Thúlio Diniz e Rui Condeço pela ajuda que me deram em laboratório e à D. Gertrudes Mariano pela paciência.

E, por final, um muito obrigado à minha família que sempre me apoiou nas minhas escolhas, mais concretamente à minha mãe Rosa, irmão Nuno, avó Luísa, avô Silva, madrinha Paula Carvalho, padrinho Paulo Costa e me ensinaram a nunca desistir perante os obstáculos dando-me a oportunidade de me formar nesta área. Ao meu pai, que apesar de não estar mais presente foi um pilar na minha vida, que me ensinou a nunca desistir de alcançar os meus

objetivos. Ao meu namorado Óscar, pela paciência que teve comigo e pela força que me deu durante este projeto.

Um muito obrigado também a todos os meus amigos que me motivaram na escrita desta dissertação, Sílvia Tira-Picos, Ana Mä, Rita Silva, Filipe Aparício, Milena Lima, Jorge Fava Rica, Patrícia Almeida, Paulo Selão Gabriela Marujo e Anabela Pereira que tornaram a minha passagem por Évora uma recordação fantástica.

«Há Homens que lutam um dia e são bons.

Há outros que lutam um ano e são melhores.

Há os que lutam muitos anos e são muito bons.

Porém, há os que lutam toda a vida.

Esses são os imprescindíveis.»

Bertolt Brecht

Dedico esta dissertação à minha família, amigos e namorado.

ÍNDICE

RESUMO i

ABSTRACT ii

AGRADECIMENTOS iii

ÍNDICE vi

ÍNDICE DE FIGURAS ix

Abreviaturas / Nomenclaturas xv

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 3

3. ANTECEDENTES 3

3.1. Produção do carbonato de cálcio 7

4. MATERIAIS 13

- **Cimento** 13
- **Agregados** 14
- **Água** 17
- **Bactéria** 17
- **Lactato de Cálcio e Extrato de levedura** 19

5. MÉTODOS 20

5.1. Elaboração dos meios de cultura 20

- **Meio de cultura Alcalino** 21
- **Meio de esporulação** 23
- **Precursor Mineral** 25

5.2. Execução do betão 27

5.2.1. Composição do betão 31

5.3. Ensaios 40

- **Ensaio granulométrico** 40
- **Teor de humidade** 41

- **Ensaio de abaixamento** 43
- **Indução de fissuras**..... 43
- **Resistência à compressão** 45
- **Inspeção visual (Estereomicroscópio)**..... 46
- **Microscópio eletrónico de varrimento e espetrometria de Raios-X (SEM/EDS)**..... 47
- **Número mais provável (MPN)** 48
- **Difração de Raios-X (DRX)** 51
- **Alteração dos padrões de cura**..... 52

6. RESULTADOS E SUA ANÁLISE..... 55

6.1. Ensaio de resistência à compressão..... 55

6.2. Inspeção visual (estereomicroscópio) 56

6.3. Microscópio eletrónico de varrimento e espetrometria de Raios-X (SEM/EDS) 66

6.4. DRX..... 96

6.5. MPN 101

6.6. Alteração dos padrões de cura..... 102

7. DISCUSSÃO DE RESULTADOS 103

7.1. Ensaios de resistência à compressão..... 103

7.2. Inspeção Visual (Estereomicroscópio) 103

7.3. SEM 107

7.4. DRX..... 109

7.5. MPN 109

8. CONCLUSÕES..... 110

BIBLIOGRAFIA 113

ANEXOS 119

Anexo A – Meios de cultura e identificação da bactéria; 119

Anexo B – Fichas técnicas dos materiais; 119

Anexo C – Teor de humidade dos agregados; 119

Anexo D – Granulometria e massa volúmica dos agregados; 119

Anexo E – Composição do betão; 119

Anexo F – Ensaio de resistência à compressão; 119

Anexo G – DRX. 119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Betões auto reparadores [adaptado de 2
Figura 2 - Partícula de argila expandida com máxima absorção (porosidade aberta) 7
Figura 3 - Processo de cozedura do clínquer 8
Figura 4 - Quantidade relativa de compostos formados durante a hidratação ... 8
Figura 5 – Processo de carbonatação referido na Reação 1 9
Figura 6 - Micrografia de morfologias típicas de calcite, aragonite, vaterite e carbonato de cálcio amorfo (ACC) 11
Figura 7 - Mecanismo de formação de carbonato de cálcio a partir da conversão metabólica do lactato de cálcio por parte da *Bacillus cohnii* e da carbonatação do betão 12
Figura 8 – Formação de bio mineral Carbonato de Cálcio. 12
Figura 9 – Argila expandida 14
Figura 10 – Curvas granulométricas dos agregados 15
Figura 11 – Bactéria liofilizada 17
Figura 12 - Cultura de *Bacillus cohnii* em placa de Petri 19
Figura 13 – Metodologia de trabalho 20
Figura 14 – Autoclave (Modelo: Uniclave 88) 22
Figura 15 - Agar nutritivo após autoclave. 22
Figura 16 – Identificação do meio precursor mineral 26
Figura 17 – *Bacillus cohnii* em glicerol a -80ºC 27
Figura 18 – Absorvância (D.O.) da cultura bacteriana medida após 16h de cultura líquida, em espetrofotómetro. 28
Figura 19 – Contagem dos esporos no microscópio ótico usando lente de imersão e respetiva placa de contagem. 29
Figura 20 – Esporos visualizados no Microscópio Ótico 29
Figura 21 - Lavagem do meio de esporulação 30
Figura 22 – Processo de amassadura 34
Figura 23 – Introdução de esporos bacterianos na água de amassadura (BB) 35
Figura 24 – Moldes cúbicos (15x15x15 cm) 35
Figura 25 – Homogeneidade da distribuição dos agregados nas amostras 36
Figura 26 – Provetes selados com película durante 24 h 37

Figura 27 – Cura seca (6 dias) 38
Figura 28 – Cura húmida (1 dia) 38
Figura 29 - Repartidor. 40
Figura 30 - Sequência de peneiros utilizados no ensaio de peneiração (Modelo: Retsch VS1000) 41
Figura 31 - Estufa ventilada (Modelo: P.Selecta Cod:2001245) 42
Figura 32 - Estufa ventilada contendo tabuleiros metálicos com amostras de argila expandida. 42
Figura 33 - Ensaio de abaixamento (Betão Base) 43
Figura 34 - Prensa para ensaios de resistência à compressão (Modelo: COMTEST Impact) 44
Figura 35 – Corte dos provetes na mesa de corte com disco diamantado (Modelo: Gölz TS350) 45
Figura 36 - Estereomicroscópio para inspeção visual. 46
Figura 37 –Metalizador (Au/C) para microscopia eletrónica EMITECH 47
Figura 38 - Microscópio eletrónico de varrimento de vácuo variável HITACHI 3700N com espetrómetro de raios X por dispersão de energias (MEV-EDS) acoplado BRUKER Xflash 5010SDD (SEM/EDS) 48
Figura 39 - Câmara de fluxo vertical (Modelo: FLUFRANCE EUROPEENNE) 49
Figura 40 – Tubo centrífugo contendo MRD e a amostra de betão triturada. .. 50
Figura 41 - Difratómetro de Raios-X (Modelo D8 Discover da Bruker®) 52
Figura 42 – Resistências à compressão das composições 55
Figura 43 - Inspeção visual na amostra de betão BASE aos 29 e 174 dias ampliadas 10 e 45 vezes. 56
Figura 44 - Inspeção visual na amostra de betão BL aos 29 e 174 dias ampliadas 10 e 45 vezes. 57
Figura 45 - Inspeção visual na amostra de betão BB aos 35 e 193 dias ampliadas 10 e 45 57
Figura 46 - Inspeção visual na amostra de betão BBL1 aos 31 e 188 dias ampliadas 10 e 45 vezes. 58
Figura 47 - Inspeção visual na amostra de betão BBL2 aos 36 e 194 dias ampliadas 10 e 45 vezes. 59
Figura 48 – Inspeção visual na amostra BASE aos 29, 44, 56, 97 e 174 dias com ampliações de 6,7x, 15x, 35x e 45x. 60

Figura 49 - Inspeção visual na amostra BB aos 35, 57, 69, 110 e 193 dias com ampliações de 6,7x, 15x, 35x e 45x. 61
Figura 50 - Inspeção visual na amostra BL aos 29, 44, 56, 97 e 174 dias com ampliações de 6,7x, 15x, 35x e 45x. 62
Figura 51 - Inspeção visual na amostra BBL1 aos 31, 53, 65, 106 e 188 dias com ampliações de 6,7x, 15x, 35x e 45x. 63
Figura 52 - Inspeção visual na amostra BBL2 aos 36, 58, 70, 111 e 194 dias com ampliações de 6,7x, 15x, 35x e 45x. 64
Figura 53 – Evolução da mineralização da amostra BBL2 ao longo do tempo. 65
Figura 54 - Análise SEM às amostras BASE aos 33, 94 e 176 dias de idade.. 66
Figura 55 - SEM/EDS na amostra de betão BASE aos 33 dias de idade identificando a presença de minerais. 68
Figura 56 - SEM/EDS na amostra de betão BASE aos 176 dias de idade identificando a presença de minerais. 69
Figura 57 - SEM/EDS na amostra de betão BASE aos 176 dias de idade identificando a presença de minerais. 70
Figura 58 – Pasta endurecida – C-S-H de maior densidade a envolver cristais de $Ca(OH)_2$, resíduos de cimento não hidratados e poros capilares (adaptado de Domone, 1994)..... 71
Figura 59 - Análise SEM às amostras BL aos 33, 94 e 176 dias de idade..... 71
Figura 60 - SEM/EDS na amostra de betão BL aos 33 dias de idade identificando a presença de minerais. 72
Figura 61 - SEM/EDS na amostra de betão BL aos 176 dias de idade identificando a presença de minerais. 73
Figura 62 - Análise SEM às amostras BB aos 50, 106 e 190 dias de idade. ... 74
Figura 63 - SEM/EDS na amostra de betão BB aos 50 dias de idade identificando a presença de aragonite e de esporos bacterianos..... 75
Figura 64 - Análise SEM às amostras BBL1 aos 31, 46, 102 e 186 dias de idade. 76
Figura 65 - SEM/EDS na amostra de betão BBL1 aos 46 dias de idade identificando a presença de cristais de hidróxido de cálcio na amostra. 77
Figura 66 - SEM/EDS na amostra de betão BBl1 aos 102 dias de idade identificando a presença de cristais de calcite. 78

Figura 67 – Espetro de aquisição EDS na amostra BBL1 aos 46 dias de idade. 79
Figura 68 – (a):SEM/EDS aos 31 dias de idade. (b): micrografia da imagem (a) mostrando a distribuição de cálcio e sílica na amostra; (c): EDS da imagem (a); (d): micrografia da imagem (a) mostrando a distribuição de carbono na amostra; (e): micrografia da imagem (a) mostrando a distribuição de oxigénio na amostra. 80
Figura 69 - Análise SEM às amostras BBL2 aos 34, 45, 105 e 189 dias de idade. 81
Figura 70 – SEM/EDS na amostra de betão BBL2 aos 34 dias de idade identificando a imagem (a) da Fig. 69. 83
Figura 71 - SEM/EDS na amostra de betão BBL2 aos 45 dias de idade. 84
Figura 72 - SEM/EDS na amostra de betão BBL2 aos 45 dias de idade. 85
Figura 73 - SEM/EDS na amostra de betão BBL2 aos 105 dias de idade identificando a imagem (c) da Fig. 69. 86
Figura 74 - SEM/EDS na amostra de betão BBL2 aos 105 dias de idade. 87
Figura 75 - SEM/EDS na amostra de betão BBL2 aos 105 dias de idade identificando a imagem (d) da Fig. 69. 88
Figura 76 - SEM/EDS na amostra de betão BBL2 aos 105 dias de idade. 89
Figura 77 - SEM/EDS aos 35 dias de idade. (b): micrografia da imagem (a) mostrando a distribuição de cálcio e sílica na amostra; (c): EDS da imagem (a); (d): micrografia da imagem (a) mostrando a distribuição de carbono na amostra; (e): micrografia da imagem (a) mostrando a distribuição de oxigénio na amostra. 90
Figura 78 – Micrografia SEM na amostra Base aos 33, 94 e 176 dias. (a):matriz; (b):fissura; (c):argila; (d): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite (romboédrico) e silicatos de cálcio hidratados (rede) na matriz; (e): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite (romboédrico) e silicatos de cálcio hidratados (rede) na fissura; (f): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite (romboédrico) e silicatos de cálcio hidratados (rede) na argila; (g):matriz; (h):fissura; (i):argila; (j): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite (romboédrico) e silicatos de cálcio hidratados (rede) na matriz; (k): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite (romboédrico) e silicatos de cálcio hidratados (rede) na fissura; (l):

identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite (romboédrico) e silicatos de cálcio hidratados (rede) na argila; (m): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite (romboédrico) e hidróxido de cálcio na fissura. 91
Figura 79 - Micrografia SEM na amostra BB aos 50, 106 e 190 dias. (a): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de aragonite (prismático, acicular) na fissura; (b): micrografia da argila com cristais de hidróxido de cálcio; (c): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de aragonite (prismático, acicular) na fissura (ampliação de (a)); (d): presença de carbonato de cálcio com hábito característico de calcite na matriz do betão; (e): presença de carbonato de cálcio com hábito característico de calcite na fissura; (f): Identificação de cristais de hidróxido de cálcio (portlandita) e carbonato de cálcio (calcite) na argila; (g): sedimentação de calcite na matriz do betão; (h): sedimentação de calcite na fissura; (i): sedimentação de calcite e portlandita na argila; (j): ampliação de (h); (k): ampliação de (i). 92
Figura 80 - Micrografia SEM na amostra BL aos 33, 94 e 176 dias. (a):matriz; (b):fissura; (c):argila; (d): matriz; (e): fissura; (f): micrografia da argila com cristais de carbonato de cálcio (calcite) e hidróxido de cálcio (portlandita); (g): ampliação de (d) identificando a presença de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite e silicatos de cálcio hidratados; (h): ampliação de (f) identificando a presença de calcite e C-S-H; (i): microesferas de vaterite (j): sedimentação de calcite e portlandita na fissura; (k): sedimentação de calcite e portlandita na argila; (l): ampliação de (j). 93
Figura 81 - Micrografia SEM na amostra BBL1 aos 31, 46, 102 e 186 dias. (a):identificação de calcite na fissura; (b):identificação de portlandita na argila; (c): ampliação de (a) identificando hábito típico de calcite (romboédrico); (d): sedimentação de hidróxido de cálcio na zona da fissura; (e): prováveis células vegetativas *Bacillus cohnii*; (f) identificação de calcite) e portlandita na matriz; (g): sedimentação de calcite na fissura; (h): hidróxido de cálcio; (i): ampliação de (g) permitindo também a identificação de C-S-H; (j): sedimentação de hidróxido de cálcio na argila; (k): identificação de calcite, portlandita e etringita; (l): mineralização intensa na fissura; (m): mineralização heterogénea na argila. .. 94
Figura 82 - Micrografia SEM na amostra BBL2 aos 34, 45, 105 e 189 dias. (a):calcite presente na matriz; (b):sedimentação de calcite na fissura; (c):

sedimentação de hidróxido de cálcio (portlandita) na argila; (d): identificação de aragonite na amostra; (e): identificação de C-S-H na matriz do betão juntamente com calcite e portlandita; (f): Elevada mineralização da fissura com cristais de calcite e portlandita; (g): Morfologia típica de aragonite e calcite na argila; (h): matriz com mineralização homogénea; (i): elevada mineralização da fissura com cristais de calcite e portlandita; (j): cristais de calcite e portlandita na argila.... 95
Figura 83 - DRX na amostra de betão BASE aos 156 dias. 96
Figura 84 - DRX na amostra de betão BB aos 156 dias..... 96
Figura 85 - DRX na amostra de betão BL aos 169 dias. 97
Figura 86 - DRX na amostra de betão BBL1 aos 165 dias..... 97
Figura 87 - DRX na amostra de betão BBL2 aos 170 dias..... 98
Figura 88 - Gráficos comparativos de DRX das várias amostras. 99
Figura 89 – Resultados de MPN: Colónias após 2 dias de crescimento. 101
Figura 90 - Mineralização das fissuras das amostras de BBL1 e BBL2 com diferentes idades. Evidências de que as amostras de BBL1 se encontram mais carbonatadas que as de BBL2. 104
Figura 91 - Mineralização das fissuras das amostras de BB e BL com diferentes idades. Evidências de que as amostras não possuem mineralização capaz de selar fissuras. 105
Figura 92 - Tabela comparativa da amostra BBL2, aos (a) 36 e (b) 111 dias com 35x de ampliação; (c): ampliação da zona mineralizada em (a); (d): ampliação da zona mineralizada em (b). 105
Figura 93 - SEM na amostra BBL2 aos 34 e aos 189 dias..... 106
Figura 94 – Análise comparativa de uma microfissura aos 111 dias de idade na amostra de BBL2..... 106
Figura 95 - Aragonite nas amostras de BBL2 (42 dias)..... 107
Figura 96- Aragonite nas amostras de BB (50 dias)..... 107
Figura 97 - Sedimentação de C-H nas amostras de BBL1..... 108
Figura 98 - Comparação de esporos bacterianos na amostra BB com esporos bacterianos cultivados em Meio de esporulação sólido. (a): SEM na amostra BB aos 50 dias; (b): SEM de esporos bacterianos cultivados em Meio de esporulação sólido. 108
Figura 99 - Presença de C-S-H na matriz da amostra BASE. 109

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Análise química do CEM I 42,5R..... 13
Tabela 2 - Resistência mecânica do CEM I 42,5R..... 13
Tabela 3 - Ensaios físicos do CEM I 42,5R..... 13
Tabela 4 – Características químicas, mecânicas e físicas da argila expandida16
Tabela 5 – Agar Nutritivo – Meio 1..... 21
Tabela 6 – Sesquicarbonato de sódio..... 23
Tabela 7 – Meio de esporulação..... 24
Tabela 8 – Solução SL12 B..... 25
Tabela 9- Concentrações de esporos introduzidas nas amassaduras de betão 31
Tabela 10 – Composição do betão..... 32
Tabela 11 – Ensaios por composição e dimensão das amostras..... 39
Tabela 12 - Esquema ilustrativo do processo MPN seguido. 50
Tabela 13 - Modelos das amostras para cada ensaio..... 53
Tabela 14 – Resultados comparativos das várias amostras da difração de Raios-X..... 98
Tabela 15 – Classe de resistência à compressão das várias amostras aos 28 dias..... 103

Abreviaturas / Nomenclaturas

Símbolos dos óxidos, de acordo com a notação química usada no cimento

Óxido	CaO	SiO_2	Al_2O_3	Fe_2O_3	MgO	Na_2O	K_2O	SO_3	CO_2	H_2O
Símbolo	C	S	A	F	M	N	K	$\bar{S}$	$\bar{C}$	H

Notação abreviada dos principais compostos químicos do cimento

Composto	Composição	Abreviatura
Silicato tricálcico	$3CaO \cdot SiO_2$	C3S
Silicato bicálcico	$2CaO \cdot SiO_2$	C2S
Aluminato tricálcico	$(CaO)_3Al_2O_3$	C3A
Aluminoferrato tetracálcico	$(CaO)_4Al_2O_3Fe_2O_3$	C4AF
Hidróxido de cálcio	$Ca(OH)_2$	CH
Sulfato de cálcio	$CaSO_4$	$C\bar{S}$
Gesso	$Ca(SO_4).2H_2O$	$C\bar{S}H2$
Silicatos de cálcio hidratados (composição química)	$xCaO \cdot SiO_2 \cdot yH_2O$	C-S-H

BASE Betão com composição base

BASE H Betão com composição base com cura padrão em água

BL Betão com composição base e meio percursor mineral incorporado na matriz

BB Betão com composição base e esporos bacterianos incorporados na matriz

BBL1 Betão com composição base com metade da argila incorporando meio percursor mineral e outra metade incorporando esporos bacterianos

BBL2 Betão com composição base com meio percursor mineral e esporos bacterianos incorporados na mesma argila

SEM/EDS Microscópio eletrónico de varrimento e espetrometria de Raios-X

MPN	Ensaio do número mais provável
DRX	Difração de Raios-X

1. INTRODUÇÃO

O betão é um dos materiais compósitos mais utilizados na construção civil. Mesmo ainda em estado fresco começam a surgir as primeiras fissuras as quais, a longo prazo representam um grande investimento em reabilitação e reparação das estruturas.

O surgimento de fissuras estabilizadas no betão deve-se à secagem do material, às amplitudes térmicas a que se encontra sujeito, a reações químicas (Radlinska, 2008) e à incorreta execução e cura em obra. Com o surgimento destas fissuras desde a idade jovem, facilmente a sua matriz pode entrar em contacto com água, compostos químicos como sulfatos, cloretos, ácidos, dióxido de carbono, entre outros, que podem favorecer a degradação do betão.

A indústria produtora de cimento é das mais poluentes a nível mundial, responsável pela emissão de cerca de 10% de CO_2 antropogénico *(Jonkers, et al.*, 2009). Por cada tonelada de cimento produzida é libertada cerca de 1 tonelada de CO_2 para a atmosfera *(*Crow, *et al.*, 2008). Visto ser um dos principais componentes do betão, se prolongarmos a vida útil dos elementos fabricados com este material, estaremos a reduzir parte deste impacto ambiental associado à sua utilização em larga escala.

Já existem alguns estudos sobre betões que se autorreparam de forma natural, química ou biológica (Fig. 1). Estes tipos de betões podem vir a revolucionar o mercado da construção, tanto ao nível da durabilidade como ao nível económico. Nesta dissertação apenas serão abordados os que utilizam bactérias. Têm como base a utilização de bactérias produtoras de esporos e de um elemento percursor cuja junção resultará numa reação química, que ativada pela água e pelo dióxido de carbono irá produzir carbonato de cálcio, Este carbonato de cálcio surge em forma de calcite ou aragonite e acabará por selar as fissuras. Pode também surgir através da deposição na membrana celular das bactérias (no caso de bactérias ureolíticas) cuja reação processada é a hidrólise da ureia, produzindo como subprodutos o carbonato de cálcio e a amónia.

A nomenclatura química utilizada nesta dissertação é a utilizada em Engenharia Civil. Os meios de cultura foram tabelados para otimizar a sua leitura, mas de

qualquer forma, como em microbiologia seguem regras diferentes, encontram-se no Anexo A corretamente descritos. Por outro lado foram dadas algumas noções de microbiologia para familiarizar o Engenheiro Civil com esta área científica. O presente estudo apenas contempla o betão e não foram feitos estudos contemplando armaduras (betão armado).

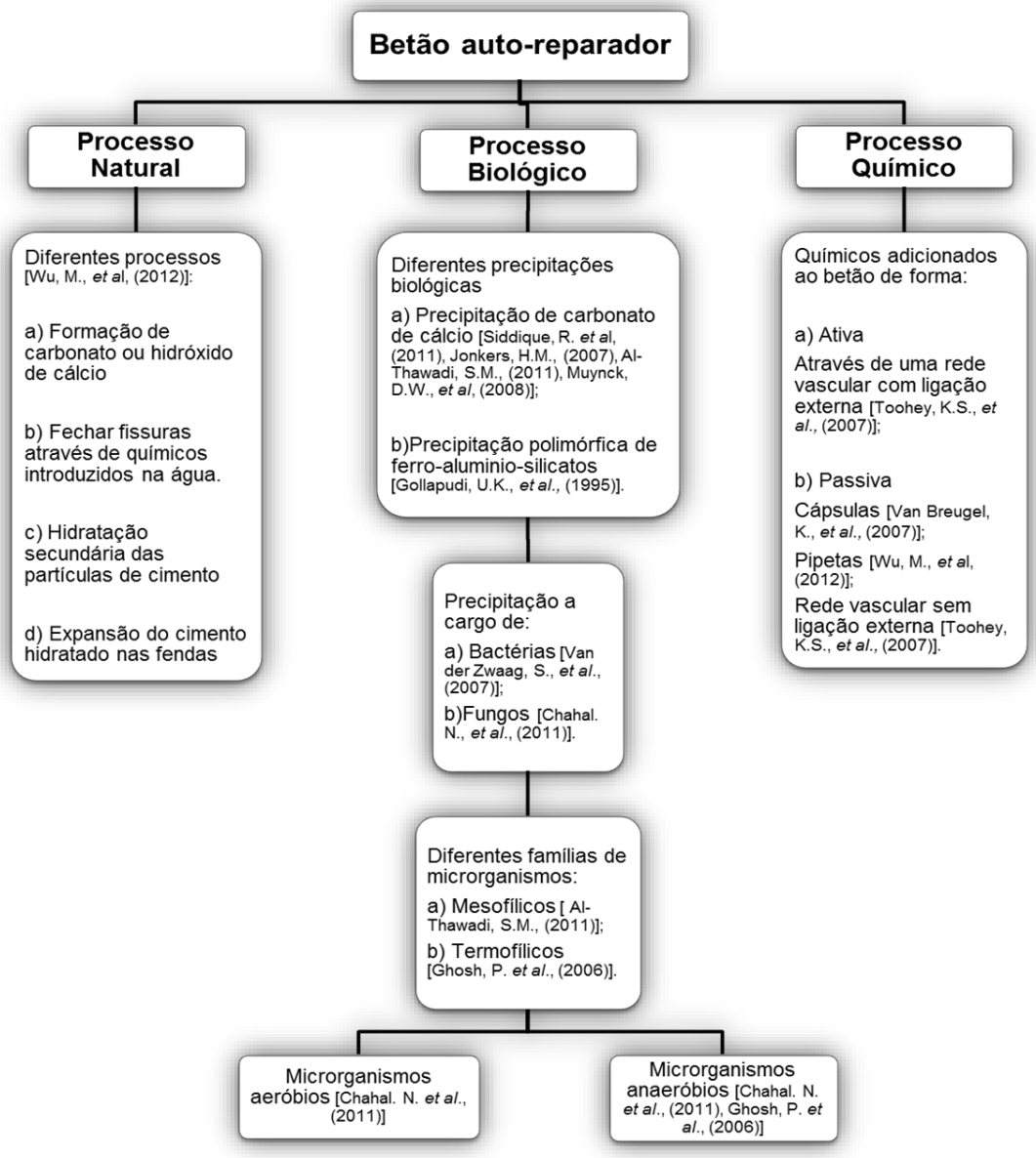


Figura 1 - Betões auto reparadores [adaptado de *(A Review of Self-healing Concrete Research Development, 2014)]*

2. OBJETIVOS

O principal objetivo desta dissertação foi o de testar a capacidade de selagem de fissuras no betão através da introdução de esporos bacterianos *Bacillus cohnii*. Para a introdução destes esporos foi necessário arranjar um meio percursor mineral, o qual ficou definido que se iria utilizar o lactato de cálcio. Como outros objetivos ficou definido que se analisaria a influência, em separado, dos esporos bacterianos *Bacillus cohnii* e lactato de cálcio em termos de resistência mecânica do betão.

3. ANTECEDENTES

Para o desenvolvimento desta dissertação foram analisados um conjunto de artigos científicos, que falam sobre a bactéria utilizada no desenvolvimento desta dissertação (*Bacillus cohnii*), assim como, do uso de bactérias para reparação de microfissuras no betão. Na análise efetuada foram considerados todos os materiais, ensaios e métodos seguidos pelos autores.

Nos parágrafos seguintes é feita uma síntese dos principais artigos estudados nesta dissertação, que falam sobre a incorporação de bactérias em elementos na pasta de cimento, argamassa ou betão para a produção de carbonato de cálcio e consequente selagem de microfissuras aí existentes. Os trabalhos são apresentados por ordem cronológica.

***Spanka et al.* (1993)** fizeram pela primeira vez a caracterização da estirpe *B. cohnii*, identificando-a como estirpe DSMZ 6307. Esta bactéria é não ureolítica e aeróbia.

***Jonkers et al.* (2008)** utilizam pela primeira vez a bactéria *Bacillus cohnii* (DSMZ 6307) no fabrico de pasta de cimento para reparação de microfissuras. No artigo em questão o meio percursor mineral utilizado foi o lactato de cálcio. Evidencia que é possível a selagem de microfissuras em betões nas primeiras idades, devido à existência de uma hidratação secundária das partículas de cimento que não foram hidratadas durante o processo de amassadura e que aliadas à introdução das bactérias produtoras de calcite e um elemento percursor mineral,

conseguem aumentar a eficácia do processo de selagem das fissuras. Conclui que a porosidade da pasta de cimento através deste mecanismo é reduzida ao longo do tempo e que a resistência à compressão aumenta.

De Belie *et al.* (2009) utilizam a *Bacillus sphaericus,* que é uma bactéria ureolítica e aeróbia. Neste estudo a bactéria é incorporada em *Sol-gel* e as amostras de betão já endurecido são imersas nesta solução, por um período de 20 minutos com secagem durante 24 horas à temperatura ambiente, sendo o processo repetido 3 vezes. Após o ensaio, os autores verificaram que é possível a selagem de microfissuras.

Jonkers *et al.* (2010) neste trabalho de investigação voltam a testar a bactéria *Bacillus cohnii* (DSMZ 6307) e testam uma outra, a *Bacillus pseudofirmus* (DSMZ 8715). Esta última é aeróbia também. Como meio percursor mineral utilizaram o extrato de levedura, a peptona, o lactato de cálcio e o acetato de cálcio. Este estudo poderia ter sido muito interessante, no entanto, os autores nunca chegam a comparar o comportamento das duas bactérias, assim como, não chegam a combinar cada uma das bactérias com cada um dos meios percursores. Concluem, no entanto, que o meio percursor pode provocar uma diminuição da resistência da pasta de cimento nomeadamente, o extrato de levedura, acetato de cálcio e peptona.

Biswas *et al.* (2010), neste trabalho os autores utilizam uma nova bactéria anaeróbia facultativa, termofílica e gram-negativa, a BKH1 (*Thermoanaerobactor thermohydrosulfuricus*). No estudo não referem nada acerca do meio percursor mineral, não se sabendo se foi utilizado algum, ou não. Comprovou que com a introdução de BKH1 nas amostras de argamassa aumentaram em cerca de 25% a resistência à compressão das mesmas. Atualmente, esta bactéria não se encontra disponível no mercado, mas considera-se que se deve realizar um estudo mais aprofundado, visto que sendo uma bactéria gram-negativa contém uma endotoxina responsável pela sua patogenicidade denominada por lipopolissacarídeo (LPS).

Tittelboom *et al.* (2010) estudam uma bactéria ureolítica chamada *Bacillus sphaericus*. Conclui que esta bactéria utilizada diretamente na matriz do betão, não consegue produzir carbonato de cálcio para selar fissuras. Por outro lado,

referem que se esta bactéria for imobilizada em sílica gel e posteriormente introduzida no betão tem a capacidade de selar fissuras até 0,4 mm. Afirma ser um processo completamente limpo e natural que deve ser estudado e avaliada a durabilidade desta técnica.

Siddique *et al.* (2011) analisam neste artigo o efeito de várias bactérias ureolíticas na produção de carbonato de cálcio utilizadas por diversos autores. Pela primeira vez, é explicado o mecanismo de precipitação de carbonato de cálcio em forma de calcite a partir do resultado da atividade metabólica das bactérias envolvidas e, o autor presume que quase todo o tipo de bactérias é capaz de produzir $CaCO_3$ como resultado da fotossíntese, redução de sulfato e hidrólise da ureia. Das várias bactérias consideradas no estudo, a estirpe *Bacillus pasteurii* é a que mais ativamente decompõe a ureia em amónia, ou seja, com elevada atividade ureolítica tornando-a mais eficiente na possível produção de carbonato de cálcio. O autor refere também, que o tipo de cultura bacteriana e o seu meio de cultura têm um elevado impacto na morfologia dos cristais produzidos por este mecanismo, muitas das vezes melhorando as características físicas e mecânicas do betão.

Wiktor *et al.*, (2011) substituem parcialmente os agregados convencionais por agregados de argila expandida. Estes últimos vão servir de reservatórios para os esporos bacterianos e para o meio percursor mineral. O meio percursor mineral utilizado neste estudo foi o carbonato de cálcio e a estirpe bacteriana *Bacillus alkalinitrilicus* (aeróbia).

Neste estudo, os autores induzem as fissuras no betão a partir de barras de ferro zincado que são colocadas no interior dos provetes e tracionadas aos 56 dias de idade criando pequenas fissuras. Após a indução das fissuras, as amostras (com altura de 4 cm) são curadas imersas em 3,5 cm de altura de água em baldes plásticos, onde permanecem durante todo o estudo, exceto em períodos de realização dos ensaios. Os autores referem que a capacidade de cura deste método deve-se presumivelmente à produção de carbonato de cálcio direta (conversão metabólica do lactato de cálcio) e indiretamente combinada (reação de moléculas de CO_2 provenientes da reação entre o lactato de cálcio e o oxigénio, vai reagir com o $Ca(OH)_2$ (portlandita ou hidróxido de cálcio) para

produzir mais carbonato de cálcio). Dos resultados obtidos, verificaram que ao fim de 100 dias de cura foi possível selar fissuras com cerca de 0,18 mm de largura.

Poucas são as estruturas em betão que se encontram imersas em água 24h por dia, assim sendo considera-se que a manutenção parcial constante das amostras imersas em água não representa o que ocorre normalmente numa estrutura. Possivelmente os autores optaram por esta metodologia para acelerar o processo de reparação das fissuras, mantendo disponíveis todos os elementos químicos necessários para que seja constante a formação de carbonato de cálcio.

Wang *et al.* (2012) testam a introdução dos esporos bacterianos de *Bacillus sphaericus* (LMG 22,557) em sílica gel e poliuretano em argamassa. Verificou que existe mais atividade bacteriana nas amostras com sílica gel e que as amostras com poliuretano têm maior resistência à compressão e coeficiente de permeabilidade à água inferior, comparativamente com as amostras com sílica gel. Concluem que as bactérias conseguem manter a sua atividade ureolítica e a sua capacidade de produção de carbonato de cálcio imobilizadas tanto em sílica gel como em poliuretano verificando que o poliuretano é mais eficiente para utilização no betão.

Para uma melhor compreensão do comportamento de agregados leves no que toca à sua capacidade de absorção, foi também analisado o seguinte artigo:

Bogas *et al.* (2012) falam sobre a capacidade de absorção de água de vários agregados leves de argila expandida de diferentes marcas Ibéricas. São enumerados os vários parâmetros que podem afetar a sua capacidade de absorção tais como a sua microestrutura, as características da sua superfície externa, a percentagem de partículas partidas, teor de humidade inicial e as características exteriores à própria amostra. Foram avaliados 5 estados de humidade possíveis dos agregados antes da sua introdução no betão. Refere que saturação é um estado de hidratação máxima das partículas numa área exterior e a parte interna desidratada como ilustra a Fig. 2.

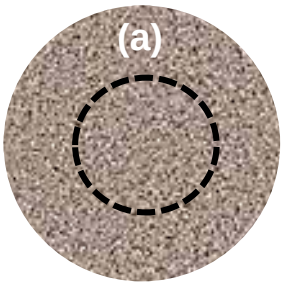


Figura 2 - Partícula de argila expandida com máxima absorção (porosidade aberta)
(a) Zona saturada máxima

Concluem que a argila expandida com maior porosidade aberta é a Argex®, assim como, uma pré-secagem destes agregados antes da sua introdução no betão apenas influência a trabalhabilidade do betão.

3.1. Produção do carbonato de cálcio

O carbonato de cálcio pode aparecer em betões sob várias formas e a partir de várias situações, que não só a partir da incorporação de bactérias como relatado anteriormente.

O cimento Portland é basicamente o produto da calcinação de calcário (predominantemente constituído por $CaCO_3$) e materiais argilosos (onde temos compostos como SiO_2, Al_2O_3 e Fe_2O_3), com outros compostos secundários como óxido de magnésio, fosfatos etc., em torno dos 1500ºC dando origem ao clínquer que, após arrefecer bruscamente, é moído juntamente com compostos sulfáticos formando este ligante (Fig. 3). Durante a hidratação do cimento (Fig. 4), os seus componentes ricos em CaO reagem com a água formando o gel C-S-H e CH, daí a presença de Hidróxido de Cálcio na matriz do betão (Reação 1).

$$CaO + H_2O \longrightarrow Ca(OH)_2 \quad \textbf{(1)}$$

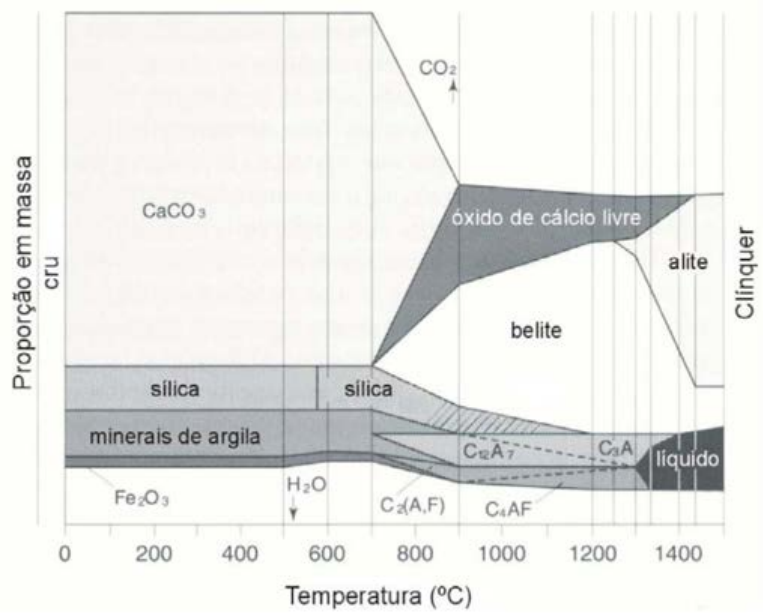


Figura 3 - Processo de cozedura do clínquer [consultada em (Simões, *et al*., 2012)]

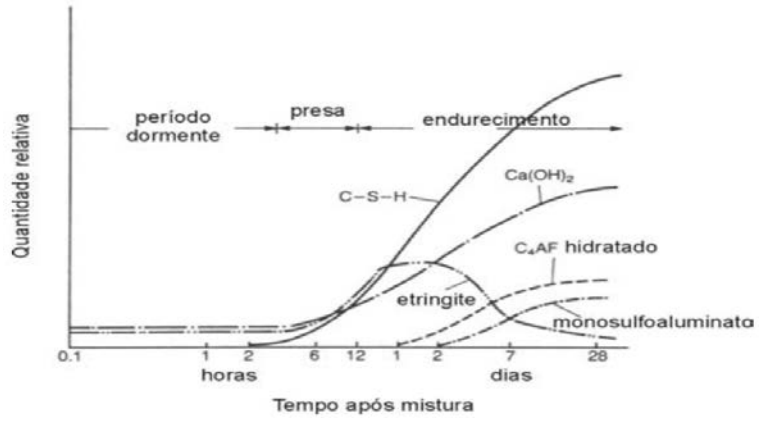


Figura 4 - Quantidade relativa de compostos formados durante a hidratação [consultada em (Simões, *et al.*, 2012)]

Uma das reações mais correntes que dá origem à formação de carbonato de cálcio é a carbonatação (Fig.5). Surge através da difusão de CO_2 na matriz que reage com os hidróxidos alcalinos presentes, tal como o CH reduzindo o pH. Este processo pode provocar, em casos extremos, a corrosão das armaduras, criando manchas, fissuras, destacamento do betão e, até mesmo perda de secção resistente e aderência das armaduras.

A portlandita [ou Hidróxido de Cálcio - $Ca(OH)_2$] é um dos primeiros compostos formados no processo de hidratação do cimento (Reação.1), aumentando o seu

teor até ao final do processo de hidratação (Fig. 4), isto é, a sua disponibilidade na matriz é mais que provada..

A matriz do betão, altamente alcalina, contém então hidróxido de cálcio (portlandita) em abundância que, em contacto com o dióxido de carbono (CO_2), reage e produz carbonato de cálcio ($CaCO_3$). Esta reação (Reação 2) já foi referida anteriormente e é conhecida como carbonatação.

$$Ca(OH)_2 + CO_2 \longrightarrow CaCO_3 + H_2O \quad \textbf{(2)}$$

Esta reação ocorre sempre que um betão está em contacto com o ar, ou seja, na sua camada superficial., Fig.5.

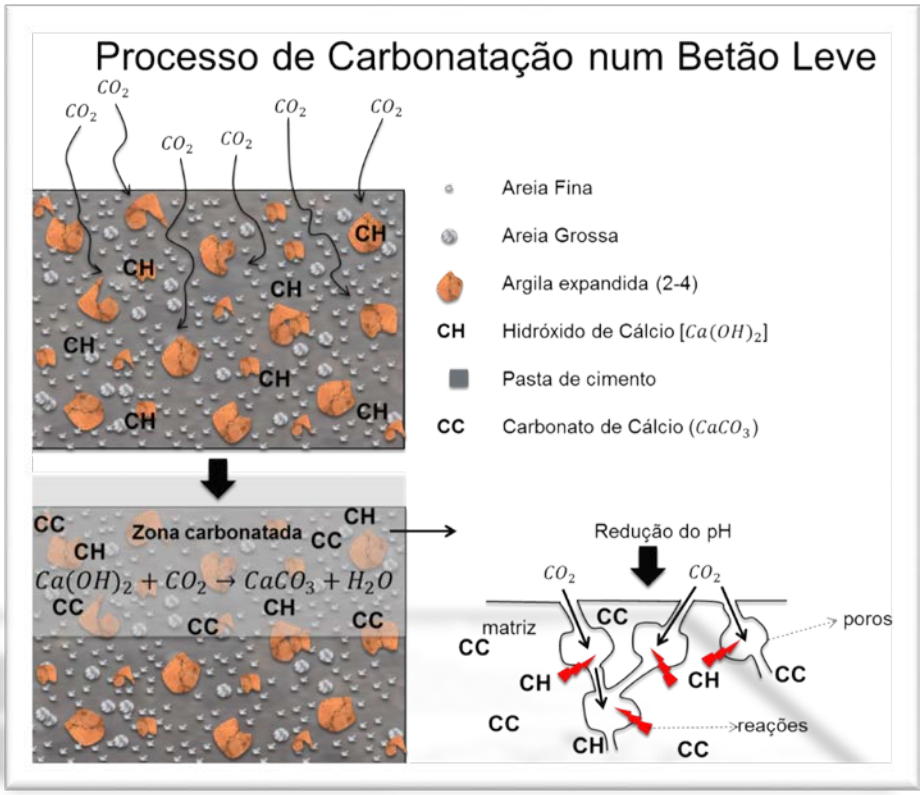


Figura 5 – Processo de carbonatação referido na Reação 1

Parte do hidróxido de cálcio necessário para formação de carbonato de cálcio que necessitamos provém também de várias reações das quais se destacam as duas mais importantes (Reação 3 e 4):

$C_3S+H \longrightarrow (C\text{-}S\text{-}H) + CH$ **(3)**

$C_2S + H_2O \longrightarrow (C\text{-}S\text{-}H) + CH$ **(4)**

Este composto formado pode em estado inicial de hidratação selar as primeiras microfissuras, mas não é completamente eficiente visto que, além da portlandita ser extremamente solúvel e migrar para fora da zona de fissuração, também está dependente da disponibilidade de CO_2. As amostras já carbonatadas serão menos propensas a que ocorra este processo de autorreparação, já que a disponibilidade de portlandita é menor (consumida no processo de carbonatação).

Em argamassas com as mesmas razões A/C (água/cimento), quanto maior for o conteúdo de cimento, menor será a velocidade de carbonatação. *Kloes* refere que as argamassas antigas têm maior teor de ligante que as atuais [(Kloes, 1924), consultado em (Lubelli, *et al*., 2011)] mas (Lubelli, *et al*., 2006) referem que esta pode ser uma explicação que contribui para a sua capacidade de autorreparação. Mas isto só será verdade se as argamassas antigas forem mais porosas do que as atuais e se a carbonatação for apenas superficial, visto que se a carbonatação atingir as armaduras pode provocar a sua perda de secção e a sua capacidade de resistência à tração.

A morfologia dos minerais formados pode variar consoante vários fatores, tais como o tipo de impurezas presente nas amostras, pois podem afetar a solubilidade dos cristais e/ou a retardar a sua velocidade de dissolução [(Boynton, 1980) consultado em (Lubelli, *et al*., 2011)].

Portanto, tanto em argamassas como em betões costumam estar presentes dois compostos cálcicos: portlandita ($Ca(OH)_2$) e carbonato de cálcio ($CaCO_3$), sendo o último encontrado normalmente em forma de calcite (estável), aragonite ou vaterite (estas duas últimas em menores quantidades e mais raras), Fig.6. A calcite é facilmente encontrada em idades jovens e a aragonite em argamassas com elevado estado de carbonatação (Lubelli, van Hees, Huinink, & Groot, 2006).

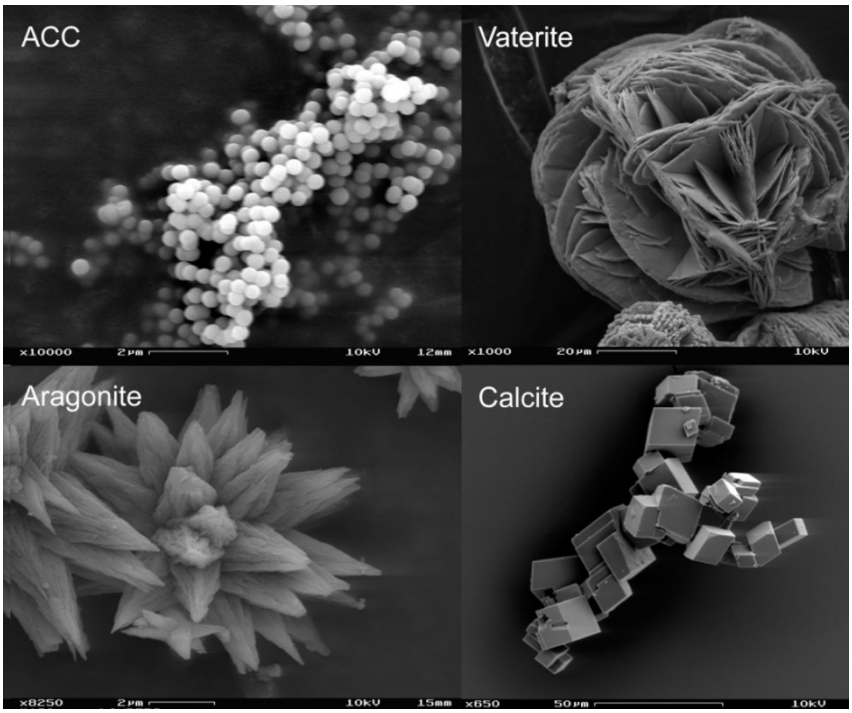


Figura 6 - Micrografia de morfologias típicas de calcite, aragonite, vaterite e carbonato de cálcio amorfo (ACC) (BOCHUM)

Outra forma de provocar a formação de carbonato de cálcio é através da introdução de bactérias, que é o nosso caso de estudo. A introdução da bactéria e de um meio percursor surge não só com o intuito de manter essa reação apenas na zona de fissuração, como também torna-la mais eficiente.

A produção de carbonato de cálcio por parte da bactéria acontece devido à conversão metabólica do lactato de cálcio (meio percursor mineral) por parte dos esporos bacterianos já germinados, segundo Reação 5:

$$Ca(C_3H_5O_2)_2 + 7O_2 \longrightarrow CaCO_3 + 5CO_2 + 5H_2O \quad \textbf{(5)}$$

Além de ser produzido carbonato de cálcio nesta reação, necessário para selar as fissuras, é produzido também dióxido de carbono que estará disponível para a formação de mais carbonato de cálcio em contacto com a portlandita, mantendo ambas as reações a ocorrerem na zona de fissuração e evitando a difusão de portlandita fora da zona de fissuração, Fig.7.

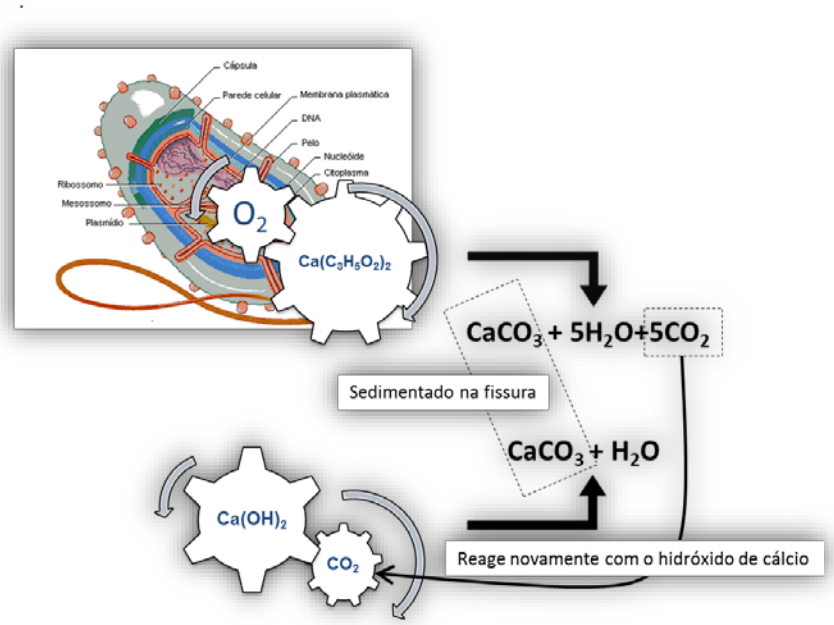


Figura 7 - Mecanismo de formação de carbonato de cálcio a partir da conversão metabólica do lactato de cálcio por parte da *Bacillus cohnii* e da carbonatação do betão

Estas reações químicas irão complementar-se maximizando a eficiência do processo. O processo de formação de carbonato de cálcio por parte de bactérias e meio percursor mineral neste projeto é sintetizado na Fig. 8.

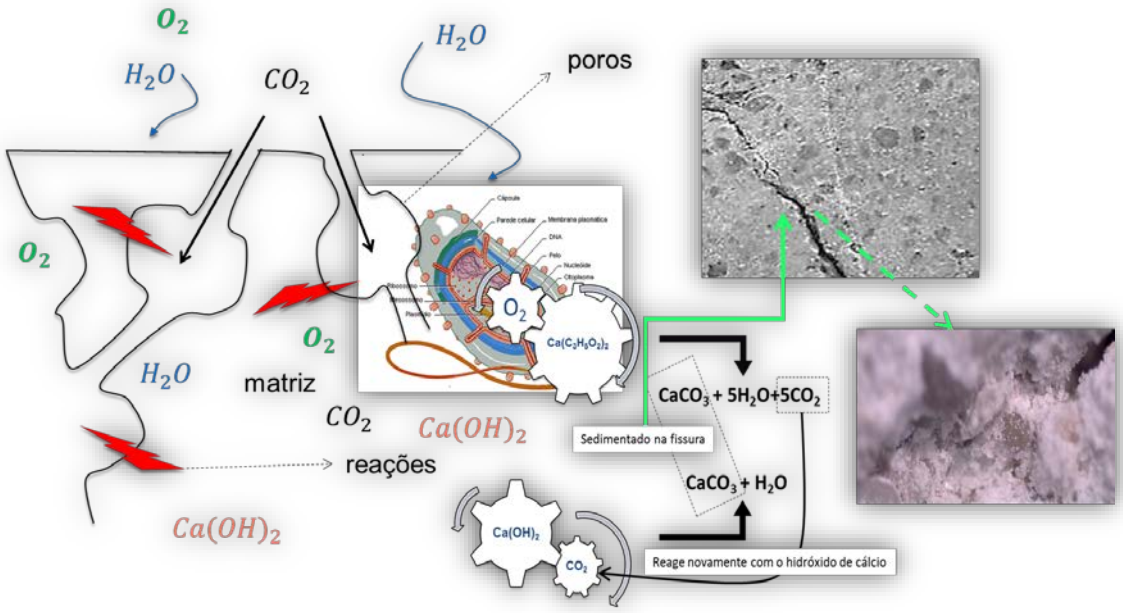


Figura 8 – Formação de bio mineral Carbonato de Cálcio.

4. MATERIAIS

De acordo com a pesquisa bibliográfica foi selecionado um conjunto de materiais para a realização da parte experimental desta dissertação.

- **Cimento**

O cimento utilizado nesta dissertação foi um CEM I 42,5R por ser um cimento sem adições, constituído por clínquer (≥ 95%) e outros constituintes minoritários (≤ 5%). A Análise química, Resistência mecânica e os Ensaios físicos do CEM I 42,5R foram fornecidas pelo fabricante e estão indicadas nas Tabelas 1-3.

Tabela 1 - Análise química do CEM I 42,5R

Propriedades	**Método de Ensaio**	**Valor especificado**
Perda ao fogo	**NP EN 196-2**	**≤ 5%**
Resíduo insolúvel	NP EN 196-2	≤ 5%
Teor de sulfatos (em SO_3)	**NP EN 196-2**	**≤ 4%**
Teor de cloretos	NP EN 196-21	≤ 0,10%

Tabela 2 - Resistência mecânica do CEM I 42,5R

Resistência à compressão (MPa)			
Resistência aos primeiros dias		**Resistência de referência**	**NP EN 196-1**
2 Dias	7 Dias	28 Dias	
≤ 20	**----**	**≤ 42,5 e ≤ 62,5**	

Tabela 3 - Ensaios físicos do CEM I 42,5R

Propriedades	**Método de ensaio**	**Valor especificado**
Princípio de presa	**NP EN 196-3**	**≥ 60min**
Expansibilidade	NP EN 196-3	≤ 10mm

- **Agregados**

Os agregados utilizados nesta dissertação foram agregados de densidade normal (areia fina e areia grossa) e de baixa densidade (argila expandida).

A areia fina é do tipo rolado, basicamente composta por sílica com origem em C.V./Maça e massa volúmica de 2620 kg/m^3. As percentagens de absorção de água e teor de humidade são de 0,8% (cedido pelo fornecedor) e 1,32% (calculado em laboratório), respetivamente.

A areia grossa também é do tipo rolado, basicamente composta por sílica com origem em Foros do Benfica e massa volúmica de 2620 kg/m^3. As percentagens de absorção de água e de humidade são de 0,8% (cedido pelo fornecedor) e 1,90% (calculado em laboratório), respetivamente.

A argila expandida utilizada apresenta um formato esférico com baixa forma angular, como indicado na Fig. 9. A massa volúmica aparente é de 358 kg/m^3. As percentagens de absorção de água e de humidade são de 26,50% (cedido pelo fornecedor) e 8,00% (calculado em laboratório), respetivamente, antes da realização das amassaduras.

Figura 9 – Argila expandida

As curvas granulométricas dos três agregados estão indicadas na Fig. 10.

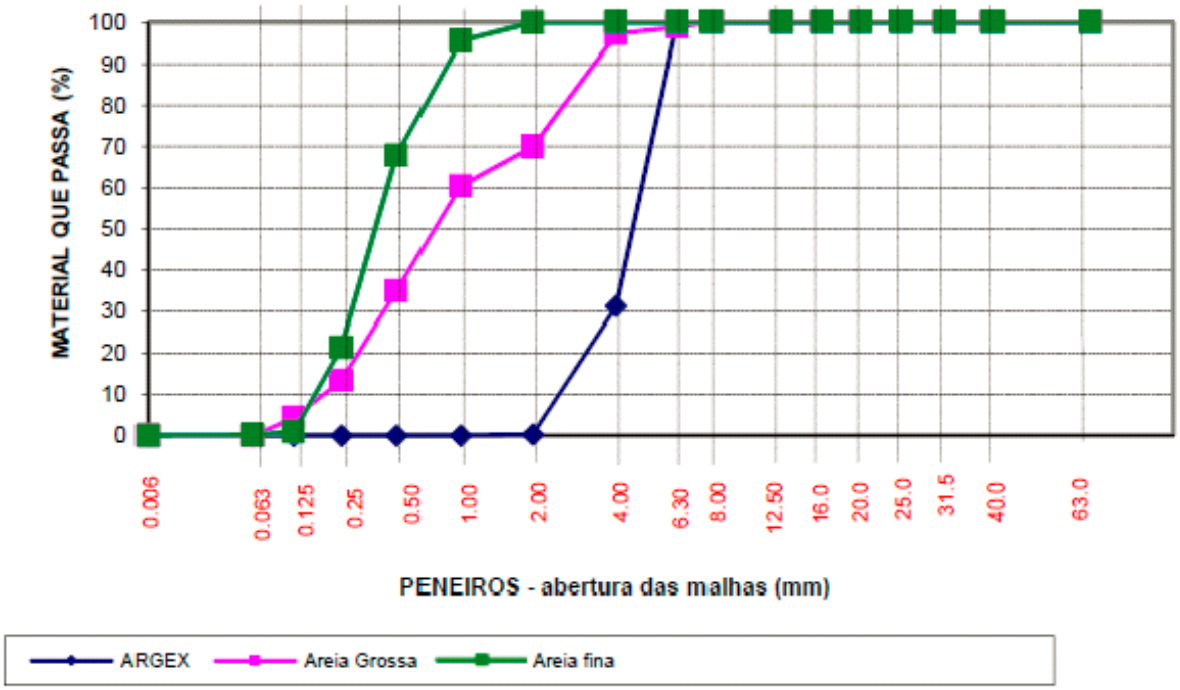


Figura 10 – Curvas granulométricas dos agregados

As percentagens de absorção, massa volúmica e granulometrias das areias foram fornecidas pela Britobetão, sendo os restantes dados determinados no Laboratório de Engenharia Civil da Universidade de Évora e Laboratório de Geociências da Universidade de Évora.

As características químicas, mecânicas e físicas da argila foram fornecidas pelo fabricante e estão indicadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Características químicas, mecânicas e físicas da argila expandida

Requisito	Valor declarado Argex® 2-4	Unidades	Procedimento de ensaio
Forma das partículas	Aproximadamente redondas		
Tamanho das partículas	4,0/8,0	d/D mm	EN 933-1
Densidade aparente seca	358	kg/m^3 (±15%)	EN 1097-3
% de partículas esmagadas	N/A	% massa (±15%)	EN 933-5
Resistência ao esmagamento	4,7	MPa (±10%)	EN 13055-1
Sais de cloreto solúveis em água	<0,004	$\%Cl^-$	EN 1744-1
Sulfatos solúveis em ácido	<0,05	$\%SO_3$	EN 1744-1
Enxofre total	<0,04	%S	EN 1744-1
Limpeza	Mais claro que a solução padrão		EN 1744-1
Absorção de água	26,5	%massa (±10%)	EN 1097-6:2000
Resistência à desintegração	N/A	%massa	EN 13055-1
Resistência ao gelo e degelo	N/A	%massa	EN 13055-1
Condutividade térmica	0,13	W/mºC	EN 12667
Resistência ao fogo	A1		96/60/EC

- **Água**

A água utilizada para o fabrico dos betões foi proveniente da rede de abastecimento público do Pólo da Mitra da Universidade de Évora, estando em conformidade com a NP EN 1008:2003.

A água utilizada na preparação dos meios de cultura foi água destilada à exceção da utilizada na lavagem dos esporos antes da sua introdução no betão, com o objetivo de os tornar mais resistentes.

- **Bactéria**

A bactéria utilizada foi a *Bacillus cohnii*, da coleção alemã DSMZ 6307, cujas principais características são: alcalifílica obrigatória, aeróbia, formadora de esporos ovais, ornitina e ácido aspártico em vez de ácido diaminopimélico na parede celular (Spanka, *et al.*, 1993).

A bactéria foi adquirida na forma liofilizada, Fig. 11.

Figura 11 – Bactéria liofilizada

O ser alcalifílica ajuda-a a sobreviver na matriz do betão (altamente alcalina pH=13). O ser aeróbia ajuda-a a viver na presença do oxigénio que se encontra na matriz do betão e foi escolhida principalmente por ter estas características de adaptabilidade.

Por ser uma bactéria com características bastante específicas não cresce facilmente no meio de cultura normalmente usado em outros tipos de *Bacillus*, o Agar nutritivo (Spanka, *et al.*, 1993).

Bacillus cohnii (DSMZ 6307) é uma bactéria Gram-positiva. A sua cultura é "*overnight*". A largura das células vegetativas varia entre os 0,6 e 0,7 μm. A sua temperatura mínima de crescimento é de 10ºC e máxima de 47ºC. A temperatura ideal de crescimento é de 30ºC. Após a inoculação a 45ºC durante 2 dias, as suas colónias apresentam uma dimensão entre 1 a 2 mm. São catalase e oxidase positivas (Spanka, *et al.*, 1993). A catalase é uma enzima intracelular que decompõe o peróxido de hidrogénio segundo a seguinte reação: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$, pertencendo a subclasse das enzimas oxedorredutases que usam o peróxido como aceitador de eletrões e também como dador eletrónico (é portanto uma peroxidase) (Spanka, *et al*., 1993). A oxidase é uma enzima que catalisa uma reação de oxidação/redução envolvendo oxigénio molecular como aceitador de eletrões, sendo este reduzido a água (H_2O) ou a peróxido de hidrogénio (H_2O_2). O seu pH ideal de crescimento é 9,7.

As colónias bacterianas apresentam uma coloração creme/branco no meio alcalino (Fig. 12).

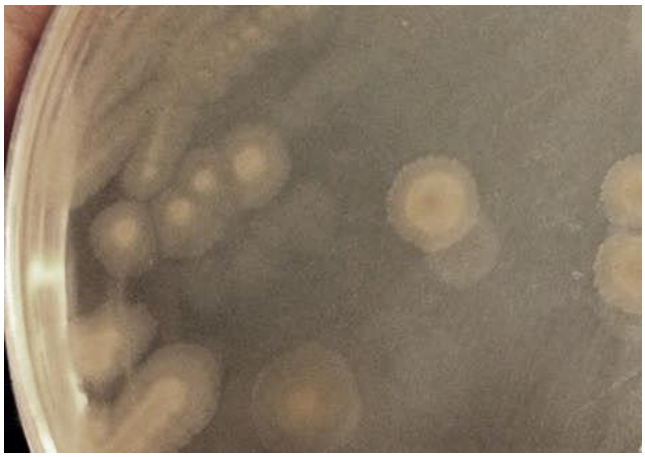


Figura 12 - Cultura de *Bacillus cohnii* em placa de Petri

- **Lactato de Cálcio e Extrato de levedura**

O lactato de cálcio ($C_6H_{10}CaO_6$) é um sal de ácido láctico que se neutraliza com carbonato de cálcio. É apresentado normalmente em pó branco solúvel em água e etanol. A sua solubilidade na água é de 66g/L a 20ºC. O lactato de cálcio utilizado nesta dissertação foi o penta hidratado com 308,30 g/mol da BioChemica®. O Extrato de levedura utilizado juntamente com o lactato de cálcio para criar o meio precursor mineral tem como objetivo ser alimento bacteriano.

5. MÉTODOS

Uma vez selecionados os materiais foram definidos e acertados os procedimentos e técnicas a adotar para a realização do trabalho experimental.

A introdução da bactéria neste betão teve como objetivo a produção de carbonato de cálcio bio mineral por forma a otimizar a selagem das microfissuras que surgem em idades iniciais no betão.

A metodologia adotada nesta dissertação consistiu na preparação dos meios de cultura e meio precursor mineral para a bactéria, preparação das composições para os betões onde foi incorporada a bactéria e meio precursor, indução de fissuras no betão já endurecido, forma de cura dos provetes e realização de ensaios experimentais, Fig. 13. A seguir é apresentada a descrição detalhada de todos os trabalhos realizados.

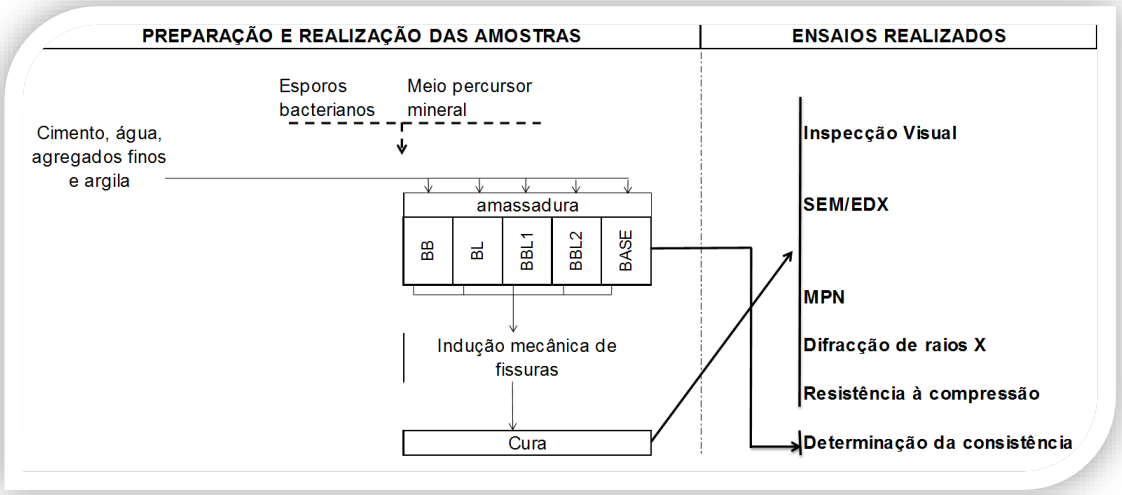


Figura 13 – Metodologia de trabalho

5.1. Elaboração dos meios de cultura

Os meios de culturas são formulações complexas adequadas e adaptados ao tipo de bactéria, para permitir o crescimento bacteriano em laboratório. Quanto ao estado físico podem ser líquidos, sólidos ou semissólidos. Neste caso mais específico utilizamos o meio sólido com agar para fazer culturas puras da

bactéria liofilizada e após o crescimento bacteriano foi feita cultura em meio líquido. O objetivo da elaboração dos meios de cultura é fazer crescer a bactéria em perfeitas condições vegetativas sendo neste caso específico um meio de cultura seletivo, pois a bactéria é alcalifílica.

Todos estes meios de cultura foram consultados no *site* da DSMZ (http://www.dsmz.de/) e confirmados em artigo científicos da especialidade e realizados no laboratório de Microbiologia do Solo do ICAAM.

- **Meio de cultura Alcalino**

Preparação do meio de cultura bacteriano (*Agar nutritivo* – Meio 1):

O agar nutritivo é utilizado para fazer crescer as bactérias de forma aeróbia.

Tabela 5 – Agar Nutritivo – Meio 1

Reagente	Quantidade
Peptona bacteriológica (Cultimed® Panreac)	5 g
Extrato de carne (Himedia®)	3 g
Agar (VWR® Prolabo®)	7,5 g
Água destilada	1000 mL

Foi pesada a peptona e o extrato de carne e foram misturados em água destilada até à sua diluição completa, num *gobelet* de 2000 mL. Foi acertado o pH em 7. A 500 mL desta solução juntámos agar para usar como meio de cultura sólido que se dissolveu por fervura. Os outros 500 mL foram utilizados para meio de cultura líquido. Foi ao autoclave (Fig. 14) durante 21 minutos a 120ºC para eliminar qualquer contaminação bacteriana. O agar nutritivo após o autoclave ficou como indicado na Fig. 15.

Figura 14 – Autoclave (Modelo: Uniclave 88)

Figura 15 - Agar nutritivo após autoclave.

Preparação do meio sesquicarbonato de sódio

O meio sesquicarbonato de sódio (Tabela 6) é utilizado para juntar ao Agar nutritivo para o tornar alcalino já que as bactérias utilizadas são extremamente seletivas quanto ao meio de crescimento (Spanka, *et al.*, 1993) e crescerem colónias muito frágeis e de forma lenta apenas no Agar nutritivo (testado em laboratório).

Tabela 6 – Sesquicarbonato de sódio

Reagente	Quantidade
$NaHCO_3$ (Bicarbonato de sódio – Prolabo®)	4,2 g
Na_2CO_3 anidro (Carbonato de sódio anidro – Merck®)	5,3 g
Água destilada	100 mL

Inicialmente foram misturados os 2 reagentes por forma a não precipitar a solução final. Foi ao autoclave durante 21 minutos a 120ºC. Posteriormente foram misturadas as duas soluções como meio de cultura, na proporção 1 mL do meio sesquicarbonato de sódio para 10 mL do agar nutritivo, formando o meio de cultura alcalino.

- **Meio de esporulação**

A esporulação é um processo que acontece às células vegetativas de alguns tipos de bactérias quando estas são expostas a condições que ameaçam a sua sobrevivência, isto é, quando não existem condições para que estas cresçam e se reproduzam. Quando esporuladas, existem bactérias do género *Bacillus* que sobrevivem durante cerca de 200 anos (Schlegel, 1993). Assim que são reunidas novamente as condições para elas se manterem ativas, os esporos germinam e dão origem a células vegetativas. A preparação deste meio (Tabela 7) prende-se então com a necessidade de estimular as células vegetativas de *Bacillus cohnii* para esporularem para mais facilmente se adaptarem às condições alcalinas da matriz do betão.

Tabela 7 – Meio de esporulação

Reagente	Quantidade
NH_4Cl (cloreto de amónio – Merck®)	0,2 g
KH_2PO_4 (Dihidrogenofosfato de potássio – J.T.Baker®)	0,02 g
$CaCl_2$ (Cloreto de cálcio – Merck®)	0,225 g
KCl (Cloreto de potássio – Merck®)	0,2 g
$MgCl_2 . 6H_2O$ (Cloreto de magnésio hexa-hidratado – Prolabo®)	0,2 g
$MnSO_4 . 2H_2O$ (Sulfato de manganês di-hidratado – Merck®)	0,01 g
SL12-B	1mL
Extrato de levedura (Cultimed®)	0,1 g
Citrato trissódico (Riedel-de Haën®)	5,16 g
$NaHCO_3$ (Bicarbonato de sódio – Prolabo®)	4,2 g
Na_2CO_3 (Carbonato de sódio – Merck®)	5,3 g
Água destilada	1000 mL

Foram pesados todos os reagentes. Inicialmente foram dissolvidos apenas o $NaHCO_3$, Na_2CO_3 e Citrato trissódico em 200 mL de água destilada para evitar precipitar a solução. Foi ao autoclave 20 minutos a 121ºC. Posteriormente foram dissolvidos os restantes reagentes, com exceção do SL12-B em 800 mL de água destilada. A solução foi ao autoclave 20 minutos a 121ºC.

Foram pesados todos os reagentes. Inicialmente foi diluído o EDTA – $Na_2 . 2H_2O$ e posteriormente adicionados todos os outros em um *gobelet* contendo 500 mL de água destilada. Acertou-se o pH em 6. Foi ao autoclave durante 21 minutos a 120ºC.

Por final, foi adicionado 1 mL deste meio a 1000 mL do meio de esporulação.

Preparação da solução SL12 B

A solução SL12 B (Tabela 8) é utilizada no meio de esporulação.

Tabela 8 – Solução SL12 B

Reagente	Quantidade
EDTA – Na_2 . $2H_2O$ (Merck®)	1,5 g
$FeSO_4$. $7H_2O$ (Merck®)	0,55 g
H_3BO_3 (Merck®)	0,15 g
$CoCl_2$. $6H_2O$ (Merck®)	0,095 g
$MnCl_2$. $4H_2O$ (Merck®)	0,025 g
$ZnCl_2$ (VWR® Prolabo®)	0,021 g
$NiCl_2$. $6H_2O$ (AMRESCO®)	0,012 g
$NaMoO_4$. $2H_2O$ (Merck®)	0,009 g
$CuCl_2$. $2H_2O$ (Merck®)	0,001 g
Água destilada	500 mL

- **Precursor Mineral**

A bactéria selecionada é não ureolítica (Spanka, *et al*., 1993) portanto, a produção de carbonato de cálcio surge da metabolização do lactato de cálcio por parte das células vegetativas. A introdução do meio precursor mineral juntamente com os esporos bacterianos é então necessário para aumentar a eficiência da produção de carbonato visto que da metabolização do lactato em carbonato é libertado dióxido de carbono, ficando este disponível para reagir com a portlandita produzindo mais carbonato de cálcio.

O meio precursor mineral (Fig. 16) selecionado foi o lactato de cálcio, visto que em estudos anteriores, a peptona (outro meio precursor mineral utilizado pelos mesmos autores) prejudica drasticamente a resistência à compressão do betão (Jonkers, *et al*., 2008) e era um dos meios utilizados com esta estirpe bacteriana.

Existiam ainda outros meios utilizados neste tipo de experiências mas a fácil aquisição do lactato de cálcio também foi um fator importante na sua escolha.

As concentrações introduzidas foram de 80 g de lactato de cálcio e 1 g de extrato de levedura, que servirá de alimento bacteriano, para 1 L de água da torneira (Wiktor, *et al.*, 2011). A sua diluição foi feita num agitador magnético, e não existiram problemas de precipitação nesta fase.

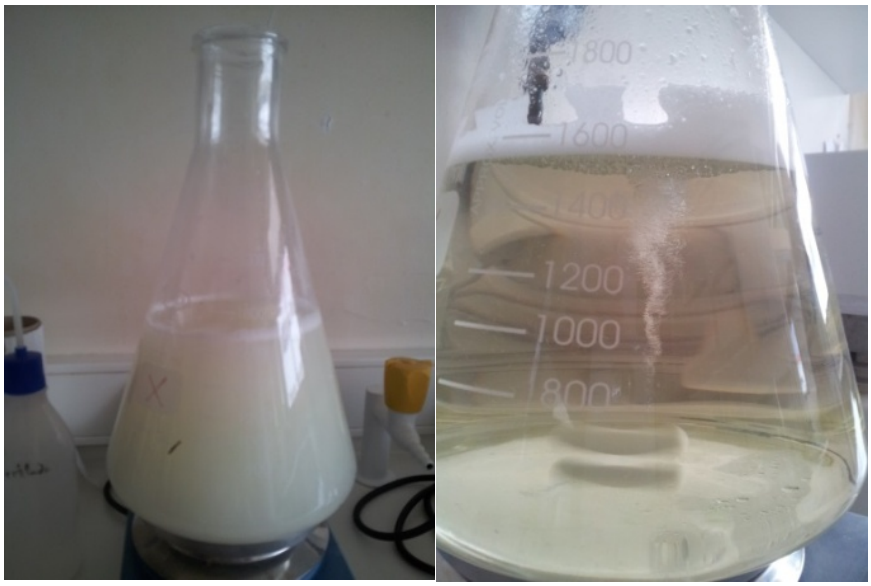


Figura 16 – Identificação do meio precursor mineral

Foi utilizada a água da torneira para fazer esta solução porque é a mesma que vai ser utilizada para fazer betão, por isso tentando manter sempre as mesmas características do betão ordinário, reduzindo os custos de purificação da água e reduzindo a complexidade da execução.

Dependendo do tipo de amostras será introduzido diretamente na matriz do betão ou introduzido por imersão em argila expandida.

O objetivo da introdução da argila expandida no betão foi o de facilitar a introdução do meio de cultura com esporos bacterianos e o meio precursor mineral, visto apresentar uma porosidade elevada (comparada com outros agregados), podendo facilmente absorver os elementos referidos. Em estudos anteriores (Jonkers, *et al., 2008)* foi referido que possivelmente as fissuras deixavam de selar a partir dos 100 dias devido à redução da porosidade do betão, fazendo coincidir o diâmetro dos poros da matriz cimentícia com o

diâmetro dos esporos bacterianos (cerca de 1µm), acabando por rebentá-los. A porosidade que Argex® (2-4) apresenta é superior à que foi utilizada no caso de estudo (Jonkers, *et al.*, 2008) e como tal poderá vir a obter melhores resultados, já que conseguirá absorver uma maior quantidade não só de esporos bacterianos como de meio precursor mineral também (para a mesma quantidade de agregado)

Inicialmente ainda foi pensado introduzir agregado leve de cortiça em substituição da argila, mas rapidamente se desistiu da ideia já que, apesar de ser um material biológico e sustentável (resultante de resíduos da industria da transformação da cortiça) contêm ceroides (Simões, *et al.*, 2012) na parede celular que poderia vir a impossibilitar a absorção dos meios utilizados no estudo e que permitem que este material orgânico tenha um tempo de vida tão prolongado.

5.2. Execução do betão

As culturas foram feitas a partir da inoculação da bactéria *Bacillus cohnii* em glicerol a -80 °C (Fig. 17). As amassaduras foram realizadas no laboratório de Engenharia Civil da Universidade de Évora.

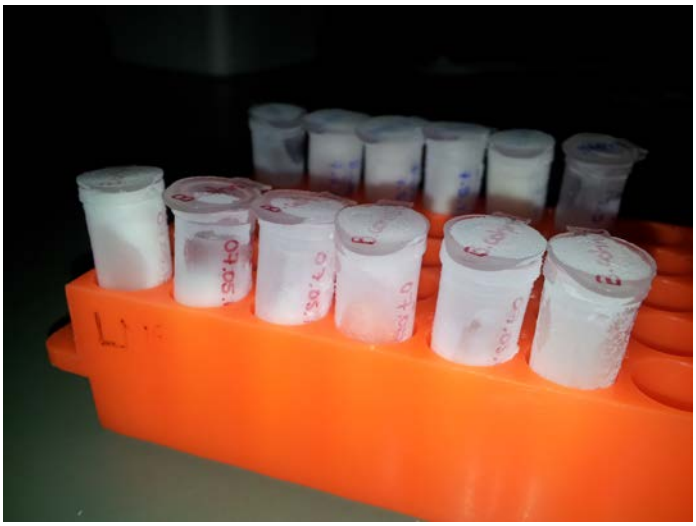


Figura 17 – *Bacillus cohnii* em glicerol a -80ºC

É feita a cultura bacteriana com o meio alcalino sólido (sempre em câmara de fluxo vertical e bico de *busen* para evitar contaminação das placas) e após uma cultura "*overnight*" é transferida para meio alcalino líquido para se dar um maior crescimento de células vegetativas. A diluição utilizada foi de 10 mL de Agar nutritivo para 1 mL de Sesquicarbonato de sódio.

Para verificar a quantidade de células vegetativas em suspensão foi feita uma análise espetrofotométrica da densidade ótica (D.O.) da cultura bacteriana (Fig. 18). O comprimento de onda utilizado foi de 600 nm. Verificámos que a cultura entrava em senescência após 24 h, isto é, deixava de haver crescimento bacteriano. O tempo ótimo para utilização das células vegetativas seria então 24 h após a inoculação da bactéria. A partir daí as células vegetativas começariam a morrer e as que iam sobrevivendo encontravam-se mais frágeis, daí a necessidade de as esporular logo após 24 h em meio líquido.

Figura 18 – Absorvância (D.O.) da cultura bacteriana medida após 16h de cultura líquida, em espetrofotómetro.

Verificou-se que a solução ótima era iniciar este processo 3 dias antes da execução das amassaduras de betão.

Foi induzida a esporulação das células vegetativas através do meio de esporulação líquido rico em manganês (Jonkers, *et al.*, 2010) e feita a primeira contagem através de microscópio eletrónico com auxílio de uma placa de contagem (Fig. 19) homologada.

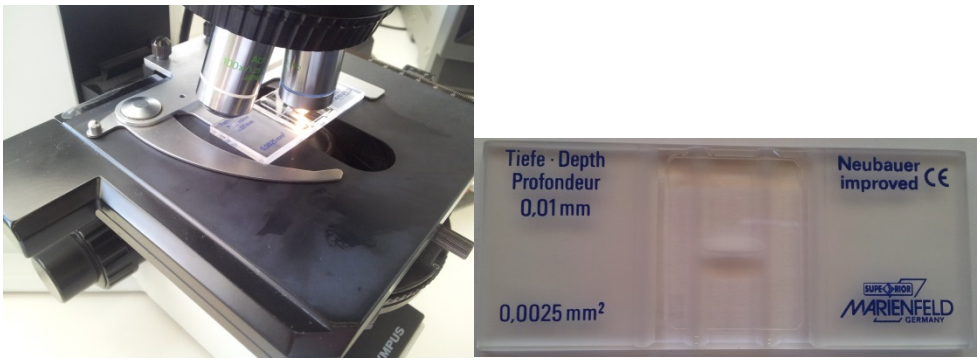


Figura 19 – Contagem dos esporos no microscópio ótico usando lente de imersão e respetiva placa de contagem.

Foram contabilizados todos os esporos bacterianos dentro dos 16 quadrados pequenos (Fig. 20), em cerca de 4 quadrados maiores. É feita a média destes quadrados maiores. Após essa contagem é aplicada a seguinte fórmula (Eq. 1) de cálculo.

$$número\ de\ células\ médio = nº médio\ de\ células\ nos\ quadrados \times 2{,}5 \times 10^6 [esporos/cm^3] \quad \textbf{(1)}$$

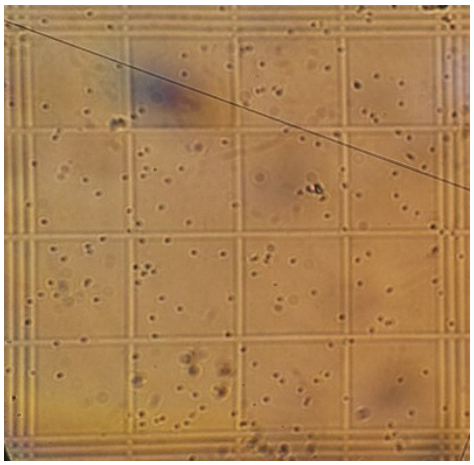


Figura 20 – Esporos visualizados no Microscópio Ótico

A concentração conseguida foi de $3,5x10^8$ esporos/mL de solução.

Verificou-se se a concentração obtida em laboratório era ótima para introduzir na amassadura após uma diluição, então procedeu-se à lavagem da cultura, por centrifugação repetida a 7000 rpm para eliminar as células vegetativas e facilitar a sedimentação dos esporos bacterianos (Fig. 21).

Figura 21 - Lavagem do meio de esporulação

Foi feita a diluição destes esporos em 0,5 L de água da torneira para ser facilmente transportável para o Laboratório de Engenharia Civil da Universidade de Évora, e no mesmo continuou-se a sua diluição adicionando mais 9,5 L de água da torneira sendo agora a concentração dos esporos na ordem dos $1,75x10^7$ esporos/mL de solução.

A introdução dos esporos no betão foi feita através da impregnação da argila com a solução. As partículas de argila ficam completamente saturadas após 24 h de impregnação em água (Fenyvesi, 2010). Como este artigo abordava outras marcas de argila expandida, testámos em laboratório esta hipótese, desidratando argila por completo em estufa ventilada e seguidamente hidratando-a 24 h em água. Foi feita a sua pesagem, e posteriormente foi hidratada novamente por períodos de 2h e foi pesada a amostra até não existir variação de peso. Verificou-se que a hipótese de impregnação durante 24h era válida e por isso foi a utilizada nesta dissertação.

Tabela 9- Concentrações de esporos introduzidas nas amassaduras de betão

Concentração de esporos	**BBL1**	**BBL2**
Solução	$1,75x10^7$ esporos/mL solução	
Provetes de betão	**$9,10x10^5$ esporos/cm^3 betão**	**$4,55x10^5$ esporos/cm^3 betão**	**$9,10x10^5$ esporos/cm^3 betão**

Na tabela 9 referenciamos a concentração de esporos presentes na solução produzida em laboratório e a concentração que cada amostra contém por cada cm^3 de betão. Existem variações destas concentrações visto que na amostra BB foi introduzida na amassadura o equivalente ao que o peso que a argila introduzida conseguiria absorver, tal como em BBL2, já que a totalidade da argila desta segunda amostra foi impregnada com esta solução também. No caso de BBL1 a concentração de esporos bacterianos dispersos na amostra vê-se reduzida para metade, já que apenas metade da argila introduzida na amassadura os continha. Foi a forma mais coerente achada para manter a solução de esporos bacterianos sempre a mesma, por forma a não existirem variações nas condições de crescimento das bactérias alterando a sua capacidade de sobrevivência nas amostras.

5.2.1. Composição do betão

Para a composição do betão ficou estabelecido inicialmente que devia ter uma razão A/C de 0,5. De maneira a afinar a composição com os materiais previamente selecionados, foram efetuadas numa primeira fase um conjunto de amassaduras experimentais, que garantiram homogeneidade da amassadura (ótima distribuição da argila) e uma classe de abaixamento entre S2 e S3 características essas que nos permitiram selecionar a composição indicada na Tabela 10.

Tabela 10 – Composição do betão

	Dosagem (kg)
Cimento CEM I	258
Água	**129**
Areia fina (0-1)	523
Areia grossa (1-4)	**101**
Argila expandida (2-4)	196

Para a composição foram consideradas as seguintes 5 situações a estudar:

- **Betão de base (Base)** – esta é a composição de referência, a qual não contém qualquer adição de componentes biológicos ou químicos. Vai servir de comparação com as outras amostras;
  Betão de base H (Base H) – esta é a composição Base como processo de cura húmida padronizada.
- **Betão bactéria (BB)** – é igual à composição Base mas com a introdução de esporos bacterianos na água da amassadura. Esta amassadura servirá para avaliar se a bactéria vai ser capaz de fechar as fendas e sobreviver não só à matriz alcalina do betão, mas também à redução de porosidade da matriz durante o processo de cura. Também se avaliará se consegue produzir carbonato de cálcio sem o meio precursor, assim como, se ocorre alguma variação da resistência à compressão com a presença de esporos bacterianos na água de amassadura;
- **Betão lactato (BL)** - é igual à composição Base mas com a introdução de lactato de cálcio na água da amassadura. Esta amassadura servirá para verificar se as características mecânicas do betão são alteradas. Também vão servir para verificar se o meio precursor reage isoladamente na produção de carbonato de cálcio;

- **Betão bactéria lactato 1 (BBL1)** - é igual à composição Base mas com a introdução de esporos bacterianos em metade das argilas (previamente feito por absorção) e lactato de cálcio na outra metade das argilas (previamente feito por absorção). Esta composição servirá para verificar se apesar destes elementos de encontrarem separados conseguem reagir com a água e produzir carbonato de cálcio. Também será analisada a eficiência e rapidez de selagem das fissuras;
- **Betão bactéria lactato 2 (BBL2)** - é igual à composição Base mas com toda a argila impregnada de lactato de cálcio e posteriormente impregnada também, após secagem em estufa, com esporos bacterianos, para nos permitir testar se estes elementos apenas reagem quando estão juntos no mesmo agregado. Neste caso, não puderam ser embebidas ao mesmo tempo porque iria ocorrer a reação que daria origem à formação do carbonato de cálcio.

Serão também analisadas 3 amostras de betão BASE, previamente fissuradas diferindo apenas na água de cura: uma será imersa em água com meio precursor, outra imersa numa solução contendo esporos bacterianos e por fim uma imersa numa solução de esporos bacterianos com meio precursor. O objetivo destes 3 provetes será o de tentar perceber se existe eficiência na selagem das fissuras por este processo biológico em estruturas já existentes e a possibilidade deste se dar de forma externa à matriz cimentícia. Este ensaio será identificado por alteração dos padrões de cura e as 3 amostras por BaseL (Betão base com água de cura substituída por meio precursor mineral), BaseB (Betão BASE com água de cura substituída por meio contendo esporos bacterianos) e BaseLB (Betão BASE com água de cura substituída por meio precursor mineral e meios contendo esporos bacterianos, na mesma proporção introduzida em BBL2).

A seleção destas 5situações de estudo teve em conta ser possível comparar parâmetros de resistência e a influência da bactéria e do meio precursor mineral no betão. Decidimos criar o BBL1 e o BBL2 com o intuito de compreendermos se a ação conjunto dos esporos bacterianos com o meio precursor mineral é mais eficiente que separados.

Toda a informação relacionada com o fabrico das amassaduras está indicada ao detalhe, no Anexo E.

Para todas as composições foram determinadas as consistências pelo cone de *Abrams* de acordo com a norma NP EN 12350-2:2009, (Fig. 22).

Figura 22 – Processo de amassadura

As amassaduras foram executadas pela seguinte ordem: BB, BBL2, BBL1, BL e BASE. Esta sequência foi escolhida para manter a coerência dos resultados, isto é, todas as amostras que continham esporos bacterianos foram feitas com a mesma cultura, obrigando a manter não só a mesma concentração de esporos em todas as amostras, mas também para manter as mesmas características da própria cultura bacteriana.

No caso das amostras de BBL1 a secagem da argila foi feita numa única vez, tendo sido separada em 2 recipientes onde continha meio precursor e meio de cultura, separados. As amostras foram remexidas durante as 24 h (Bogas, *et al.*, 2012) de absorção para garantir a impregnação da totalidade da água.

No caso da amostra BBL2, como o meio precursor é introduzido nos mesmos agregados de argila que os esporos bacterianos, as amostras foram novamente secas e pesadas, tendo sido verificado um aumento de peso na ordem das 200

g, confirmando a absorção do meio precursor. Após a segunda secagem, a argila foi colocada em baldes para absorção do meio de cultura de esporos bacterianos e remexida durante 24 h (Bogas, *et al.*, 2012), para garantir a absorção do meio. Só após este processo foi feita a amassadura.

Para todas as amostras BBL1 e BBL2 a argila foi completamente desidratada em estufa ventilada durante 5 dias a 37 °C (Bogas, *et al.*, 2012), com objetivo de absorver completamente os respetivos meios, pois estes foram introduzidos por impregnação. Nas restantes amostras BL, BB e Base, foi considerado o teor de humidade deste agregado e corrigida a água de amassadura.

Figura 23 – Introdução de esporos bacterianos na água de amassadura (BB)

Para garantir as mesmas concentrações em todas as amostras, foi introduzido o equivalente ao que a argila conseguiria absorver estando completamente seco.

Após a execução de cada uma das amassaduras, cada um dos betões foi moldado em cubos prismáticos de 15 cm de aresta, Fig. 24.

Figura 24 – Moldes cúbicos (15x15x15 cm)

A moldagem ocorreu em duas fases, primeiro encheu-se metade da altura do provete e vibrou-se, depois a outra metade e voltou-se a vibrar. A vibração foi efetuada por meio de 25 pequenas pancadas. Em amassaduras experimentais anteriores verificou-se que por esta via permitia obter melhores resultados na distribuição dos componentes, evitando assim a segregação dos seus componentes, Fig. 25. Após a vibração os provetes os mesmos foram imediatamente selados com película aderente para evitar a evaporação da água nas seguintes 24 h, antes da descofragem, Fig. 26.

Figura 25 – Homogeneidade da distribuição dos agregados nas amostras

Após a descofragem de cada uma das composições (24 h depois da data de fabrico), todos os moldes foram devidamente desinfetados para evitar contaminação de bactérias nos vários tipos de amassaduras. O mesmo também foi feito para a betoneira, baldes e restantes utensílios.

Figura 26 – Provetes selados com película durante 24 h

A seleção do modelo de cura dos provetes foi extremamente importante nesta dissertação visto que se quiseram estudar vários aspetos e comparar os mesmos, como se verá mais à frente.

(Wiktor, *et al.*, 2011) utilizam um modelo onde as amostras são imersas até meia altura em água. Não se achou que este modelo iria representar o que ocorre na realidade, já que só em situações pontuais existe a presença de água constante nas estruturas. Este modelo tem sempre disponível água, oxigénio e dióxido de carbono o que irá acelerar a produção de carbonato de cálcio devido à carbonatação e também devido à bactéria. Nesta dissertação foi considerado que o processo de cura deveria ser diferente, simulando o que poderia acontecer quando uma estrutura está sujeita às ações atmosféricas, ou seja, a mesma estaria sujeita a período húmidos e períodos secos. Após a descofragem alguns dos provetes estariam 6 dias em cura seca (Fig. 27) e 1 dia em cura húmida (Fig. 28). Este processo foi repetido continuamente e será chamado: processo de cura adaptado.

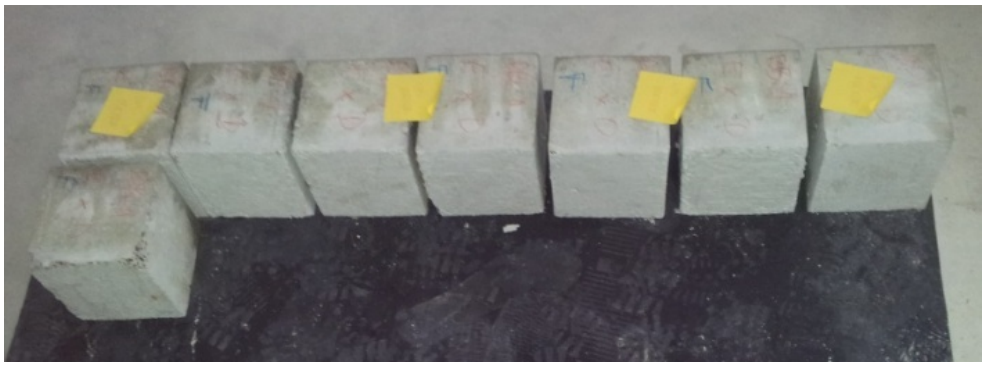


Figura 27 – Cura seca (6 dias)

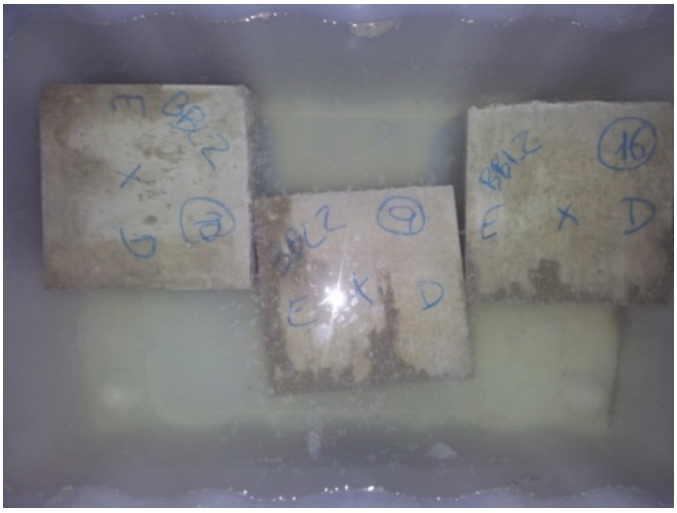


Figura 28 – Cura húmida (1 dia)

Cada situação analisada por amostras tinham uma tina de cura específica não havendo contacto entre elas para evitar contaminação bacteriana e contaminação de lactato de cálcio. No final do ciclo de cura (a cada 7 dias) a água das tinas foi mudada. Para algumas das amostras a cura após a descofragem foi sempre húmida (no caso do betão BASE H). Tentámos verificar a concentração de lactato de cálcio dissolvido na água de cura das amostras, mas não obtivemos quaisquer resultados. A dificuldade de avaliação desta concentração e a falta de meios para a realizar levou-nos a não conseguir avaliar este fator, apesar do fabricante referir que a solubilidade do lactato de cálcio na água ser bastante baixa. Para cada uma das composições foram realizados uma série de ensaios e consideradas uma série de amostras, assim como cura, os quais se encontram descritos na Tabela 11.

Tabela 11 – Ensaios por composição e dimensão das amostras

Identificação da amostra	Tipo de ensaio	Idade das amostras (dias)	Dimensões das amostras (mm)	Número de amostras por situação
BASE	INSPEÇÃO VISUAL	29	50x50x50	1
		44		
		56		
		97		
		174		
	DRX	156	Pó	1
		202	Pó	1
	RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO	3	150x150x150	2
		28		2
		56		2
		84		2
	SEM/EDS	33	25x25x25	1
		94		1
		176		1
BASE H	RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO	3	150x150x150	2
		28		2
		56		2
		84		2
BL	INSPEÇÃO VISUAL	29	50x50x50	1
		44		
		56		
		97		
		174		
	DRX	156	Pó	1
	RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO	3	150x150x150	2
		28		2
		56		2
		84		2
	SEM/EDS	33	25x25x25	1
		94		1
		176		1
BB	INSPEÇÃO VISUAL	35	50x50x50	1
		57		
		69		
		110		
		193		
	DRX	169	Pó	1
	RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO	3	150x150x150	2
		28		2
		56		2
		84		2
	SEM/EDS	50	25x25x25	1
		106		1
		190		1
BBL1	INSPEÇÃO VISUAL	31	50x50x50	1
		53		
		65		
		106		
		188		
	DRX	165	Pó	1
	RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO	3	150x150x150	2
		28		2
		56		2
		84		2
	SEM/EDS	31	25x25x25	1
		46		1
		102		1
		186		1
BBL2	INSPEÇÃO VISUAL	36	50x50x50	1
		58		
		70		
		111		
		194		
	DRX	170	Pó	1
	RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO	3	150x150x150	2
		28		2
		56		2
		84		2
	SEM/EDS	34	25x25x25	1
		45		1
		49		1
		105		1
		189		1

5.3. Ensaios

- **Ensaio granulométrico**

Visto não termos a granulometria da argila expandida que iriamos utilizar no betão, foi necessário proceder ao ensaio para determinação da distribuição granulométrica da amostra segundo a NP EN 933-1:2000. Foi realizado no laboratório de Geotecnia da Universidade de Évora.

Uma saca de 50L foi distribuída num repartidor (Fig. 29) para se fazer uma amostra de 883,2 g que foi utilizada no ensaio. A sequência de peneiros estava em conformidade com a NP EN 933-2:1999 (Fig. 30) e em conformidade com as exigências ISO 3310-1 e ISO 3310-2.

Figura 29 - Repartidor.

Figura 30 - Sequência de peneiros utilizados no ensaio de peneiração (Modelo: Retsch VS1000)

A ficha técnica deste ensaio encontra-se no Anexo D.

- **Teor de humidade**

O teor de humidade foi feito em conformidade com a norma NP EN 1097-5:2002. Foi realizado no laboratório de Engenharia Civil da Universidade de Évora. Este ensaio foi feito a todos os agregados utilizados: areia fina, areia grossa e argila expandida. O recipiente utilizado foi um tabuleiro metálico (Fig. 32). A estufa ventilada utilizada encontra-se na Fig. 31.

Figura 31 - Estufa ventilada (Modelo: P.Selecta Cod:2001245)

Figura 32 - Estufa ventilada contendo tabuleiros metálicos com amostras de argila expandida.

- **Ensaio de abaixamento**

O ensaio de abaixamento (Fig. 33) foi feito com o intuito de verificar a classe de consistência do betão. A norma utilizada foi a NP EN 12350-2:2009.

Todo o material para a realização do ensaio foi humedecido previamente e após o ensaio foram registados os respetivos valores que se encontram no Anexo F.

Figura 33 - Ensaio de abaixamento (Betão Base)

- **Indução de fissuras**

Assim que todas as amostras foram retiradas dos moldes, as que seriam utilizadas em ensaios de resistência à compressão foram colocadas no respetivo tipo de cura, enquanto que as outras, havia a necessidade de induzir fissuras, de maneira a garantir que as bactérias teriam fendas para reparar. A indução de fissuras foi feita de forma mecânica através de uma prensa para ensaio de

resistência à compressão (Fig. 34) pois foi o método que se achou mais rápido para poder prosseguir com os restantes ensaios. A força aplicada pela prensa variou entre os 200kN e os 400kN. Não foi possível manter constante a força aplicada, já que as amostras apresentavam diferentes resistências, pelo que se optou por parar a prensa assim que começaram a surgir as primeiras fissuras nas faces laterais do cubo (evitando assim o surgimento de fissuras demasiado grandes obrigando a rejeitar as amostras).

Após a fissuração dos provetes, os mesmos foram cortados numa mesa de corte (Fig. 35) em amostras cúbicas de dimensão aproximadamente de 50x50x50 mm^3 e de 25x25x50 mm^3. Todas as amostras já cortadas que não apresentavam fissuras foram rejeitadas (não seria possível testar a atuação do meio precursor mineral e dos esporos bacterianos).

Figura 34 - Prensa para ensaios de resistência à compressão (Modelo: COMTEST Impact)

Figura 35 – Corte dos provetes na mesa de corte com disco diamantado (Modelo: Gölz TS350)

O processo de corte utilizado pode criar carbonato de cálcio nas amostras. Em posteriores análises dos resultados dos ensaios, será diferenciado este Carbonato de Cálcio do que é produzido pela atuação bacteriana através do seu hábito: Calcite (romboédrico) e Aragonite (prismático acicular) respetivamente.

Este ensaio foi realizado no laboratório de Engenharia Civil na Universidade de Évora.

- **Resistência à compressão**

Os ensaios de resistência à compressão foram feitos não só para definir a resistência do betão BASE (resistência de referência para todas as outras amostras) como também verificar se a introdução das bactérias, ou dos novos elementos químicos, alteraria as características de resistência da composição. Todos os ensaios de resistência à compressão foram feitos em prensa homologada (Fig. 34), segundo a norma NP EN 12390-3:2009. Este ensaio foi realizado no laboratório de Engenharia Civil na Universidade de Évora

Visto que optámos por um processo de cura adaptado, foi necessário mantermos provetes do betão BASE numa cura padronizada (BASE H) segundo a norma NP EN 12390-2:2009, para verificar se a alteração do processo de cura alterava, ou não, significativamente os resultados do ensaio de resistência à compressão.

- **Inspeção visual (Estereomicroscópio)**

Este ensaio foi feito no Laboratório de Virologia Vegetal do ICAAM.

A necessidade da execução de uma correta inspeção visual das amostras ao longo do tempo reporta à necessidade de avaliação da selagem das fissuras em médias ampliações (variaram entre A_{min}=67x a $A_{máx}$=450x). Assim, conseguimos ter uma maior perceção do comportamento das várias amostras e fazer uma avaliação inicial de resultados (apurando tanto o surgimento de minerais nas fissuras como a sua ausência). As várias ampliações utilizadas serviram para identificar a evolução da mineralização nas amostras. Para esta avaliação foi utilizado um estereomicroscópio (Fig. 36), e amostras de 50x50x50 mm^3. Foram sempre utilizadas as mesmas amostras e zonas de cada uma das amostras, para cada tipo de composição avaliada ao longo do tempo, para que fosse possível a medição da zona selada em cada uma das zonas. Foi feita sempre em idades próximas do microscópio eletrónico de varrimento e espetrometria de Raios-X **(**SEM/EDS) para comparação e compreensão dos resultados obtidos em ambos os ensaios.

Figura 36 - Estereomicroscópio para inspeção visual.

- **Microscópio eletrónico de varrimento e espetrometria de Raios-X (SEM/EDS)**

Este ensaio foi realizado no Laboratório Hércules da Universidade de Évora.

As amostras para o SEM/EDS com 25x25x50 mm^3 de dimensão foram metalizadas (Fig. 37) com ouro, ou carbono, antes da sua utilização no SEM/EDS (Fig. 38). O tipo de metalização dependeu da disponibilidade do material no laboratório e em nada afeta os resultados obtidos. Foi efetuada 1 a 3 dias antes da sua utilização no SEM/EDS. O SEM foi feito com o intuito de verificar o tipo de cristalização mineral presente nas fendas tornando possível a identificação da morfologia dos minerais formados e com auxílio do EDS a sua constituição química. Apesar de não ser tão linear quanto parece, juntamente com os outros ensaios realizados, irá permitir a avaliação mais correta da evolução da mineralização existente nas fissuras e sugerir uma causa para o seu surgimento.

Figura 37 –Metalizador (Au/C) para microscopia eletrónica EMITECH

A análise feita com SEM foi toda condicionada pela disponibilidade do equipamento por parte do Laboratório Hércules da Universidade de Évora e do seu técnico. Visto não ser possível a utilização do SEM quando as amostras apresentavam a mesma idade, foram todas analisadas no mesmo dia. Como o tempo de análise também foi limitado, não foi possível encontrar todos os componentes esperados nas diferentes amostras.

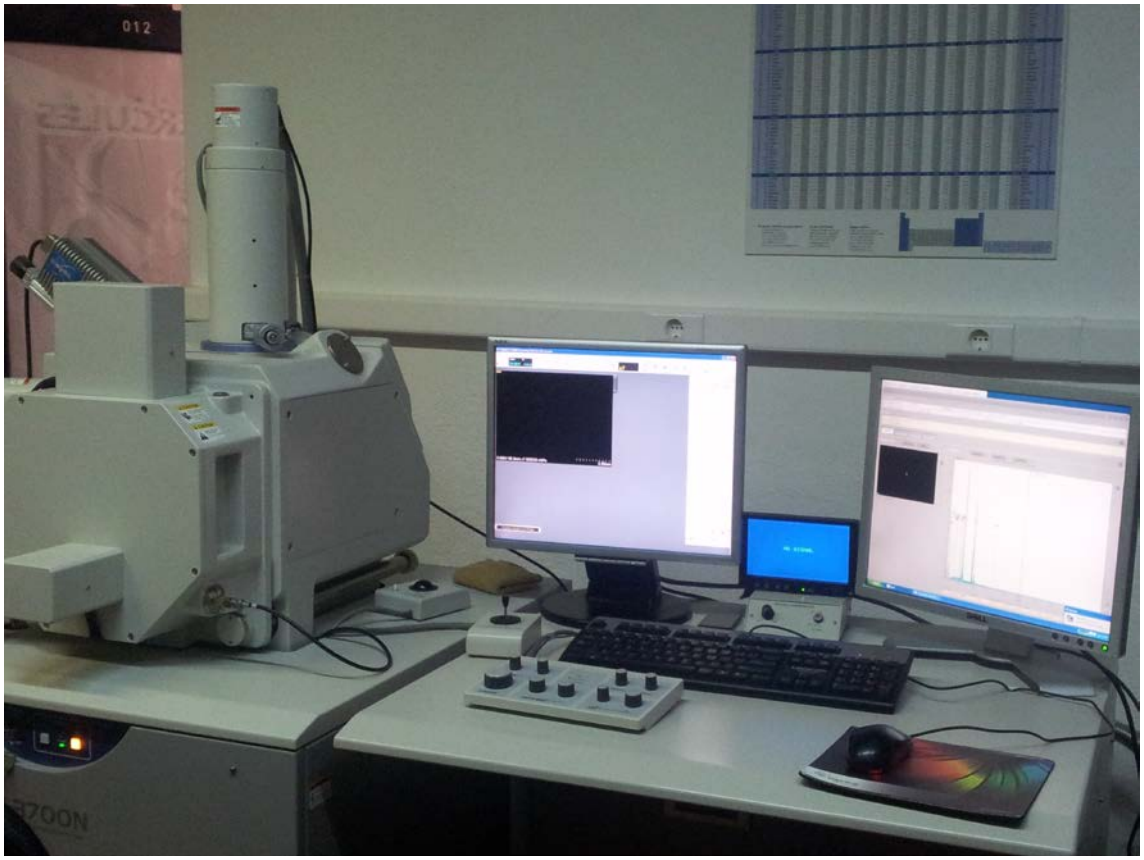


Figura 38 - Microscópio eletrónico de varrimento de vácuo variável HITACHI 3700N com espetrómetro de raios X por dispersão de energias (MEV-EDS) acoplado BRUKER Xflash 5010SDD (SEM/EDS)

- **Número mais provável (MPN)**

Este ensaio foi realizado no laboratório do Centro de Química da Universidade de Évora.

O MPN (*Most Probable Number*) foi feito com o intuito de verificar se os esporos bacterianos introduzidos no betão tinham capacidade de germinar após serem retirados por maceração das amostras de betão e colocados no seu meio ideal de crescimento (meio de cultura alcalino). Essa capacidade será medida através

da contagem do número de culturas crescidas após inoculação. Este ensaio foi realizado nas amostras Base para provar que não germinarão esporos nestes casos, e nas amostras BB, BBL1 e BBL2 para verificar não só o crescimento de colónias como também quantifica-lo.

Foram trituradas e maceradas amostras com cerca de 3 g de betão, em almofariz de porcelana (previamente desinfetado com etanol a 70%) em câmara de fluxo vertical (Fig. 39).

Figura 39 - Câmara de fluxo vertical (Modelo: FLUFRANCE EUROPEENNE)

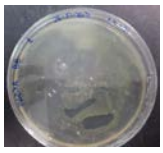
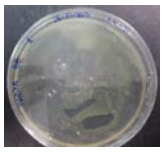
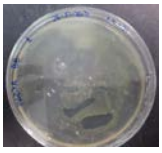
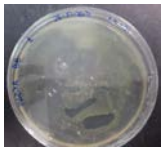
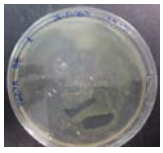
A amostra já triturada foi colocada num tubo centrífugo de 50 mL e foi adicionado MRD (Anexo A) para recuperar os esporos das amostras, até perfazer um volume de solução de 30 mL (Fig. 40).

Figura 40 – Tubo centrífugo contendo MRD e a amostra de betão triturada.

Ficaram num agitador a 150 rpm durante 1 dia a 30ºC. Foram feitas diluições seriadas de 1/10, 1/50, 1/100 e 1/1000 e espalhadas as soluções em placas de *petri* com o meio de cultura alcalino.

As amostras foram avaliadas após 1 dia de inoculação e após 1 semana.

Tabela 12 - Esquema ilustrativo do processo MPN seguido.

	Solução 5ml	0,4 mL de solução + 3,6 mL MRD 1/10	0,8 mL de solução + 3,2 mL MRD 1/50	2 mL de solução + 2 mL MRD 1/100	3,6 mL de solução + 0,4 mL MRD 1/1000
0,2 mL em placa					
0,5 mL em placa					
1 mL em placa					

- **Difração de Raios-X (DRX)**

Este ensaio foi realizado no Laboratório Hércules da Universidade de Évora.

A difração de Raios-X foi utilizada para análise de cristais (Fig. 41). Um feixe de Raios-X (produzidos por um tubo de raios x e selecionados por difração) com comprimento de onda bem definidos é difratado sobre um cristal desconhecido. A partir daí, a medida do ângulo de difração consegue dar-nos a distância entre os átomos no cristal chegando então a uma estrutura cristalina definida.

No âmbito deste trabalho a difração de Raios-X foi feita com o intuito de determinar a composição mineralógica das amostras de betão permitindo-nos comparar, juntamente com os outros ensaios os cristais formados. O método de ensaio foi o método do pó, normalmente utilizado para identificação de substâncias cristalinas a partir de um volume reduzido da amostra.

Este ensaio foi realizado apenas uma única vez para as amostras BB, BL, BBL1 e BBL2 e duas vezes para a amostra BASE pois apenas nos interessava saber o tipo de cristais presentes nas amostras após a sua inspeção visual e após a análise em SEM para permitir não só avaliar de forma racional os resultados destes ensaios como também comprovar a presença de cristais normalmente existentes no betão. As amostras da DRX foram maceradas em almofariz e posteriormente moídas em moinho de bolas para utilização neste ensaio. Como a quantidade de pó para realizar este ensaio é reduzida, foi inicialmente moída com almofariz cerâmico uma amostra com 5x1x1 cm^3 e posteriormente selecionadas cerca de 80g de cada amostra para a sua realização. As condições em que foram feitos os difratogramas foram as seguintes: Difratómetro D8 Discover da Bruker, com radiação Cu Kα, num ângulo 2θ de 3º a 75º, com um *step* de 0,05º, 1s por *step*.

Figura 41 - Difratómetro de Raios-X (Modelo D8 Discover da Bruker®)

- **Alteração dos padrões de cura**

Este ensaio foi realizado no laboratório de Engenharia Civil da Universidade de Évora.

Três amostras previamente fissuradas da amostra BASE, 50x150x150 mm^3, foram colocadas em três tabuleiros metálicos diferindo em cada um a água de cura, BaseL, BaseB e BaseLB. Num colocámos uma solução com esporos bacterianos (BaseB), noutro uma solução com meio precursor mineral (BaseL) e no outro ambas as soluções (BaseLB). O processo de cura foi o mesmo adotado para todas as outras amostras, 6 dias de cura seca e 1 dia imersa nestas soluções, respetivamente.

As concentrações utilizadas foram as mesmas que introduzimos no betão.

Para cada uma das composições foram realizados os ensaios atrás descritos na Tabela 11.

Tabela 13 - Modelos das amostras para cada ensaio

Identificação do ensaio	Tipo de amostra	Dimensões das amostras (mm)	Massa das amostras (g)
Granulometria da argila expandida	Saca 50L passada no repartidor antes de ser feita a amostragem.	_____	883,2
Teor de humidade	_____	_____	M(argila expandida)=1633,3 M(areia fina)=505,2 M(areia grossa)=971,6
Abaixamento	Betão fresco	_____	
Indução de fissuras		150x150x150	_____
Resistência à compressão		150x150x151	_____
Estereomicroscópio		50x50x50	_____
SEM/EDS		25x25x25	_____
MPN		_____	3,0
DRX		_____	80,0
Alteração dos padrões de cura		50x150x150	_____

As amostras para MPN e difração de Raios-X foram trituradas com auxílio de um almofariz. Não houve o cuidado de criar ambiente estéril para as amostras da DRX visto que o que iria ser analisado era a presença de cristais formados nas amostras. No caso das amostras de DRX ainda foram passadas por um moinho mecânico para reduzir ainda mais a amostra e aumentar a finura. A Tabela 13 indica quais as amostras utilizadas para os principais ensaios.

6. RESULTADOS E SUA ANÁLISE

6.1. Ensaio de resistência à compressão

Os resultados dos ensaios de resistência à compressão são os indicados na Fig.42.

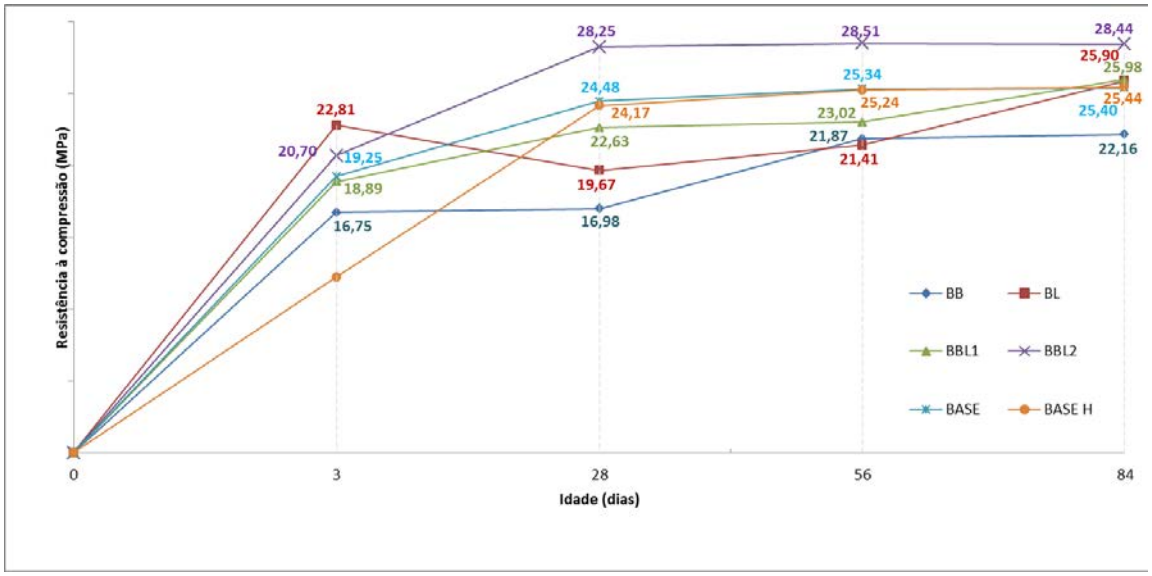


Figura 42 – Resistências à compressão das composições

As amostras de BASE e BASE H não variam muito quanto às suas resistências à compressão, sendo aos 28 dias de uns 24 MPa. Não era de esperar que isto ocorresse, já que a cura húmida tende a ganhar resistência mais rapidamente, visto que as partículas não hidratadas de cimento continuam a sua hidratação neste processo, conferindo uma maior coesão dos agregados e propriedades resistentes superiores, relativamente a uma cura a seco. A incorporação de bactéria (BB) nas composições provoca uma diminuição de resistência à compressão, o mesmo ocorre com a composição com lactato de cálcio (BL). A amostra de betão BB, ganha mais resistência entre os dias 28 e 56, ao contrário da amostra BL que perde resistência entre os 3 e os 28 dias. Por outro lado, nas idades mais avançadas as amostras tendem a estabilizar a sua resistência conforme a Fig. 42 indica. As tabelas com as respetivas resistências de cada amostra por idade encontram-se no Anexo F.

6.2. Inspeção visual (estereomicroscópio)

Através do estereomicroscópio foi possível acompanhar a evolução do fecho das fissuras ao longo de quase 200 dias. Nas Fig. 43-47 está um resumo dessas imagens, onde foram assinaladas algumas zonas onde é mais visível o fecho das fissuras.

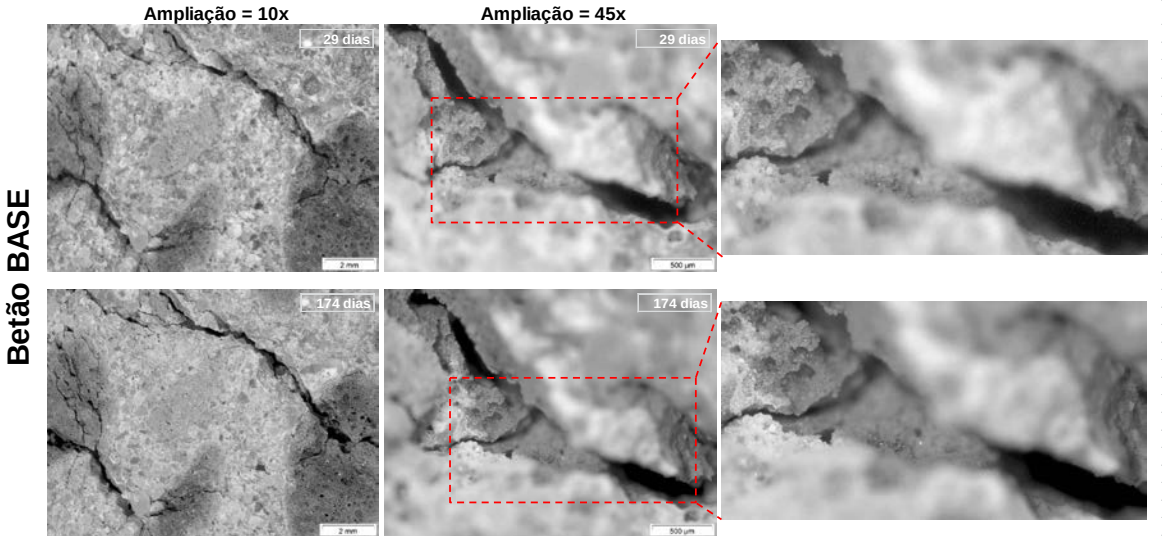


Figura 43 - Inspeção visual na amostra de betão BASE aos 29 e 174 dias ampliadas 10 e 45 vezes.

Nas amostras de betão BASE não é evidenciada nenhuma mineralização ao longo do tempo de análise, Fig.43. Este resultado já era esperado, já que a única formação de carbonato de cálcio que ocorra nesta amostra só pode ser derivada da carbonatação, uma vez que não contém bactéria nem lactato de cálcio.

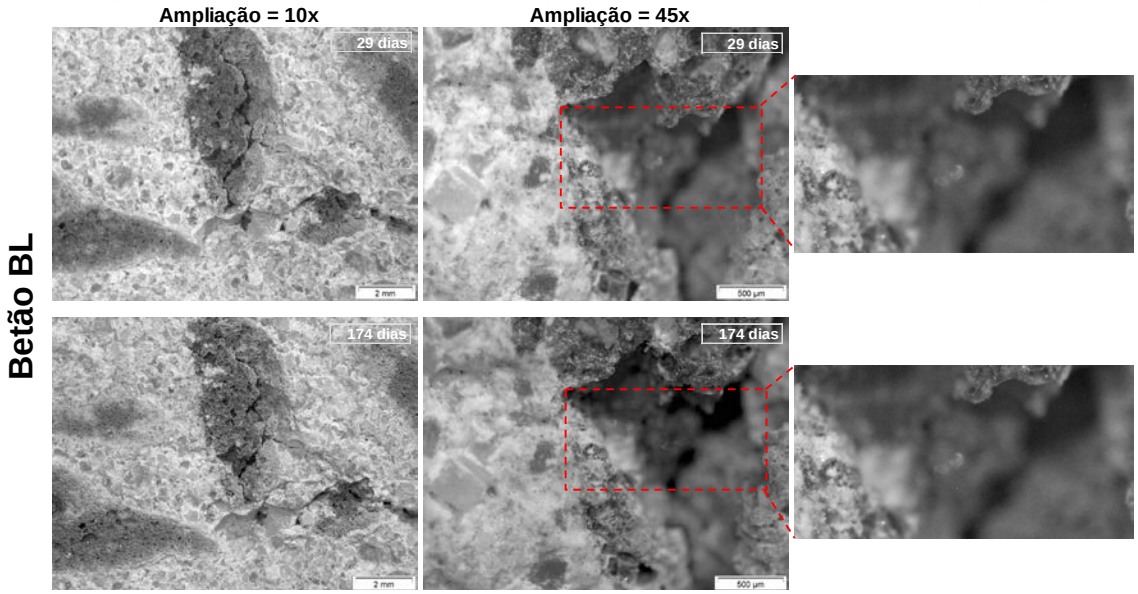


Figura 44 - Inspeção visual na amostra de betão BL aos 29 e 174 dias ampliadas 10 e 45 vezes.

A inspeção visual nas amostras BL não demonstra nenhum tipo de selagem das fissuras ao longo do tempo, Fig. 44. Aparentemente não existe nenhuma mineralização, logo, também o meio precursor mineral por si só não tem capacidade para selar as fissuras.

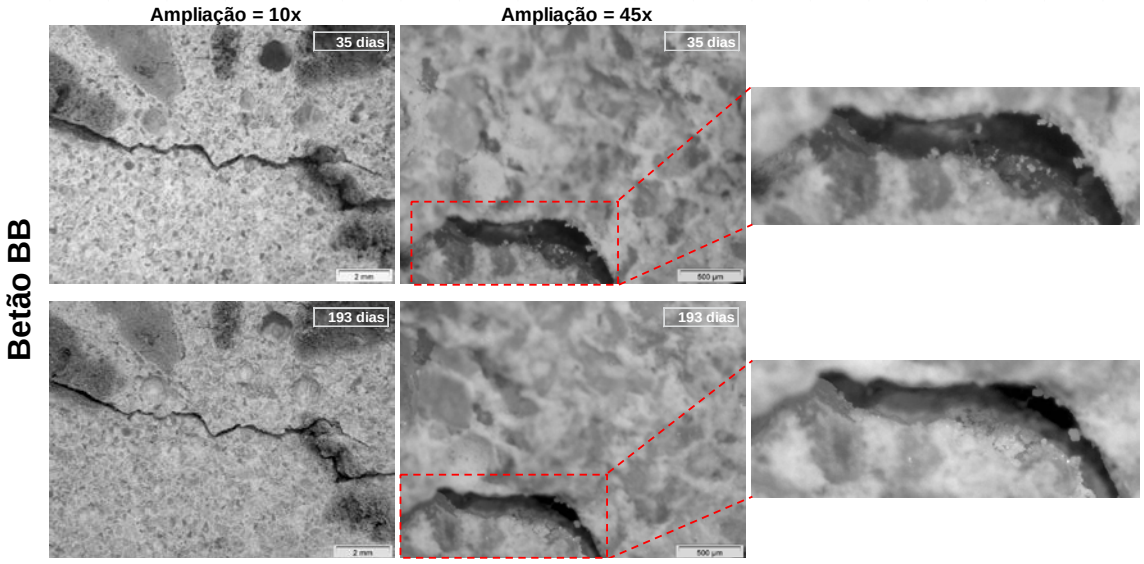


Figura 45 - Inspeção visual na amostra de betão BB aos 35 e 193 dias ampliadas 10 e 45 vezes.

Nas amostras de betão BB é evidente aos 36 dias uma coloração branca na matriz devido à fácil dissolução da portlandita, Fig. 45 (b). O mesmo acontece na Fig. 45 (e) onde é evidenciada essa coloração branca ao longo da matriz aos 193 dias. As fissuras não estão preenchidas por minerais e encontram-se aparentemente iguais ao longo do tempo, pelo que a bactéria não tem capacidade de selar por si só as fissuras.

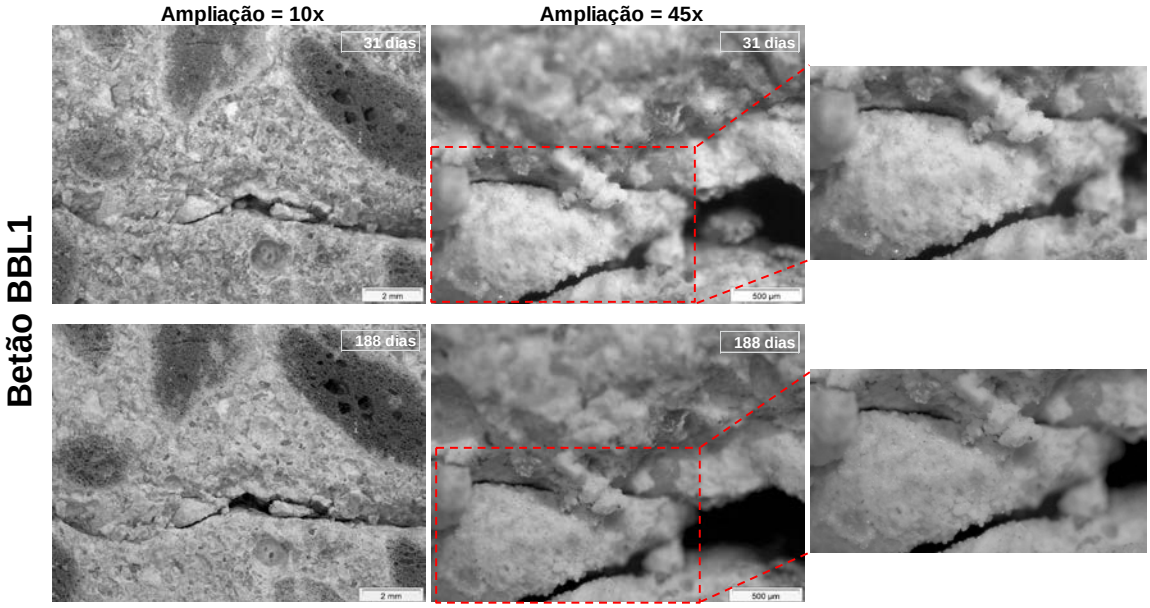


Figura 46 - Inspeção visual na amostra de betão BBL1 aos 31 e 188 dias ampliadas 10 e 45 vezes.

Aos 31 dias de idade a amostra de BBL1 mostra algum nível de mineralização, Fig. 46 (b). Ao longo do tempo há um muito ligeiro aumento destes cristais (comparar Fig. 46 (b) e (e)), não sendo suficiente para aos 188 dias de idade selar por completo a fissura apresentada. Isto demostra que apesar do betão conter bactéria e meio precursor mineral, os mesmos, por se encontrarem em agregados de argila distintos, têm alguma dificuldade em reagir entre si e com a água. Pode ser que as amostras precisem estar mais tempo imersas em água para que ocorram essas reações.

Aos 36 dias de idade a cristalização de cor branca já é bastante evidente nesta amostra de BBL2 (ampliação a 45x), sendo possível notar a sua presença em ampliações mais baixas. Comparando as imagens (b) com (e) da Fig. 47 nota-se que a mineralização vai aumentando gradualmente e vai-se espalhando ao

longo da fissura, permitindo verificar diferenças nas imagens em ampliações menores (comparar (a) e (d) da Fig. 47). Na Fig. 47 (e) e (f) é visível a selagem da fissura na zona marcada na imagem. Aos 194 dias de idade o processo de mineralização continua a evoluir nas amostras, evidenciado pela imagem (f) da Fig. 47.

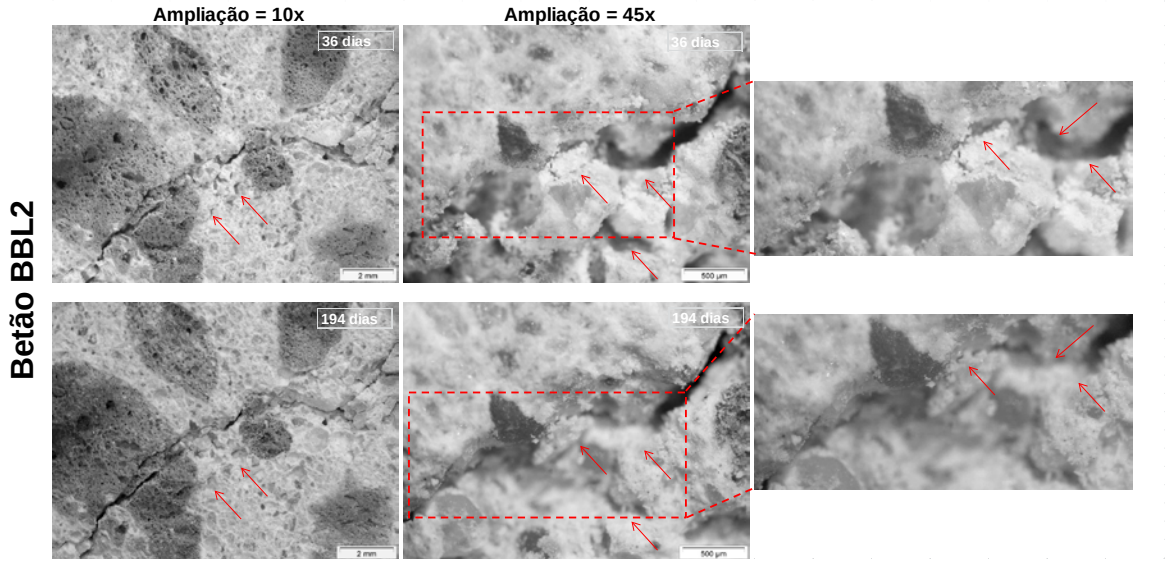


Figura 47 - Inspeção visual na amostra de betão BBL2 aos 36 e 194 dias ampliadas 10 e 45 vezes.

Claramente nestas composições a selagem de fissuras ocorre. Conseguiu-se que fossem seladas fendas de 0,34 mm mas não de forma homogénea (Fig. 53).

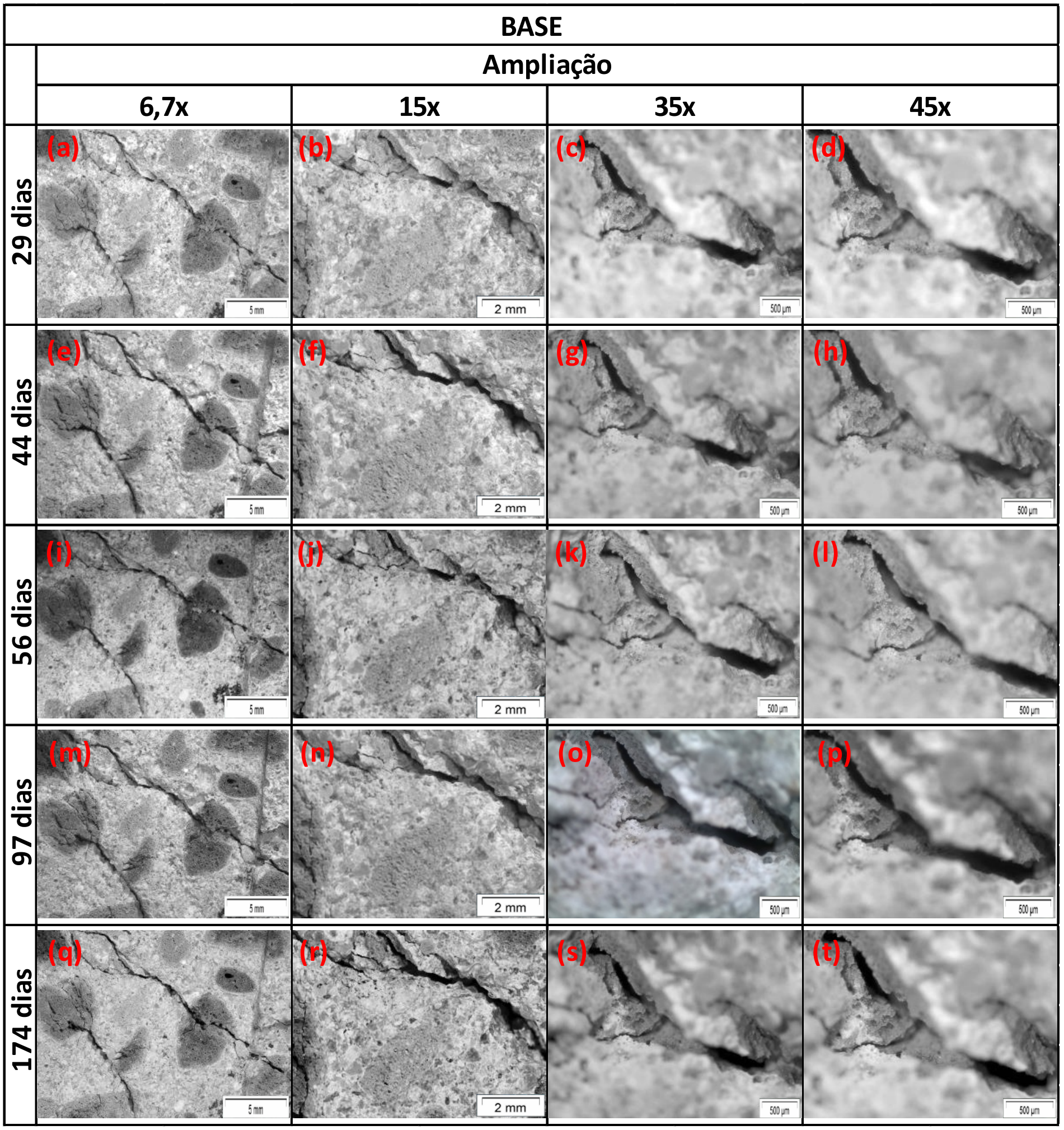


Figura 48 – Inspeção visual na amostra BASE aos 29, 44, 56, 97 e 174 dias com ampliações de 6,7x, 15x, 35x e 45x.

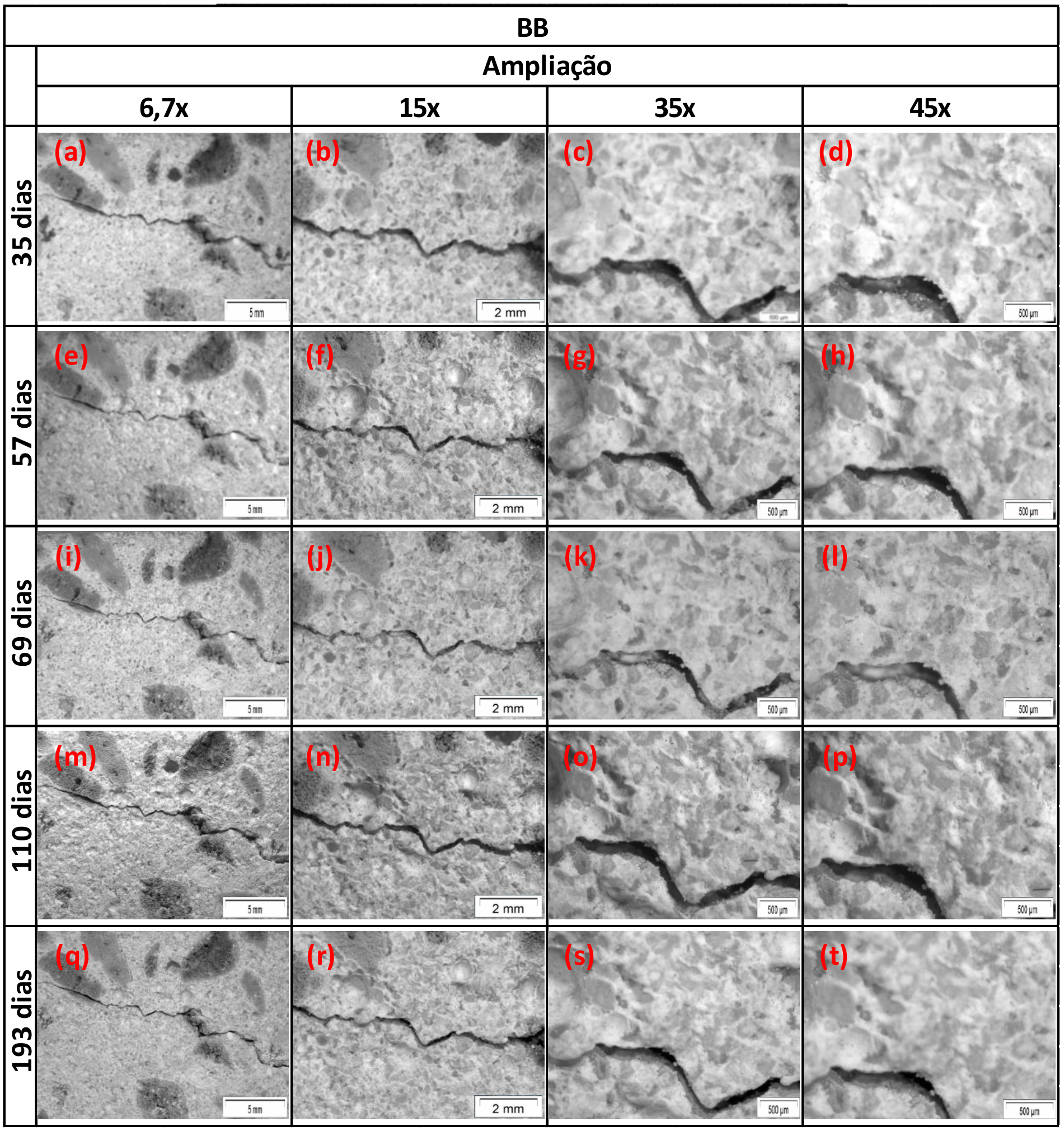


Figura 49 - Inspeção visual na amostra BB aos 35, 57, 69, 110 e 193 dias com ampliações de 6,7x, 15x, 35x e 45x.

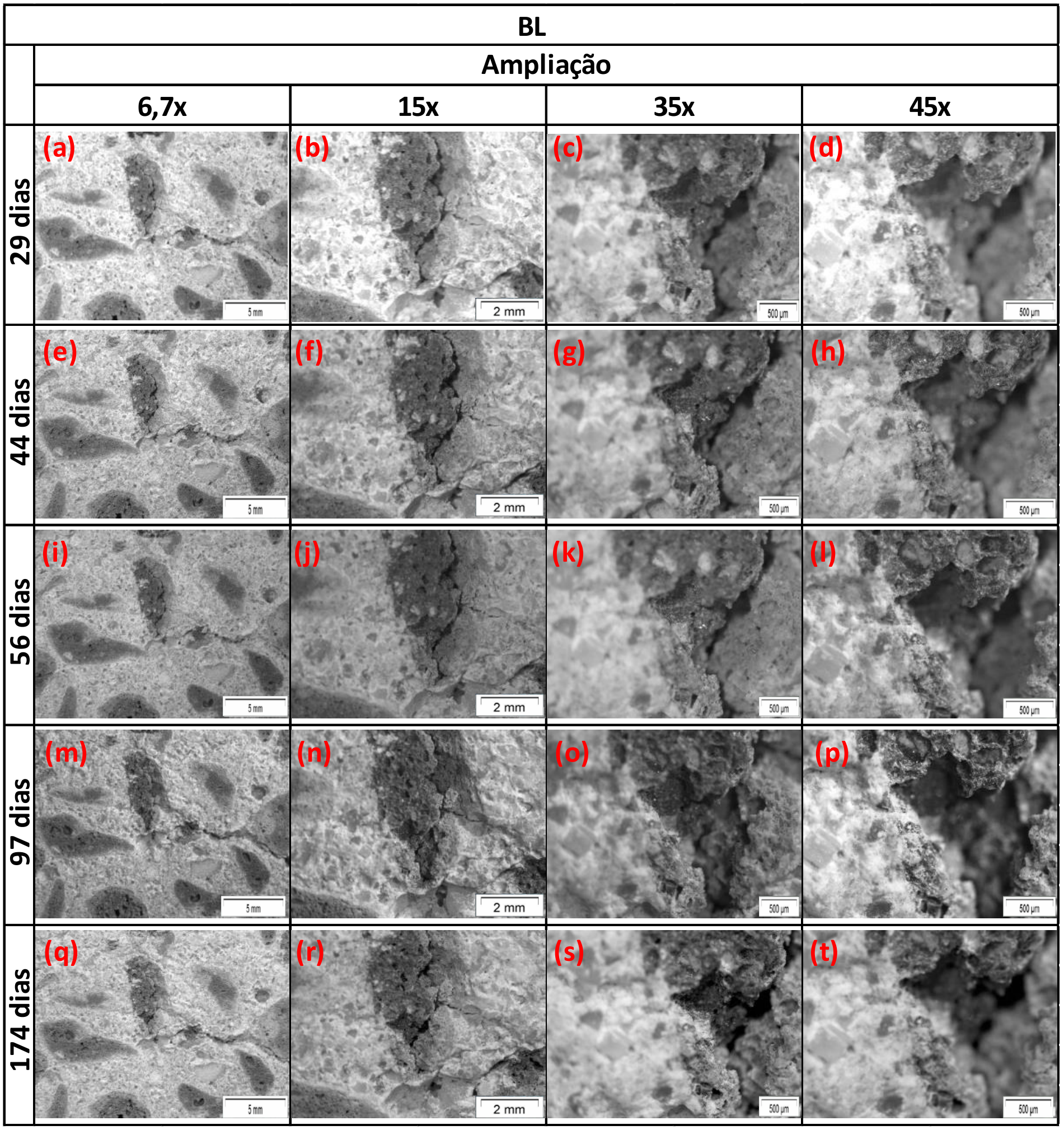


Figura 50 - Inspeção visual na amostra BL aos 29, 44, 56, 97 e 174 dias com ampliações de 6,7x, 15x, 35x e 45x.

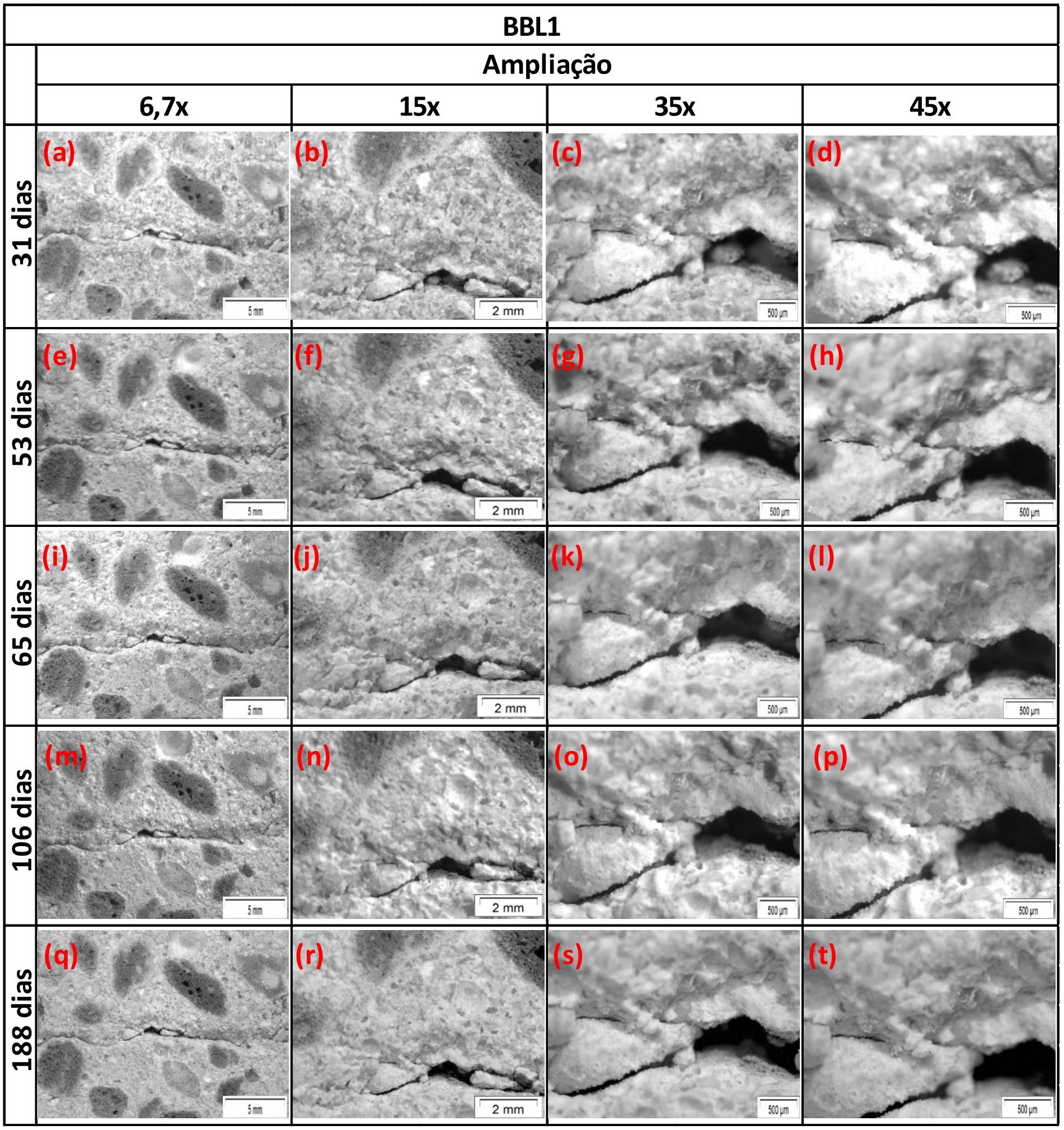


Figura 51 - Inspeção visual na amostra BBL1 aos 31, 53, 65, 106 e 188 dias com ampliações de 6,7x, 15x, 35x e 45x.

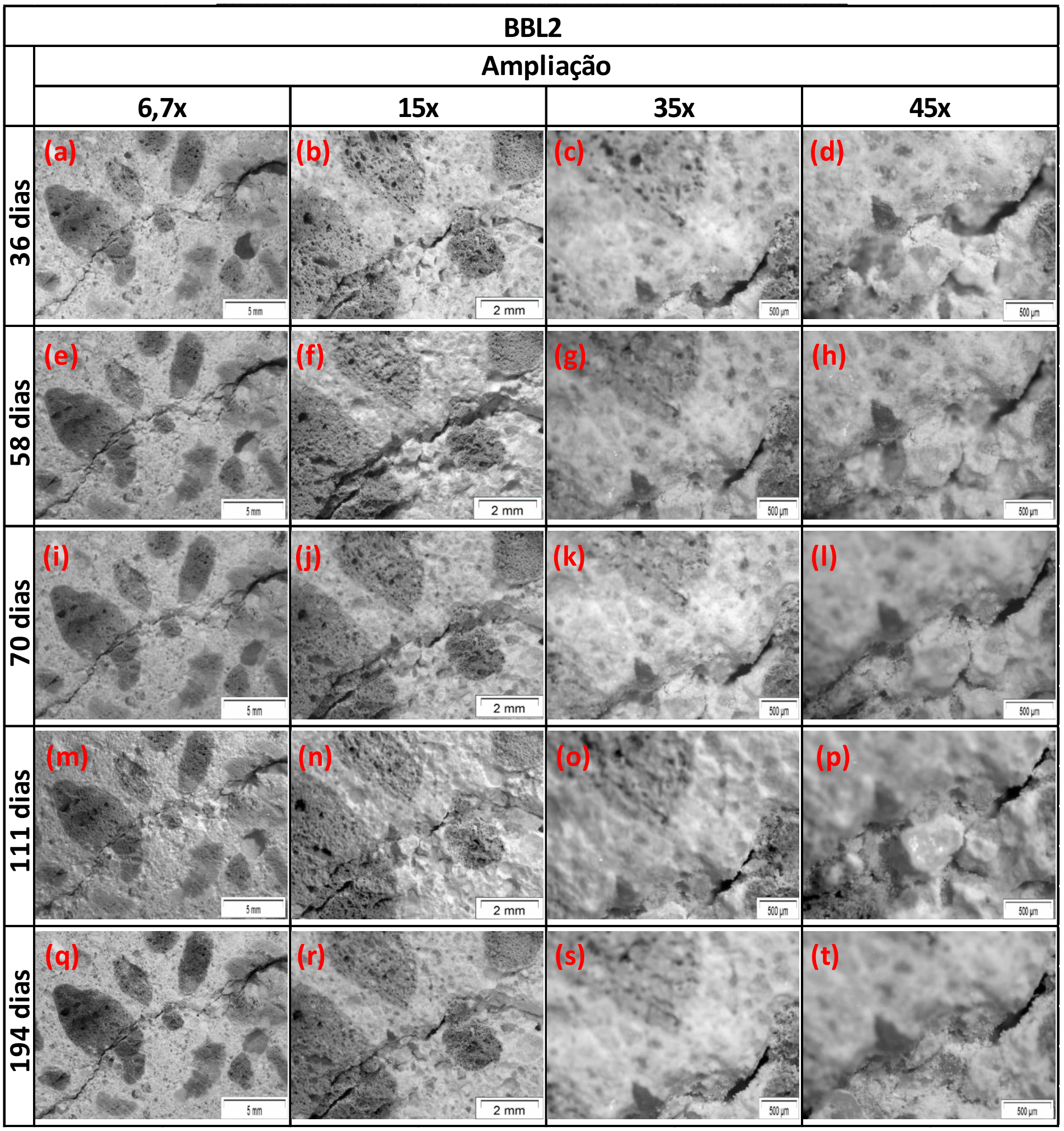


Figura 52 - Inspeção visual na amostra BBL2 aos 36, 58, 70, 111 e 194 dias com ampliações de 6,7x, 15x, 35x e 45x.

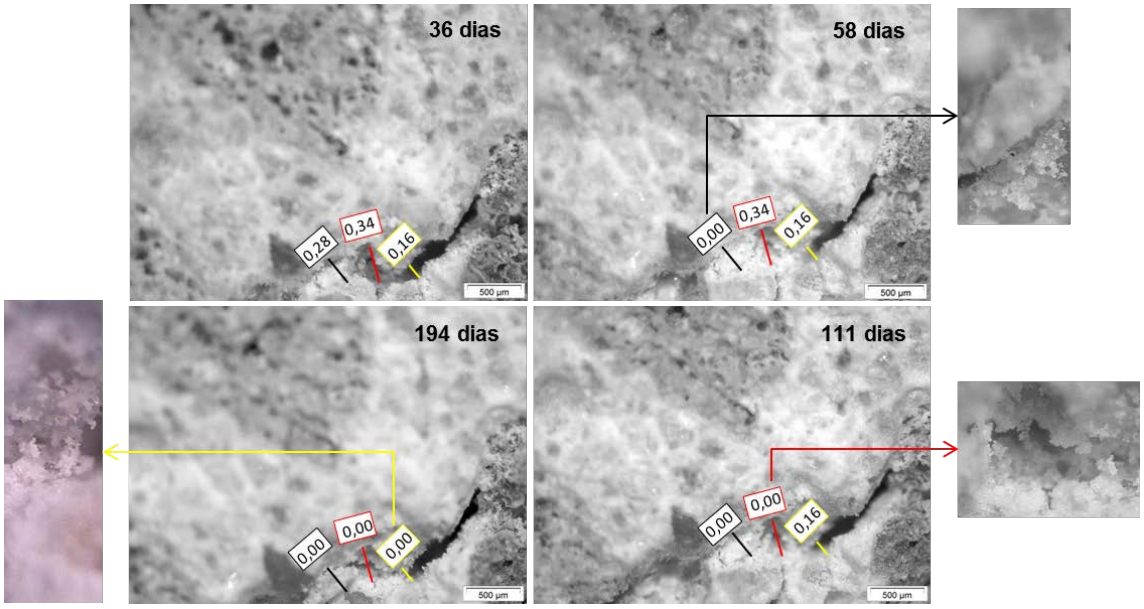


Figura 53 – Evolução da mineralização da amostra BBL2 ao longo do tempo.

Provavelmente em microfissuras este processo teria sido mais eficiente, mas as fissuras selecionadas inicialmente tinham dimensões na ordem do 1mm (ver Fig. 48-52) e nunca superiores a isso. Com a continuidade do processo de cura selecionado talvez se conseguisse selar por completo as fissuras em BBL2, dados esses que já não constarão nesta dissertação. Também se poderiam ter tido em conta, para análise correta do processo de cura selecionado, umas amostras com uma cura imersa em água, simplificando assim um padrão de comparação para verificar se teria sido por falta de disponibilidade de água que a eficiência dos ensaios ficou mais reduzida. Infelizmente e dado o tempo disponível para a realização desta dissertação, não foi possível estudar todas estas situações.

6.3. Microscópio eletrónico de varrimento e espetrometria de Raios-X (SEM/EDS)

Após a inspeção visual, as amostras foram também inspecionadas ao Microscópio eletrónico de varrimento e espetrometria de Raios-X (SEM/EDS), de maneira a analisar a microestrutura do betão e identificar quais os constituintes que se formaram na matriz e nas fissuras e, se estes se deviam à presença das bactérias e meio precursor, ou não.

Na análise das amostras BASE obtiveram-se os seguintes resultados de SEM:

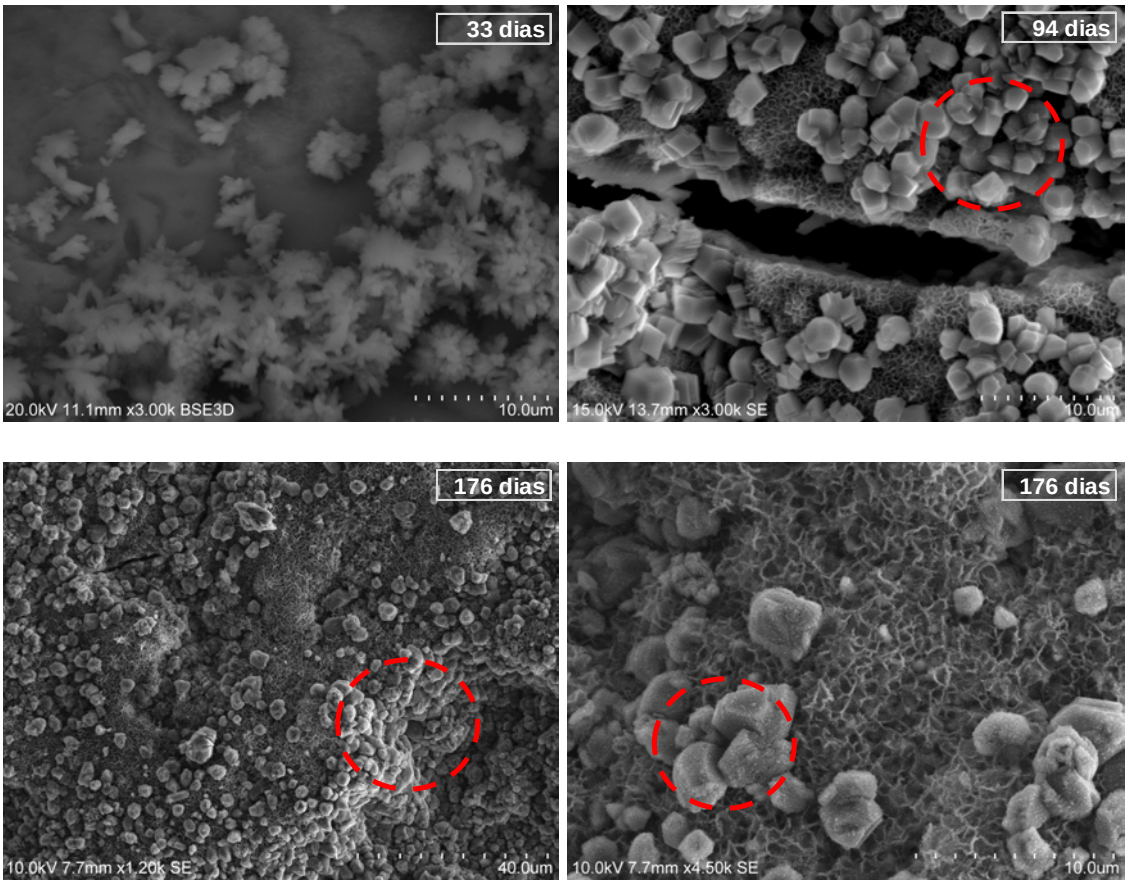


Figura 54 - Análise SEM às amostras BASE aos 33, 94 e 176 dias de idade.

Como se pode verificar na Fig. 54 a presença de calcite nas amostras é uma evidência ao longo do tempo (Imagem (b) (c) e (d)). Aos 94 dias de análise

verificou-se a presença de cristais de calcite na matriz e na fissura em análise. A sua distribuição é homogénea na amostra, variando apenas o tamanho dos cristais formados (imagem (c) da Fig. 54). Aos 176 dias de idade a amostra além de continuar a apresentar cristais de calcite distribuídos ao longo da matriz e fissura, também apresenta silicatos de cálcio hidratados (C-S-H).

A presença de calcite nestas amostras só pode ser devida à carbonatação das mesmas, já que não foram introduzidas nas bactérias as mesmas. O hidróxido de cálcio vai reagir com o dióxido de carbono e dará origem a carbonato de cálcio.

Para uma correta identificação das imagens recolhidas com o auxílio do SEM, foi efetuado também o EDS para comprovar a identificação visual dos cristais que surgiram, como mostram as Fig. 55 e 56.

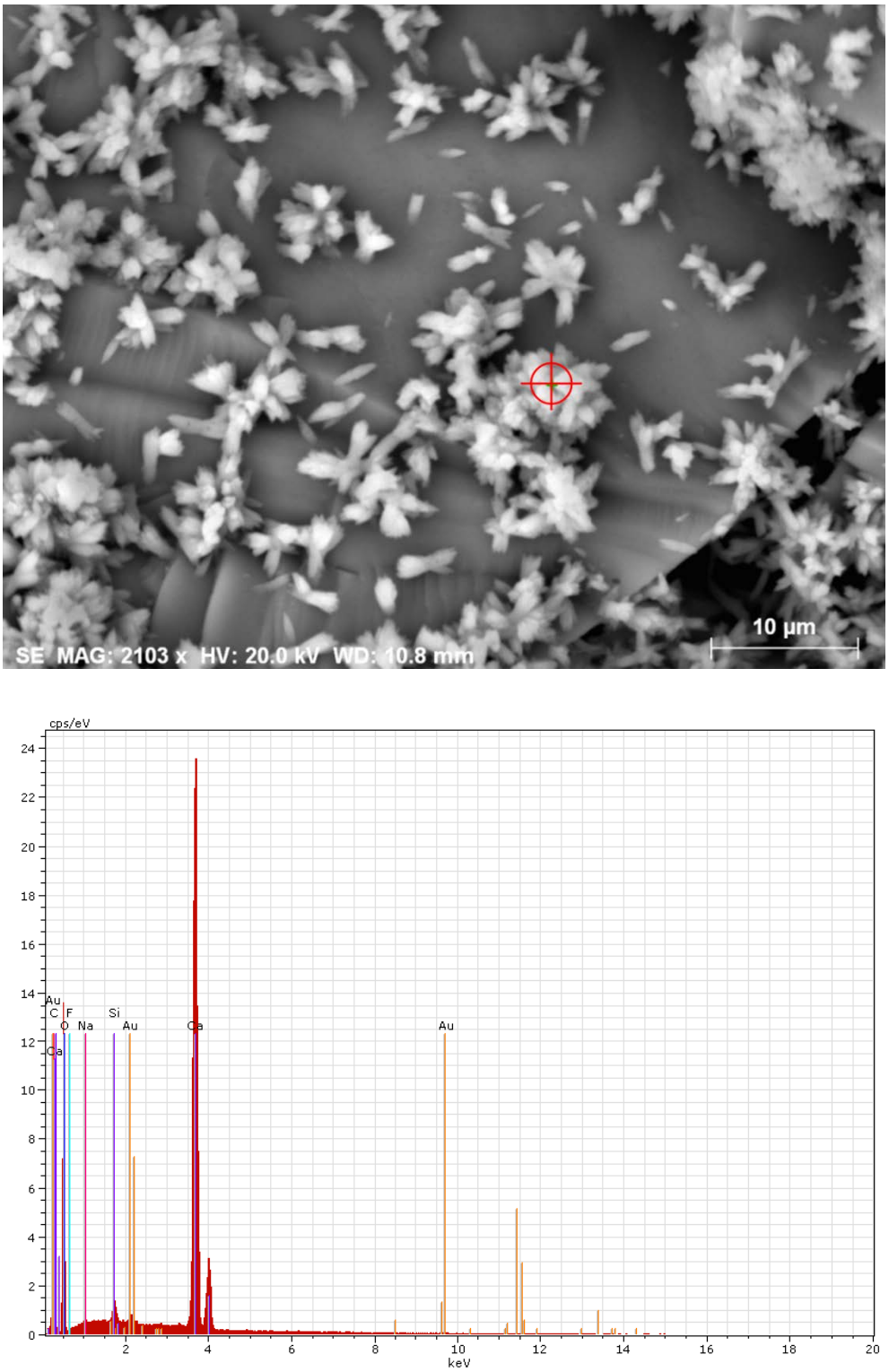


Figura 55 - SEM/EDS na amostra de betão BASE aos 33 dias de idade identificando a presença de minerais.

Os picos de Ca e O da Fig. 55 identificam a presença de hidróxido de cálcio na amostra. O Au indica a presença de ouro devido à metalização das amostras. Os Si juntamente com Ca indicam a presença de C-S-H.

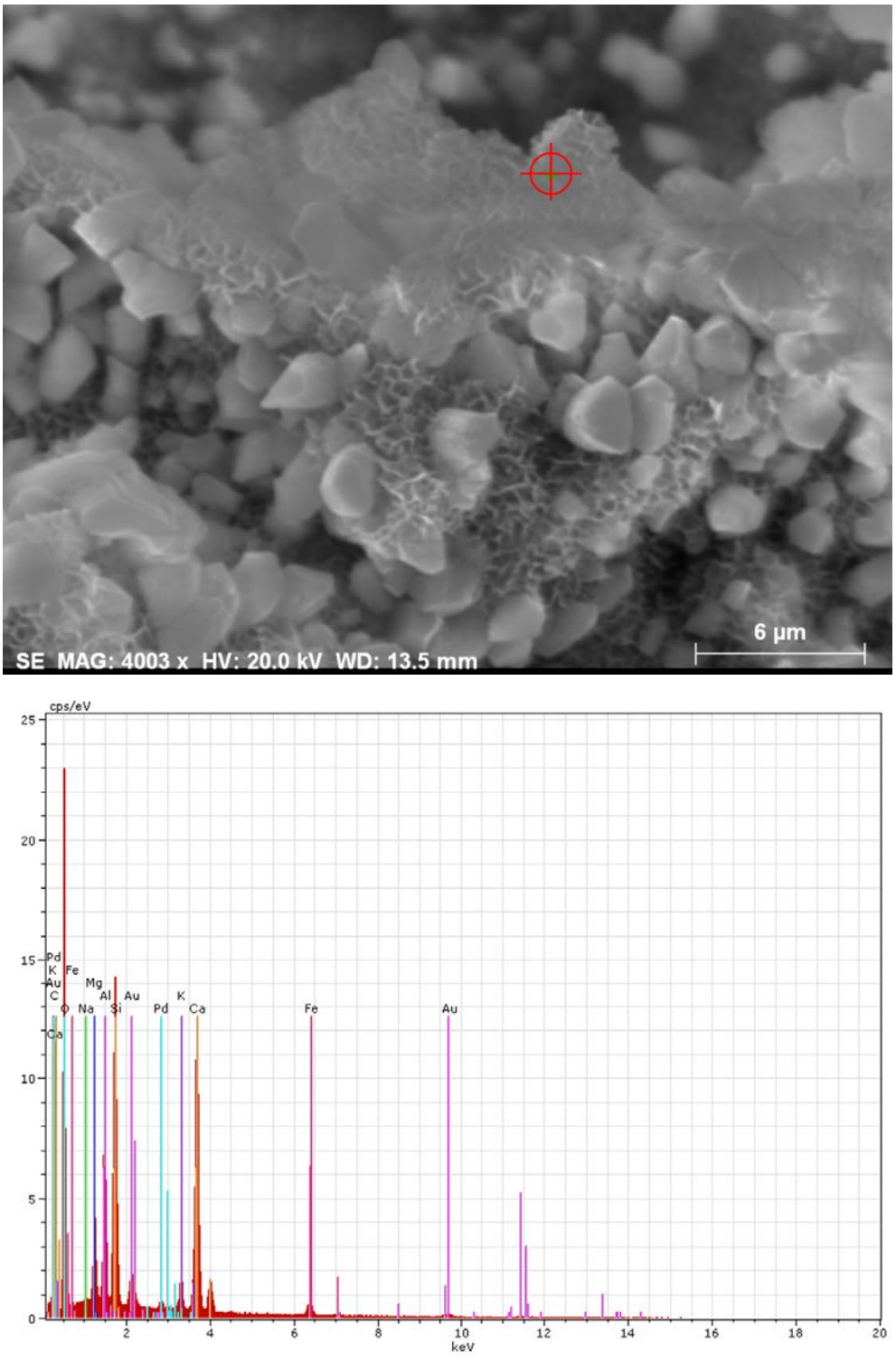


Figura 56 - SEM/EDS na amostra de betão BASE aos 176 dias de idade identificando a presença de minerais.

Os picos de Ca e Si da Fig. 56 identificam a presença de silicatos de cálcio na amostra. O Au indica a presença de ouro devido à metalização das amostras. O Al juntamente com Fe e Ca indicam a presença de aluminato-ferrato tetracálcico.

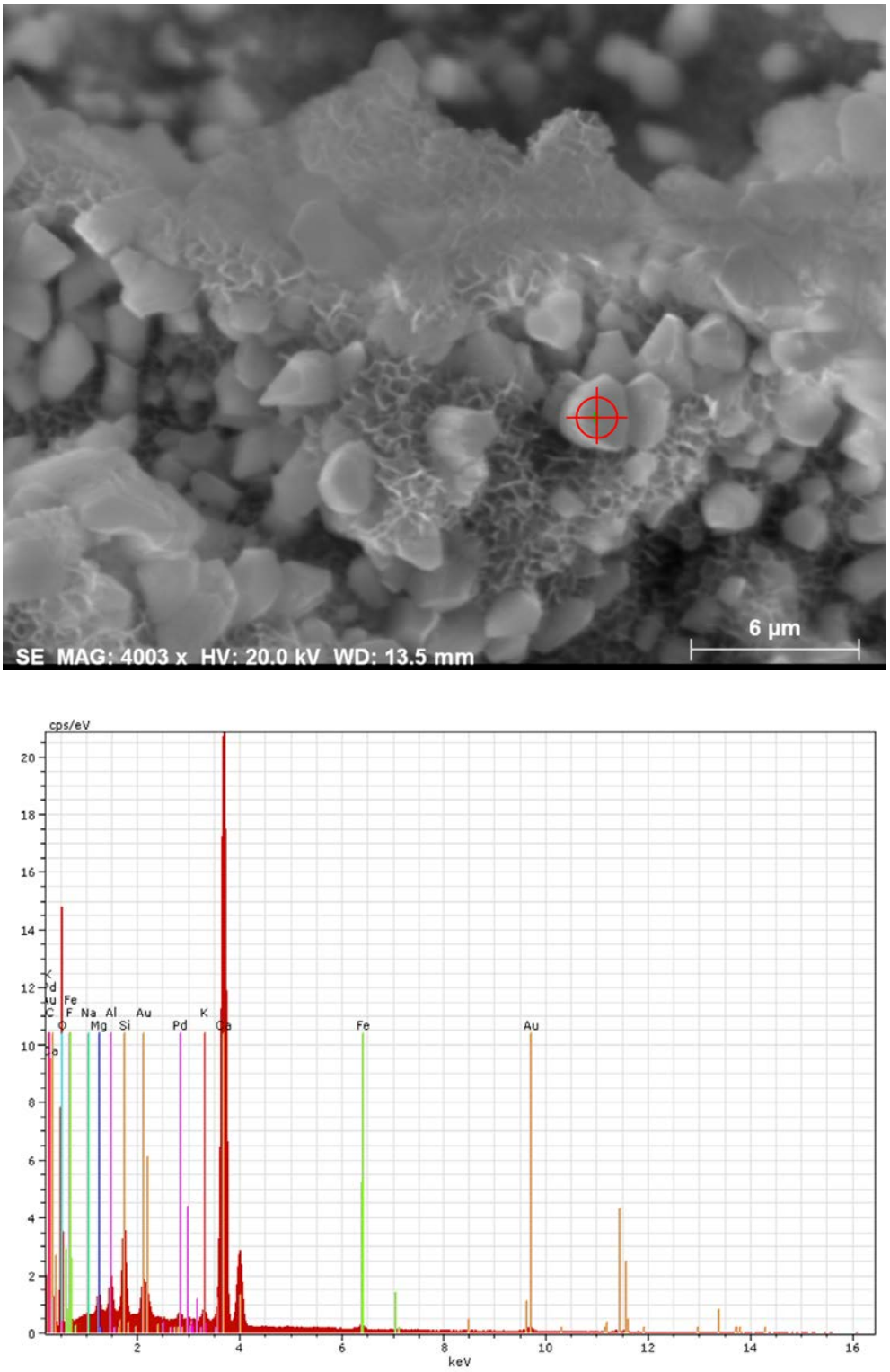


Figura 57 - SEM/EDS na amostra de betão BASE aos 176 dias de idade identificando a presença de minerais.

Os picos de Ca e O da Fig. 57 identificam a presença de calcite na amostra. O Au indica a presença de ouro devido à metalização das amostras. Os Si juntamente com Ca indicam a presença de C-S-H.

A presença de formas cristalinas características de calcite identificadas com SEM, foi comprovada com EDS correspondente. Normalmente em betões já com alguma idade os C-S-H envolvem os cristais de hidróxido de cálcio e carbonato de cálcio como se verificou nos SEM das Fig. 56 e Fig. 57, e se encontra em esquema na Fig. 58.

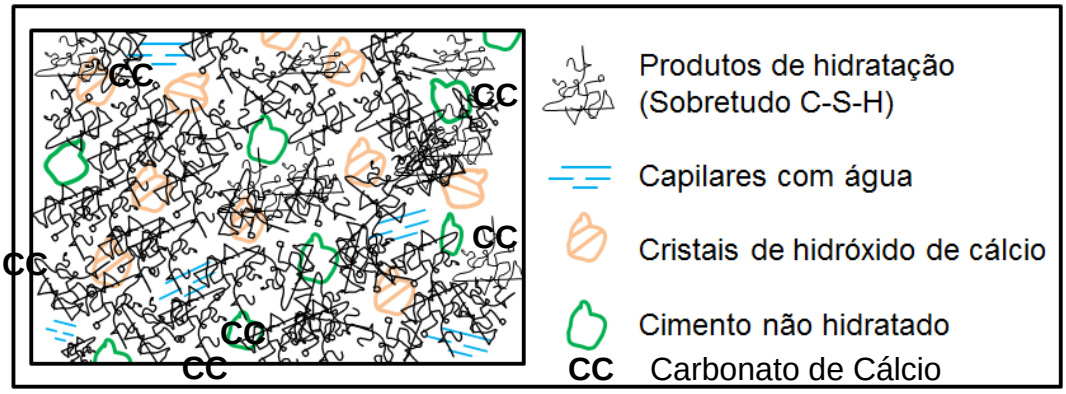


Figura 58 – Pasta endurecida – C-S-H de maior densidade a envolver cristais de $Ca(OH)_2$, resíduos de cimento não hidratados e poros capilares (adaptado de Domone, 1994)

Nas análises de BL foram obtidos os seguintes resultados SEM:

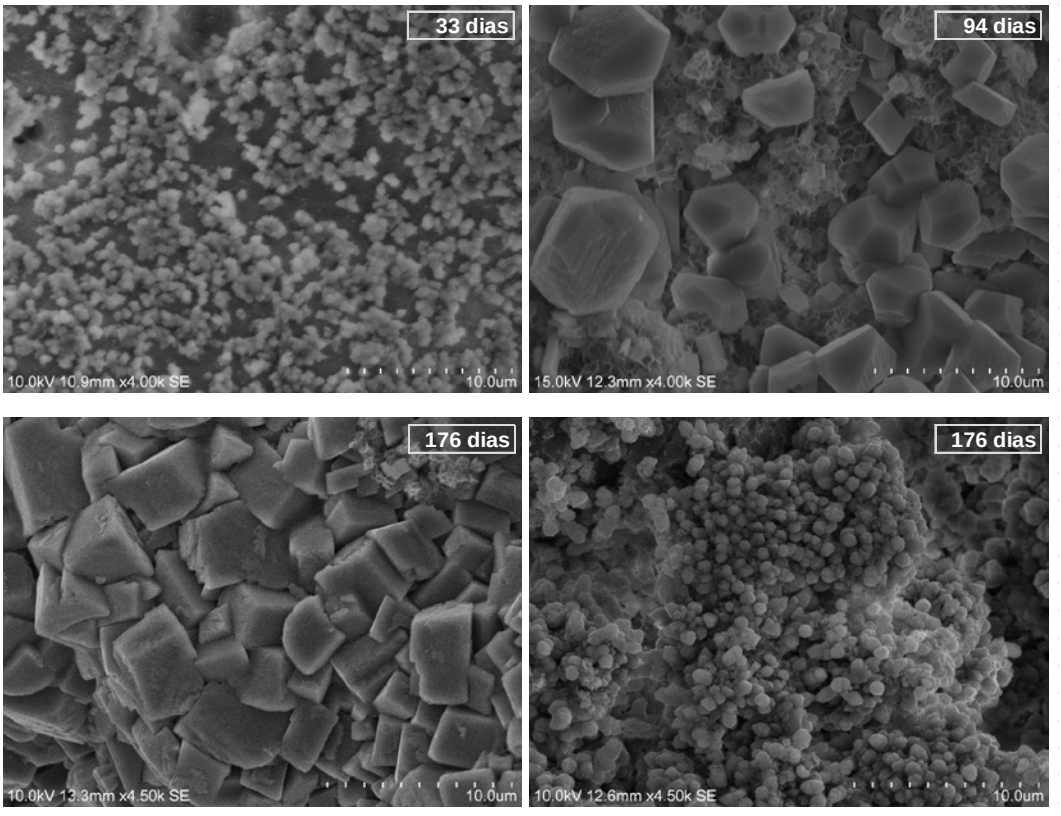


Figura 59 - Análise SEM às amostras BL aos 33, 94 e 176 dias de idade.

Como se pode ver na Fig. 59, não existem muitas diferenças entre o BASE e o BL. Ambos não contêm a bactéria e a presença do lactato de cálcio no BL não deu origem a nenhum outro elemento visível.

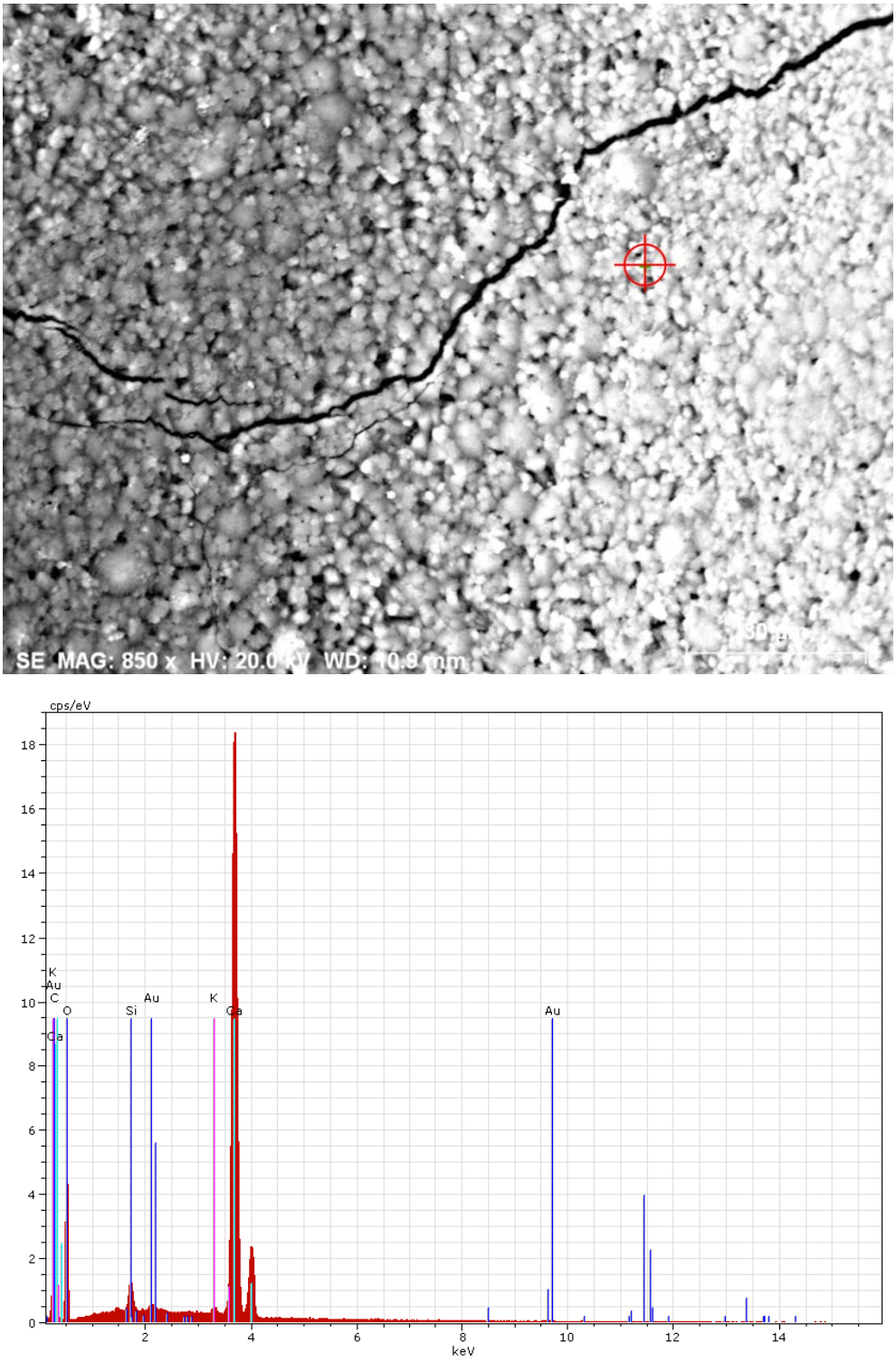


Figura 60 - SEM/EDS na amostra de betão BL aos 33 dias de idade identificando a presença de minerais.

Na Fig. 60 podemos identificar cristais de hidróxido de cálcio e carbonato de cálcio. Os picos EDS mais evidentes são o Ca, H e O identificando carbonato de cálcio e hidróxido de cálcio e Si e Ca identificando os silicatos de cálcio. A presença de Au no EDS deve-se à metalização da amostra

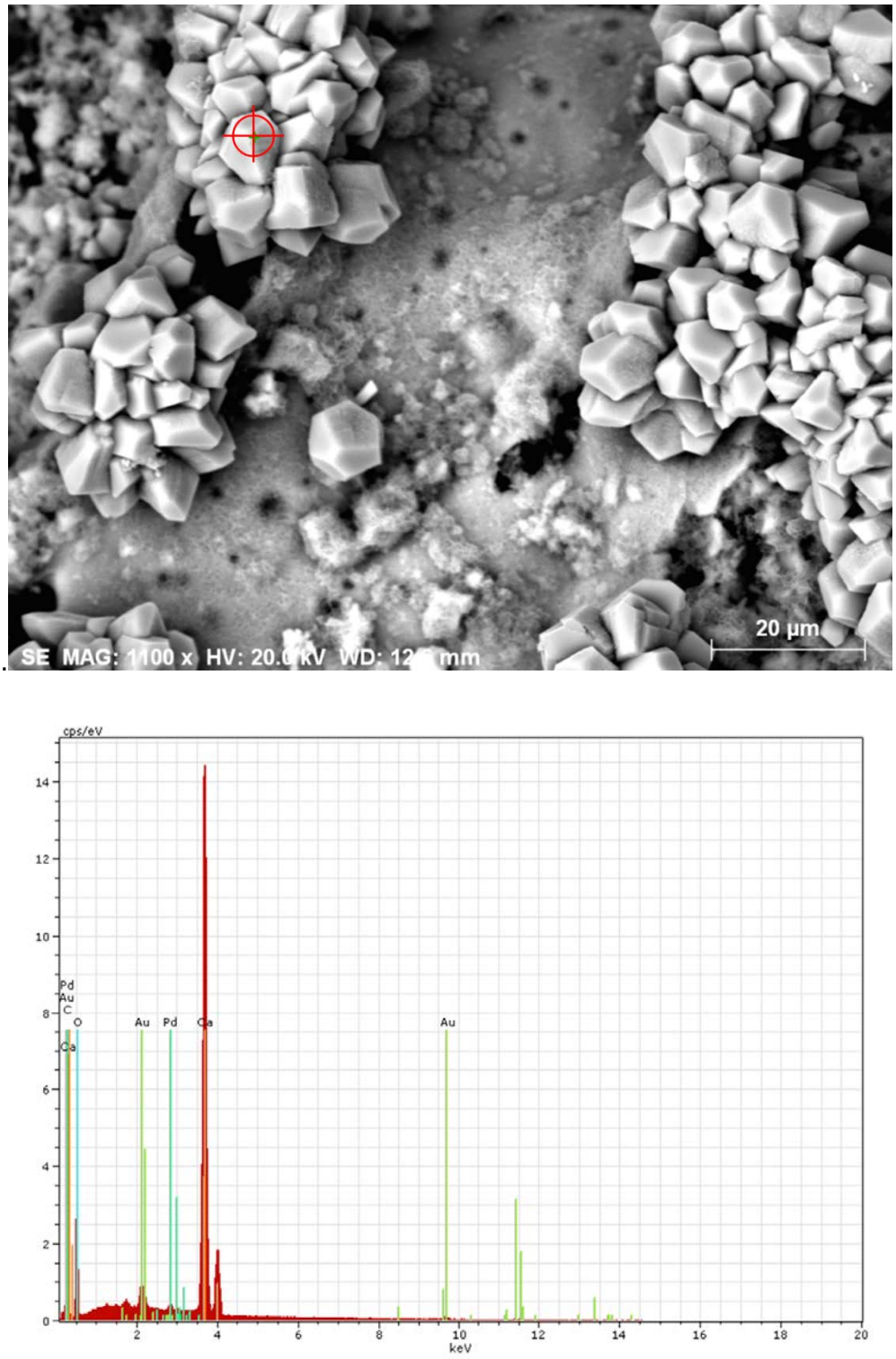


Figura 61 - SEM/EDS na amostra de betão BL aos 176 dias de idade identificando a presença de minerais.

Na Fig. 61 identificou-se o carbonato de cálcio. No EDS os picos mais evidentes são o Ca, H e C identificando carbonato de cálcio e Si e Ca identificando os silicatos de cálcio. A presença de Au no EDS deve-se à metalização da amostra. A geometria dos cristais formados na Fig. 61 é claramente a de carbonato de cálcio com morfologia típica de calcite (hábito romboédrico).

Nas análises de BB obtiveram-se os seguintes resultados:

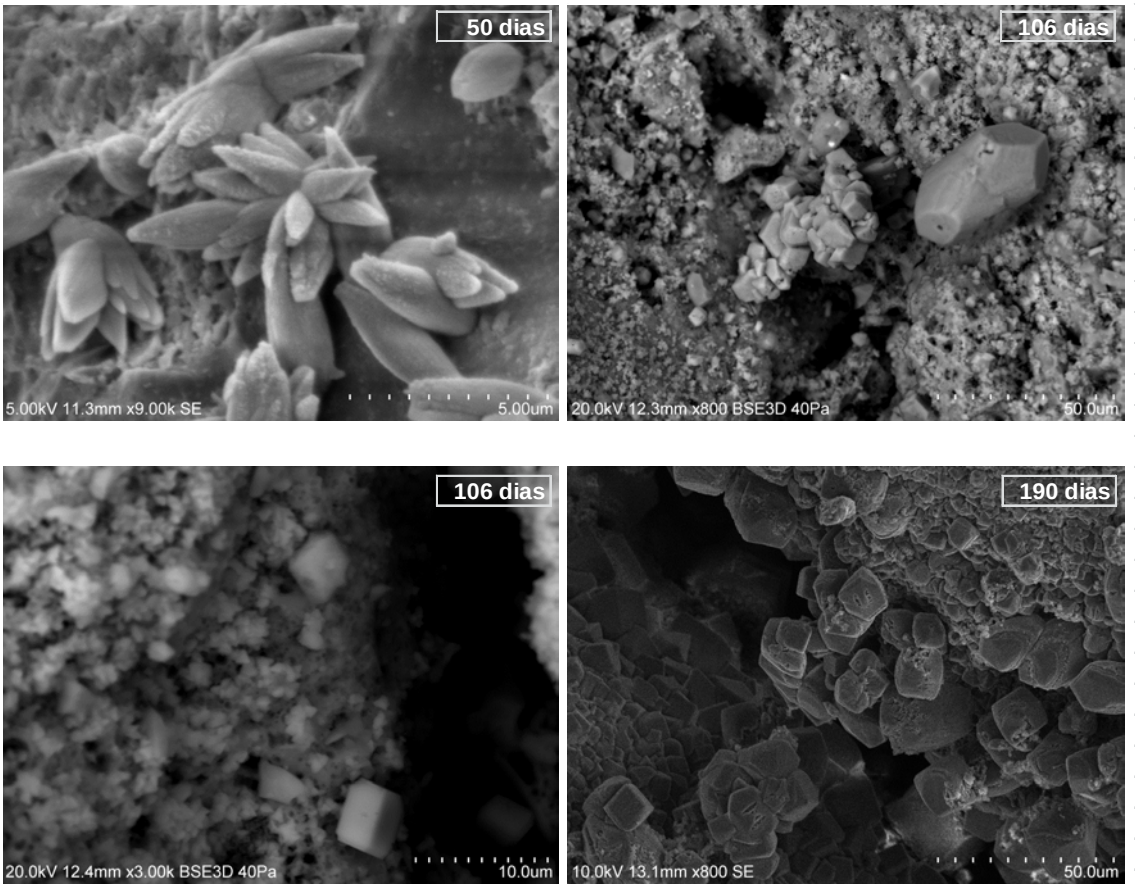
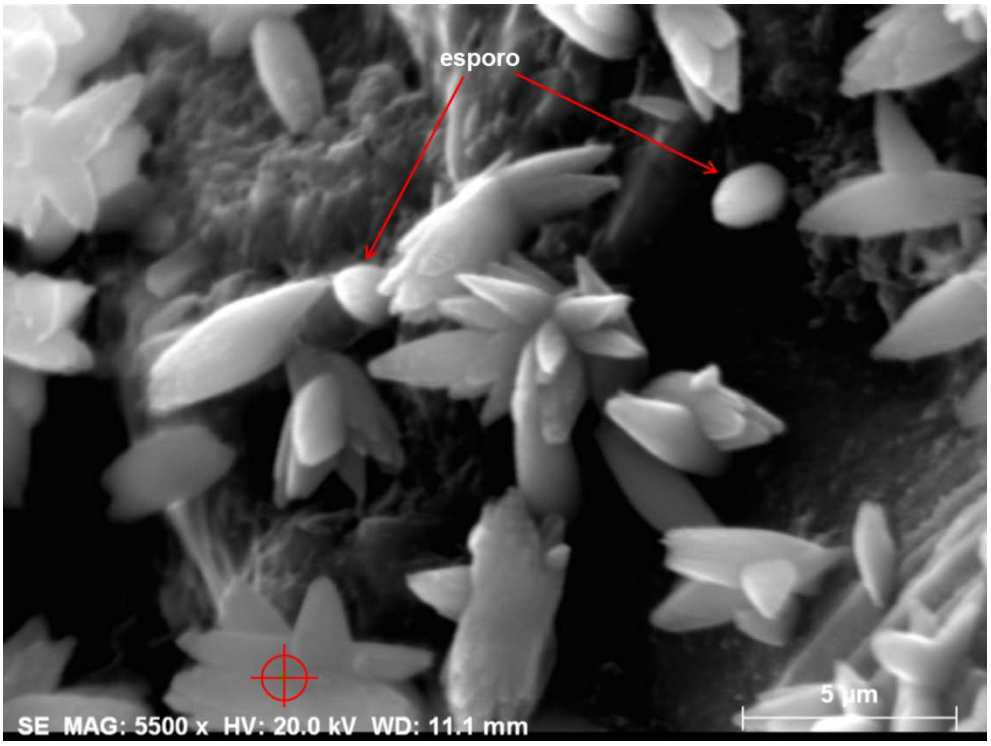


Figura 62 - Análise SEM às amostras BB aos 50, 106 e 190 dias de idade.

Como se pode ver na Fig. 62, foi detetado ao fim de 50 dias a presença de uma morfologia típica de aragonite com hábito prismático acicular, um bio mineral quimicamente idêntico à calcite. A partir dos 50 dias já não se conseguiram encontrar mais cristais de aragonite, apenas foram detetados cristais de calcite com distribuição homogénea nas amostras e com alguma sedimentação mineralógica. O aparecimento de aragonite só poderá ser devido à presença de bactéria, o que pode significar que mesmo sem o meio precursor, a bactéria é

capaz de produzir carbonato de cálcio. Por outro lado, a presença de calcite também pode estar associada à carbonatação do betão.



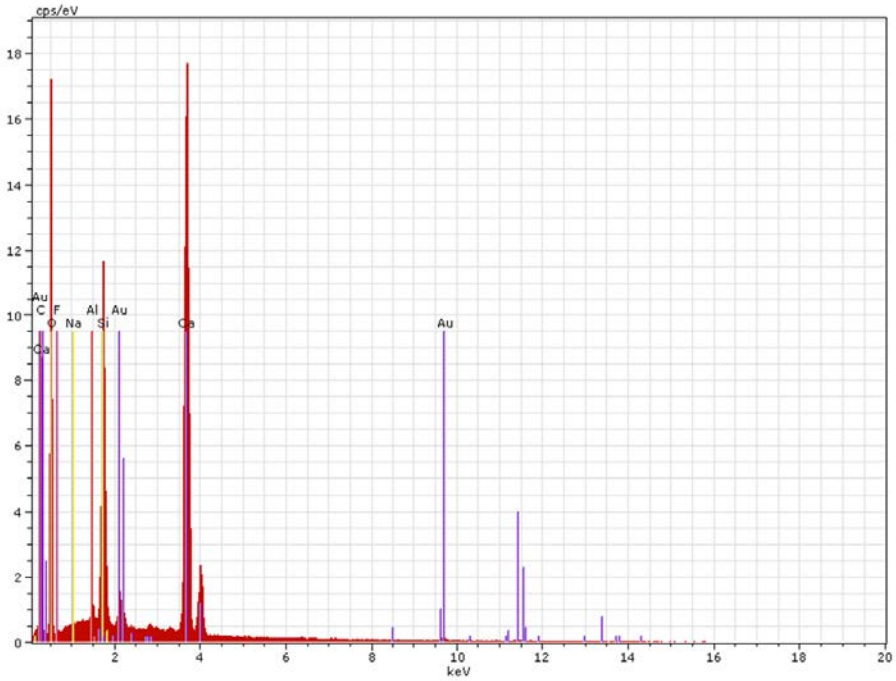


Figura 63 - SEM/EDS na amostra de betão BB aos 50 dias de idade identificando a presença de aragonite e de esporos bacterianos.

Os picos de Ca e O da Fig. 63 identificam a presença de carbonato de cálcio na amostra que, tendo em conta o seu hábito prismático e acicular verificado com o SEM indicam a presença de aragonite. O Au indica a presença de ouro devido à metalização das amostras. Os Si juntamente com Ca indicam a presença de C-S-H.

Nas análises de BBL1 obtiveram-se os seguintes resultados:

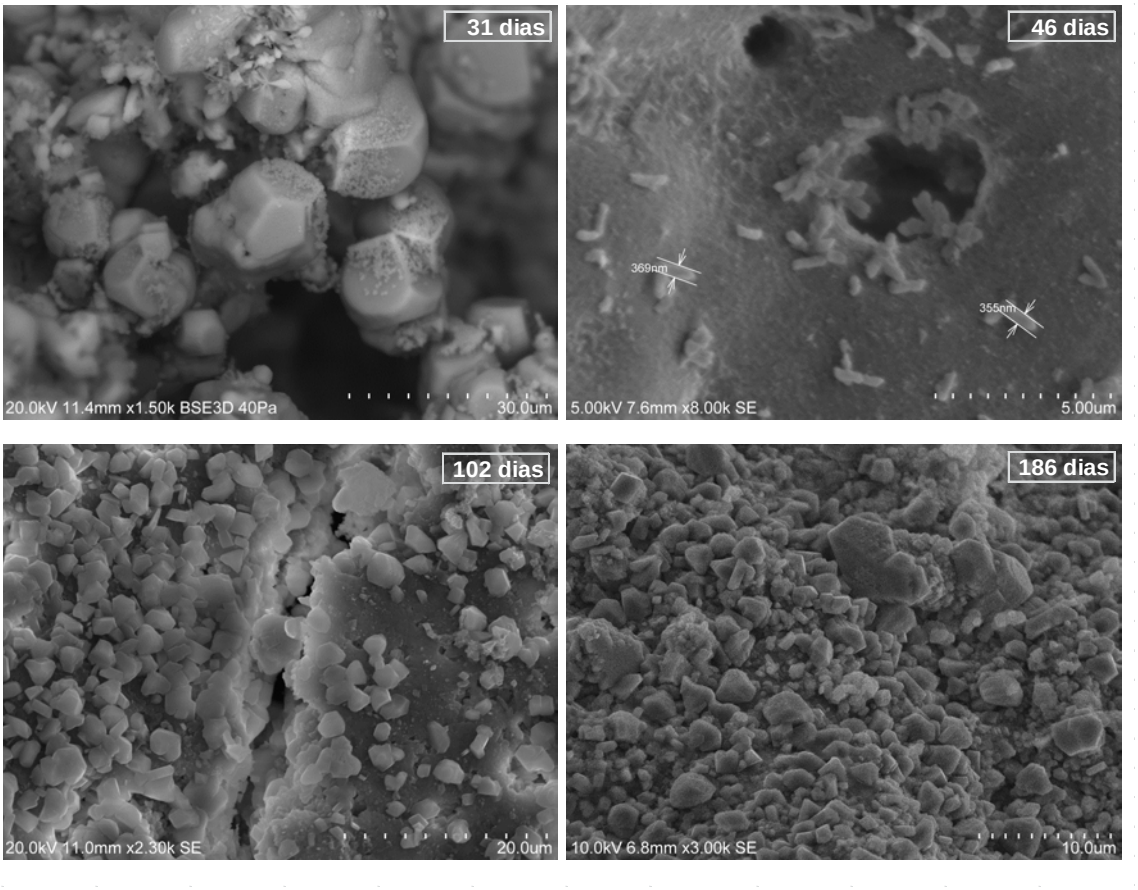


Figura 64 - Análise SEM às amostras BBL1 aos 31, 46, 102 e 186 dias de idade.

Como se pode ver na Fig. 64, é possível ver que houve a formação calcite desde a primeira análise, Imagem (a), (c), (d). A Imagem (c) prova que a mineralização ocorre ao nível interno nas fissuras induzidas. O comportamento do BBL1 não mostrou ser muito diferente do BB.

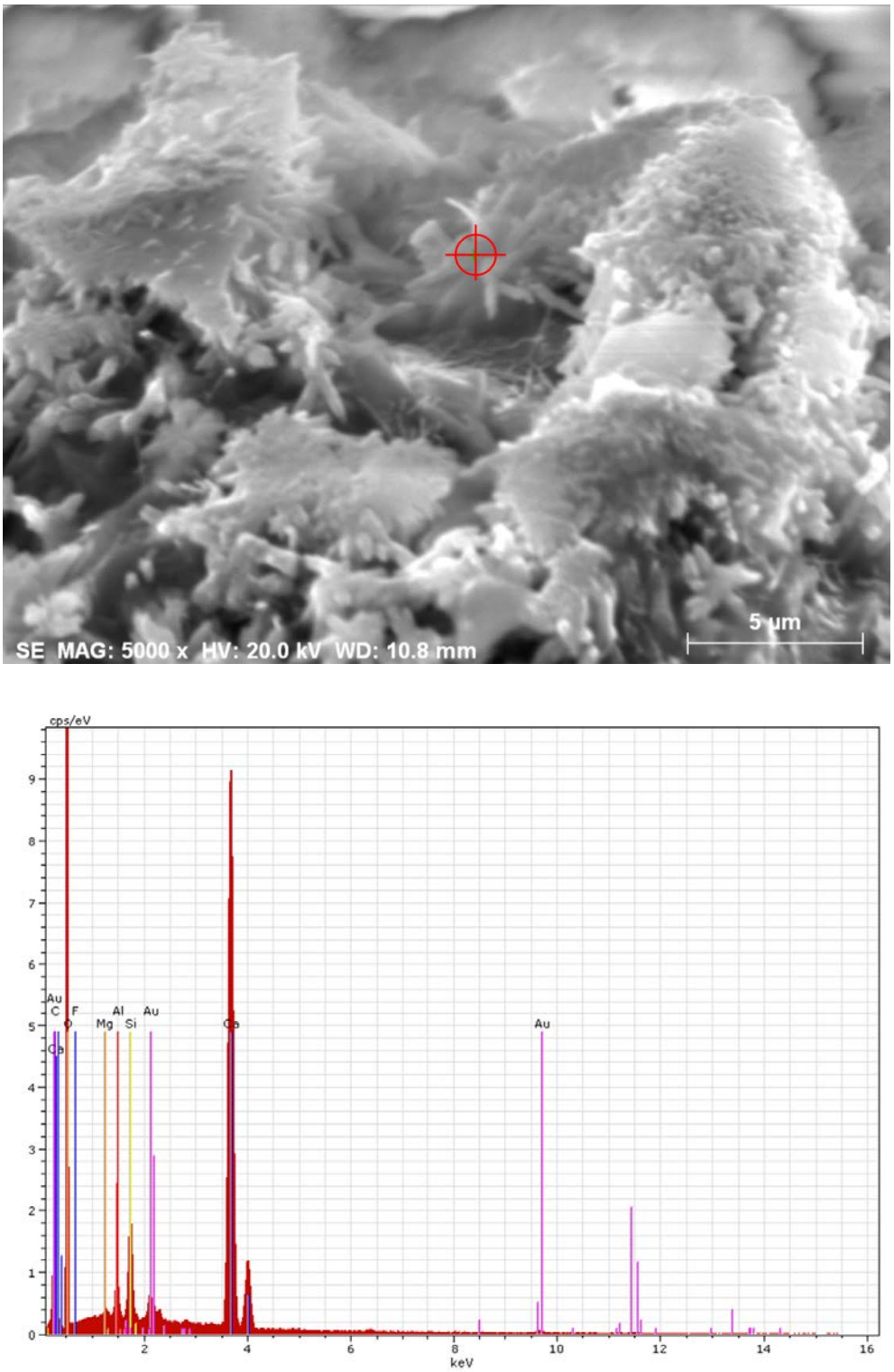


Figura 65 - SEM/EDS na amostra de betão BBL1 aos 46 dias de idade identificando a presença de cristais de hidróxido de cálcio na amostra.

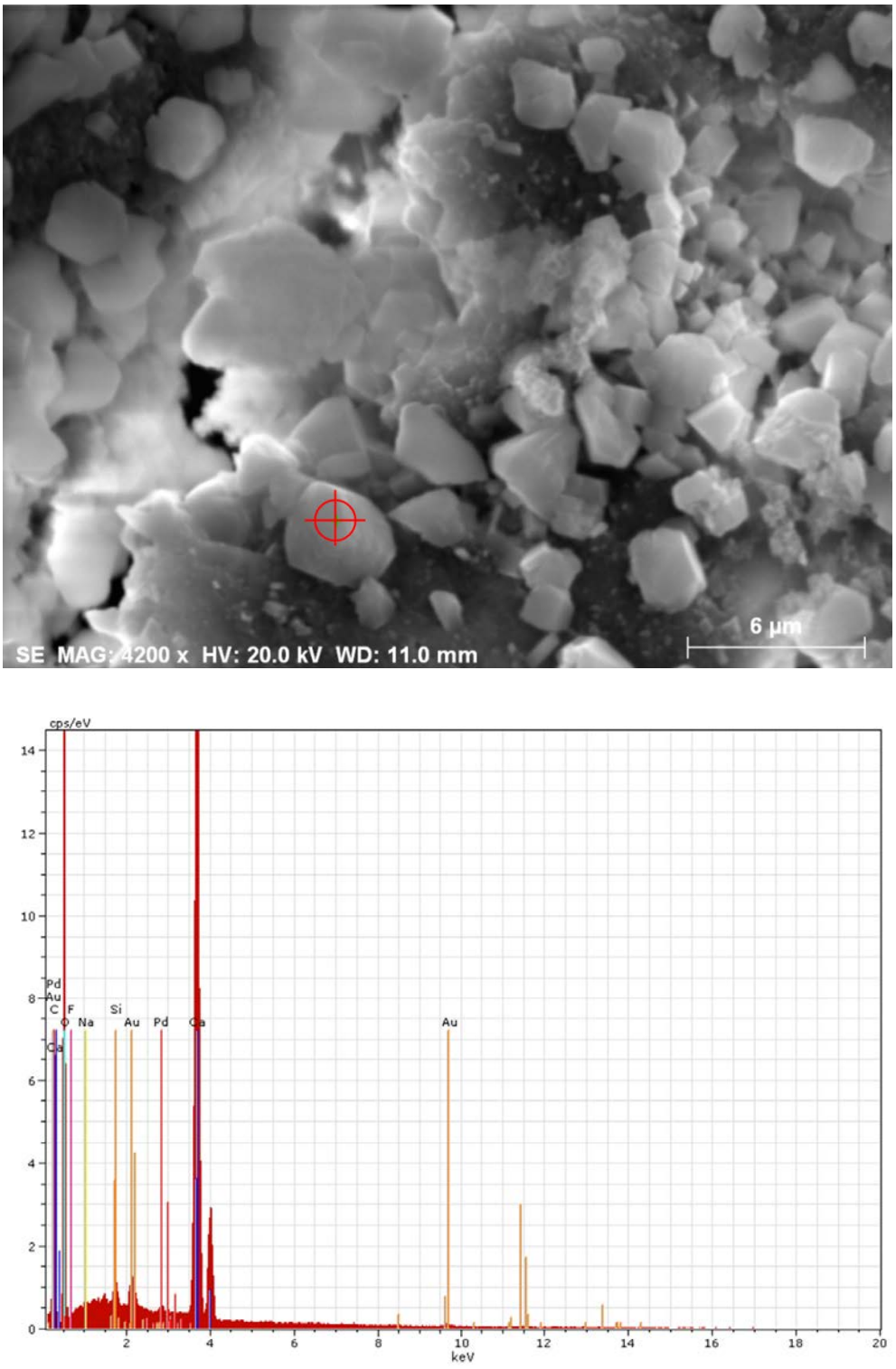
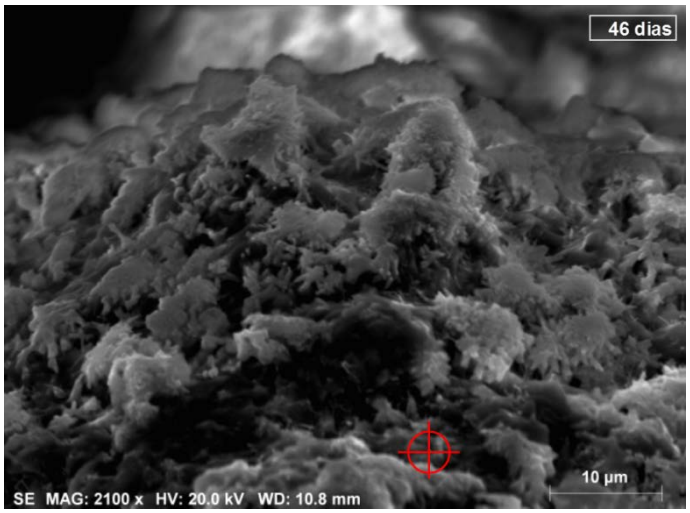


Figura 66 - SEM/EDS na amostra de betão BBl1 aos 102 dias de idade identificando a presença de cristais de calcite.

Os picos de Ca e O do EDS da Fig. 66 identificam a presença de carbonato de cálcio na amostra que, tendo em conta o seu hábito romboédrico indica a presença de calcite. O Au indica a presença de ouro devido à metalização das

amostras. Os Si juntamente com Ca indicam a presença de C-S-H. Apesar de não ser evidente nas imagens SEM a presença de bactéria nas amostras, o EDS da Fig. 67 mostra a sua presença através da presença de Azoto, elemento químico presente nos seres vivos.



Spectrum: Acquisition

El	AN	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]	K fact.	Z corr.	A corr.	F corr.
O	8	K-series	84.57	61.48	66.74	10.24	1.257	0.489	1.000	1.000
Ca	20	K-series	25.59	18.60	8.06	0.78	0.107	1.711	1.000	1.015
C	6	K-series	19.34	14.06	20.33	2.86	0.516	0.272	1.000	1.000
Si	14	K-series	3.56	2.59	1.60	0.18	0.017	1.548	1.000	1.007
N	7	K-series	2.81	2.04	2.54	0.84	0.046	0.446	1.000	1.000
Al	13	K-series	0.86	0.62	0.40	0.07	0.005	1.151	1.000	1.006
Mg	12	K-series	0.50	0.36	0.26	0.06	0.003	1.051	1.000	1.003
Fe	26	K-series	0.33	0.24	0.07	0.05	0.001	1.746	1.000	1.063
		Total:	137.57	100.00	100.00					

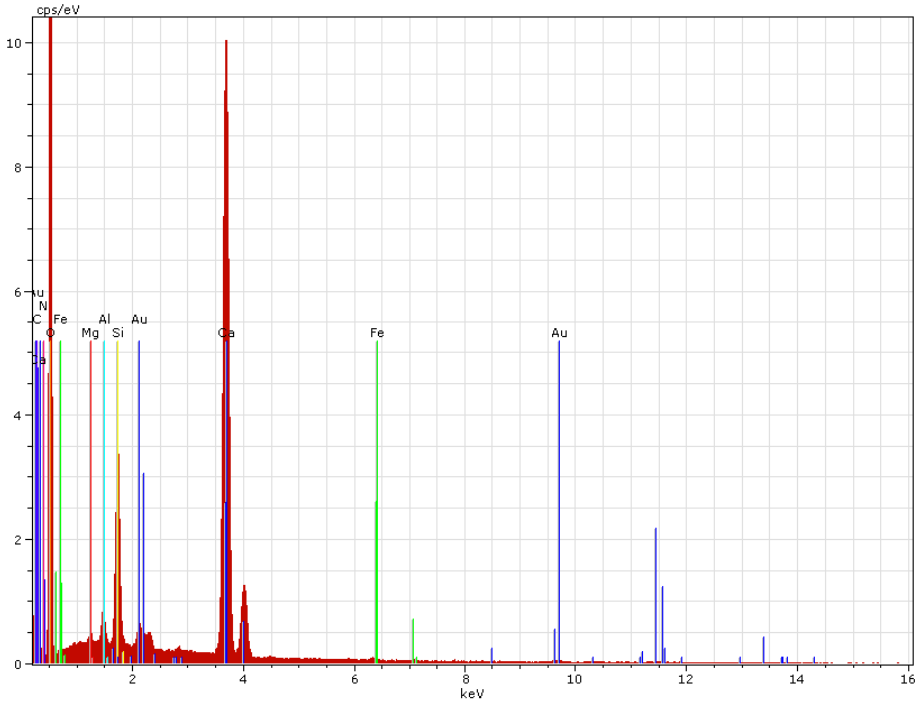


Figura 67 – Espetro de aquisição EDS na amostra BBL1 aos 46 dias de idade.

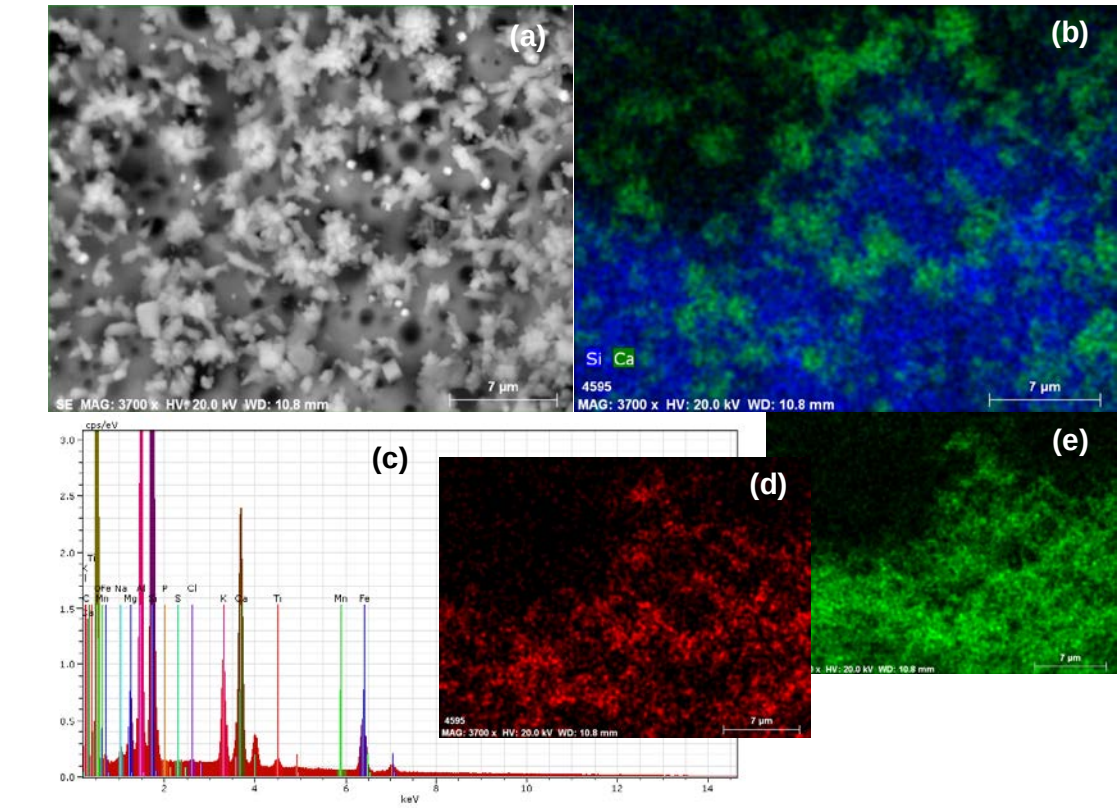


Figura 68 – (a):SEM/EDS aos 31 dias de idade. (b): micrografia da imagem (a) mostrando a distribuição de cálcio e sílica na amostra; (c): EDS da imagem (a); (d): micrografia da imagem (a) mostrando a distribuição de carbono na amostra; (e): micrografia da imagem (a) mostrando a distribuição de oxigénio na amostra.

Como se pode verificar na Fig. 68 a distribuição do elemento cálcio na amostra é bastante elevada, confirmando que os cristais formados são de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) e hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$).

Nas análises de BBL2 foram obtidos os seguintes resultados:

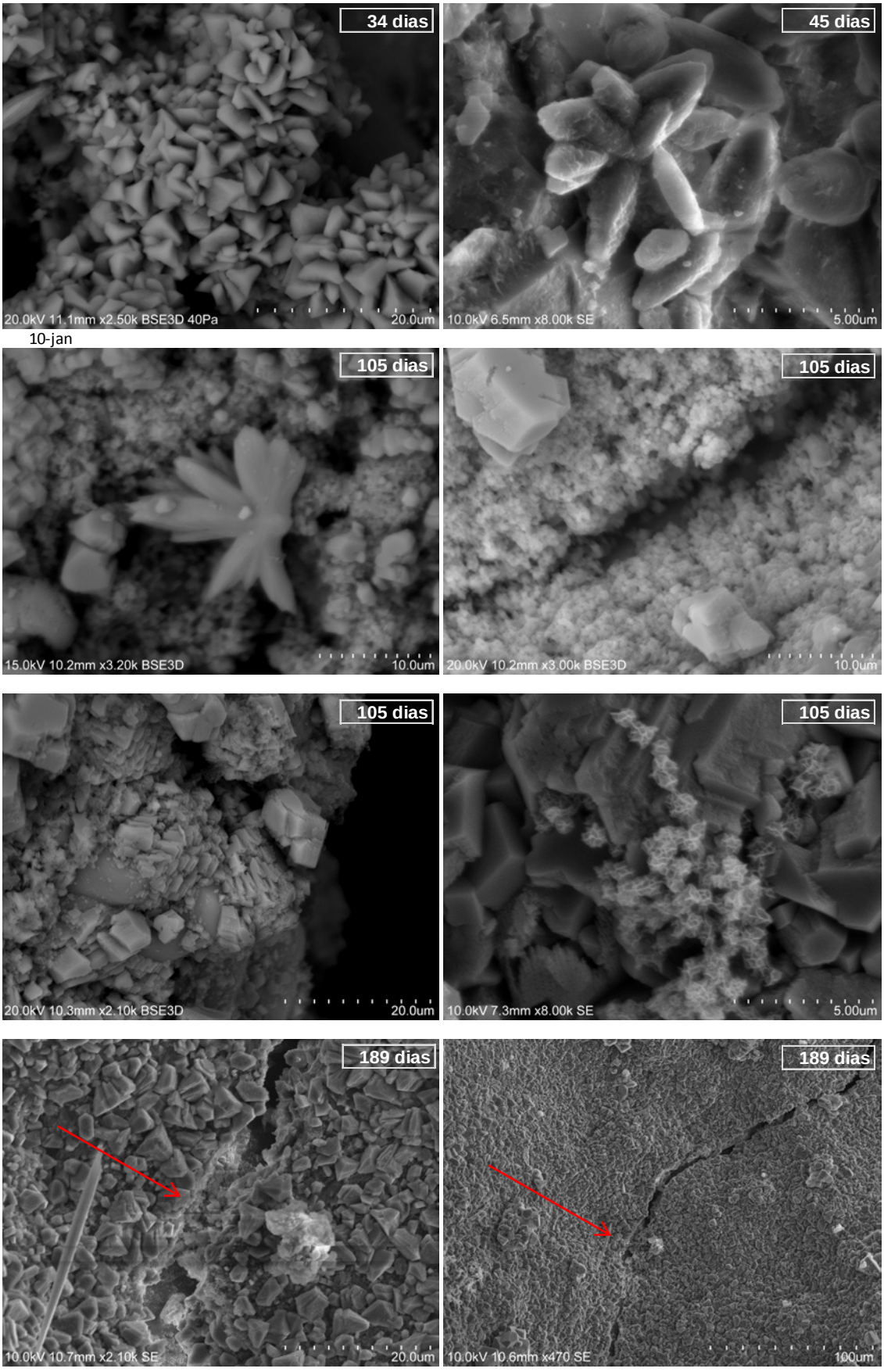


Figura 69 - Análise SEM às amostras BBL2 aos 34, 45, 105 e 189 dias de idade.

Como se pode ver na Fig. 69, o BBL2 é o que mostra a maior presença de aragonite. A presença de aragonite é sem qualquer dúvida devida à bactéria. Pode-se dizer que a introdução de bactéria e lactato de cálcio no mesmo agregado facilita as reações que levam à formação de carbonato de cálcio. A imagem (a) da Fig. 69 comprova a presença de calcite e hidróxido de cálcio (ver EDS da Fig. 70) na amostra aos 34 dias, o que nos indica que temos hidróxido de cálcio disponível para acontecer a reação dada na Reação 2. Na imagem (b) e (c) da Fig. 69 temos a prova da presença de aragonite nas amostras aos 45 e 105 dias, respetivamente, o que nos indica que existiu atividade bacteriana nas amostras e metabolização de carbonato de cálcio bio mineral. Na imagem (d), (g) e (h) estão ilustrados detalhes da mineralização ocorrida na fissura analisada com cristais, a qual apresenta morfologia típica de hidróxido de cálcio e carbonato de cálcio em forma de calcite. Na imagem (e) temos cristais de calcite com hábito bastante bem definido (romboédrico). Em (f) identificamos uma forma rendilhada que corresponde a C-S-H.

No EDS da Fig. 70 os picos de Ca e O indicam a presença de carbonato de cálcio, enquanto que os picos de Si juntamente com os de Ca indicam a presença de silicatos de cálcio.

No EDS da Fig.71 os picos de Ca e O indicam a presença de carbonato de cálcio, enquanto que os picos de Si juntamente com os de Ca indicam a presença de silicatos de cálcio.

No EDS da Fig.72 os picos de Si juntamente com os de Ca indicam a presença de silicatos de cálcio.

No EDS da Fig. 73 os picos de Ca juntamente com os de O identificam a presença de carbonato de cálcio na amostra que, tendo em conta o seu hábito prismático e acicular verificado com o SEM indicam a presença de aragonite. O Au indica a presença de ouro devido à metalização das amostras. Os Si juntamente com Ca indicam a presença de C-S-H.

Os picos de Ca e O do EDS da Fig. 74 identificam a presença de carbonato de cálcio na amostra que, tendo em conta o seu hábito romboédrico indica a

presença de calcite. O Au indica a presença de ouro devido à metalização das amostras. Os Si juntamente com Ca indicam a presença de C-S-H.

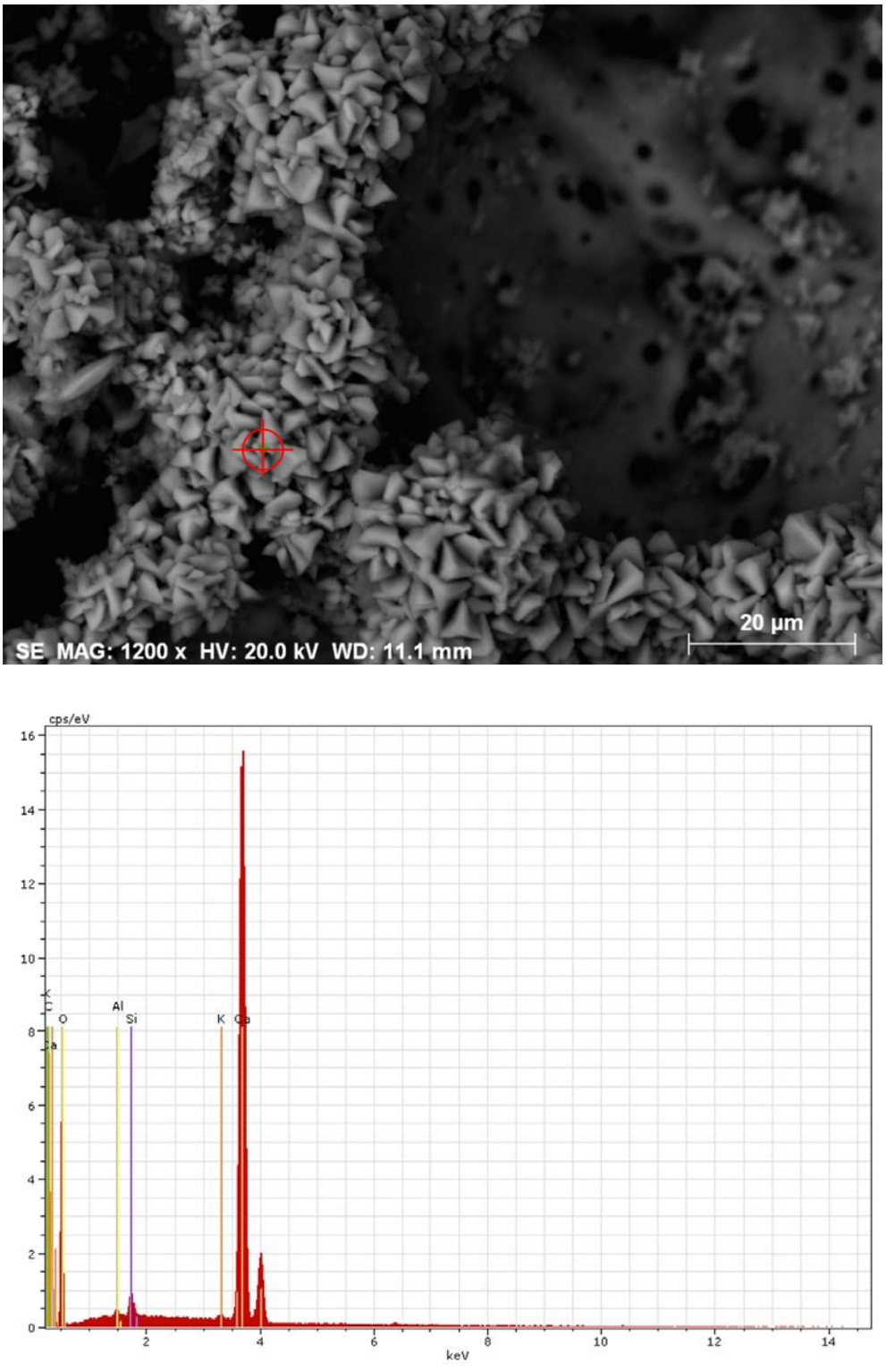


Figura 70 – SEM/EDS na amostra de betão BBL2 aos 34 dias de idade identificando a imagem (a) da Fig. 69.

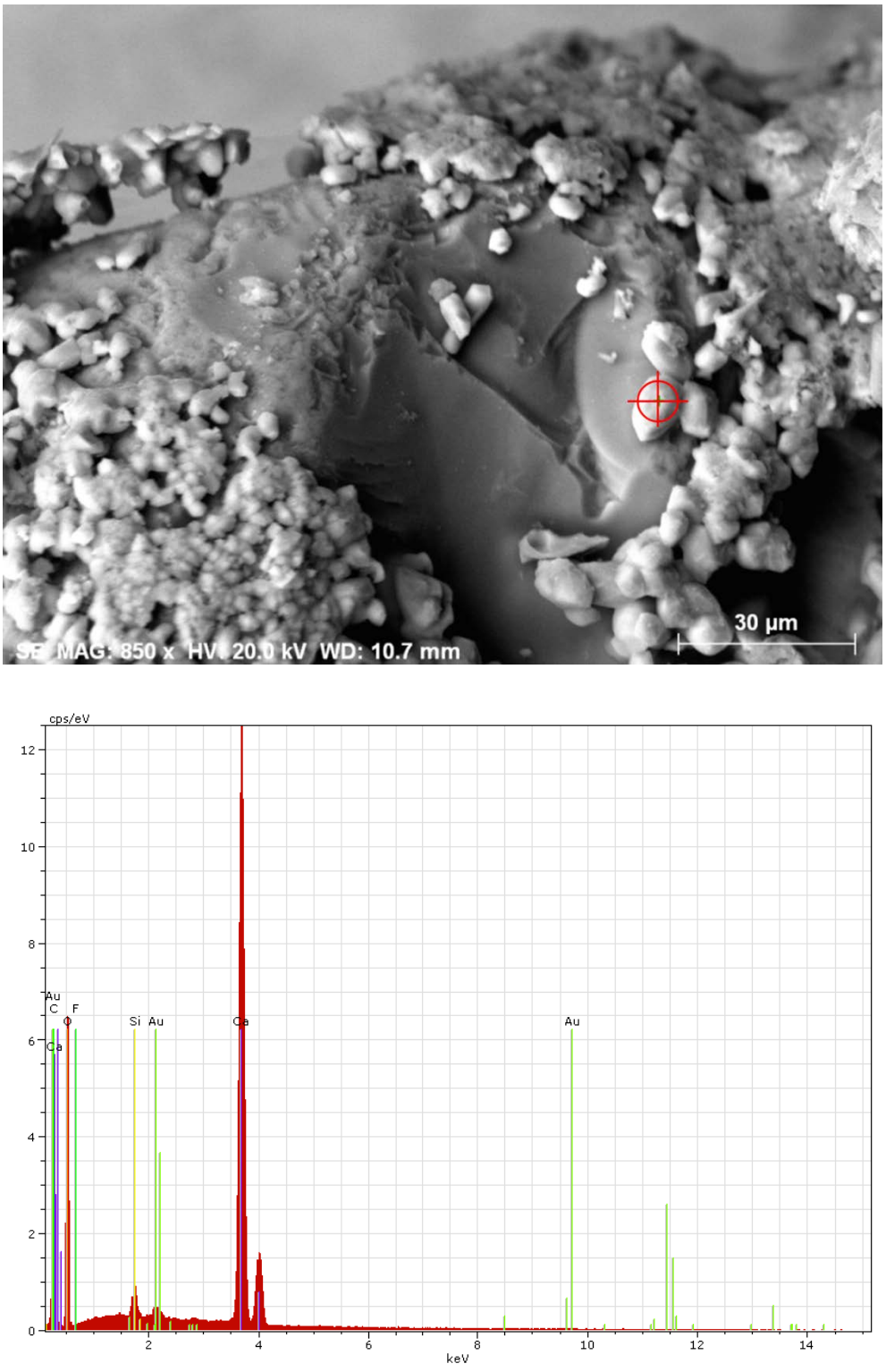


Figura 71 - SEM/EDS na amostra de betão BBL2 aos 45 dias de idade.

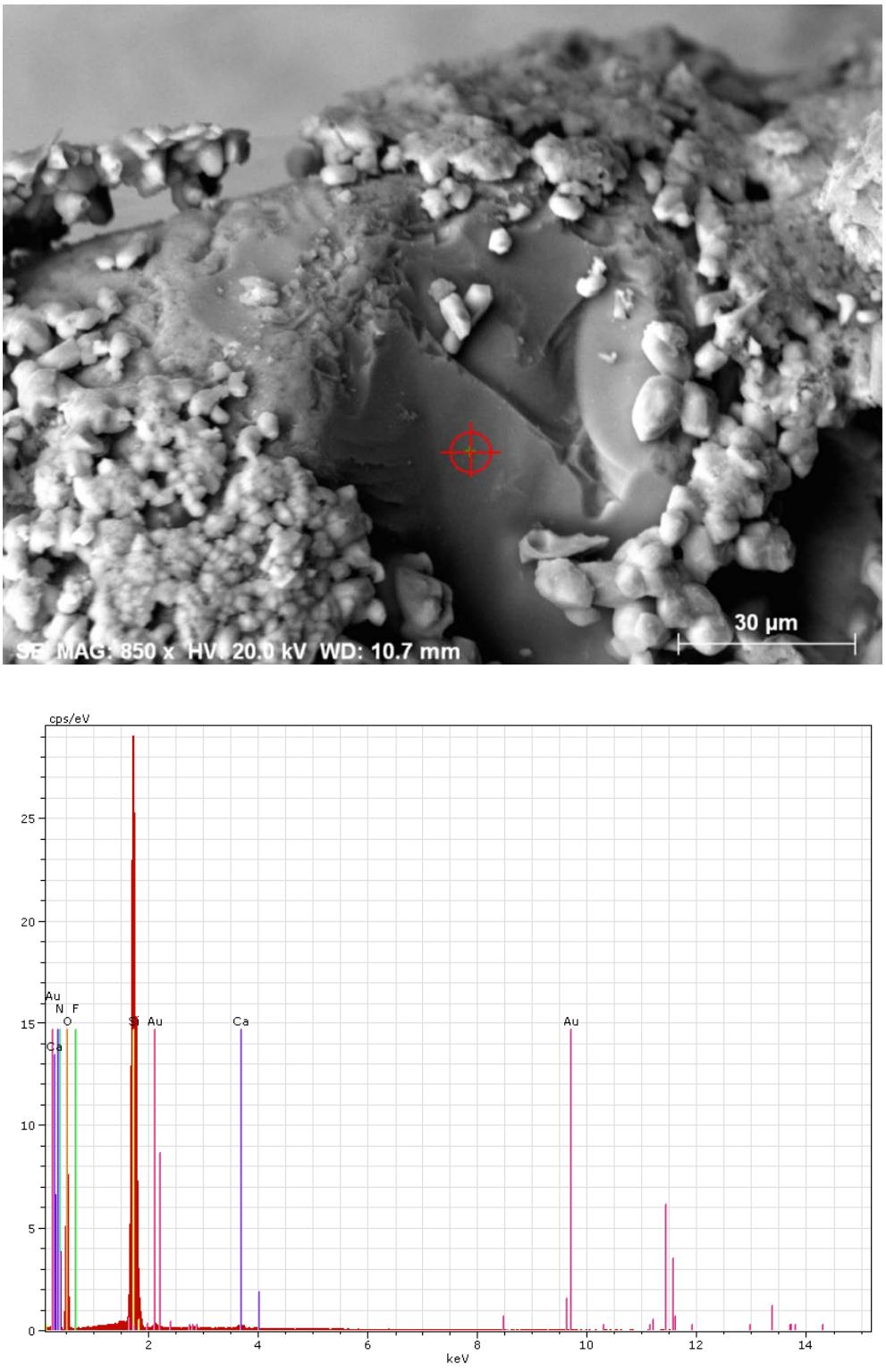


Figura 72 - SEM/EDS na amostra de betão BBL2 aos 45 dias de idade.

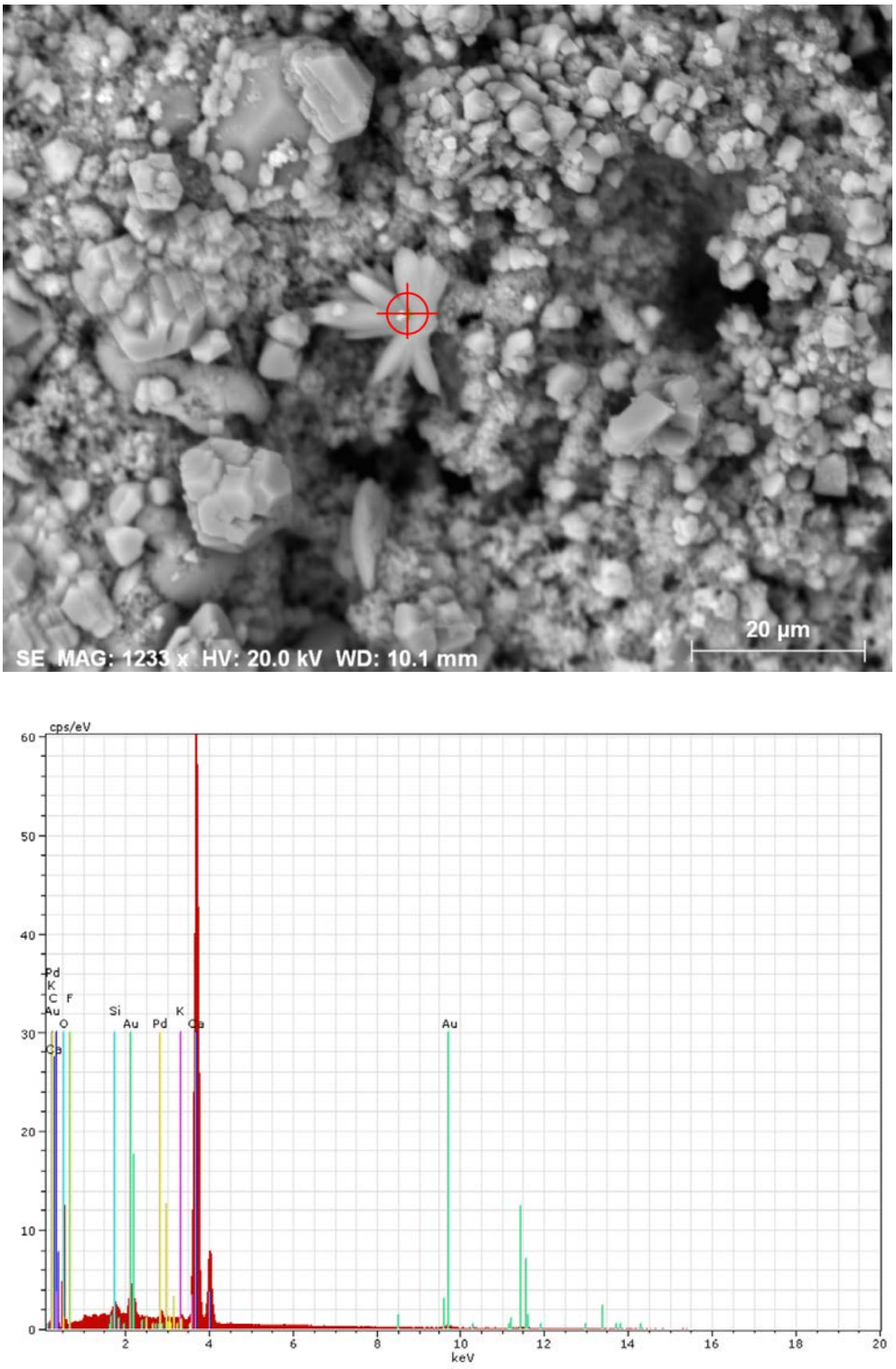


Figura 73 - SEM/EDS na amostra de betão BBL2 aos 105 dias de idade identificando a imagem (c) da Fig. 69.

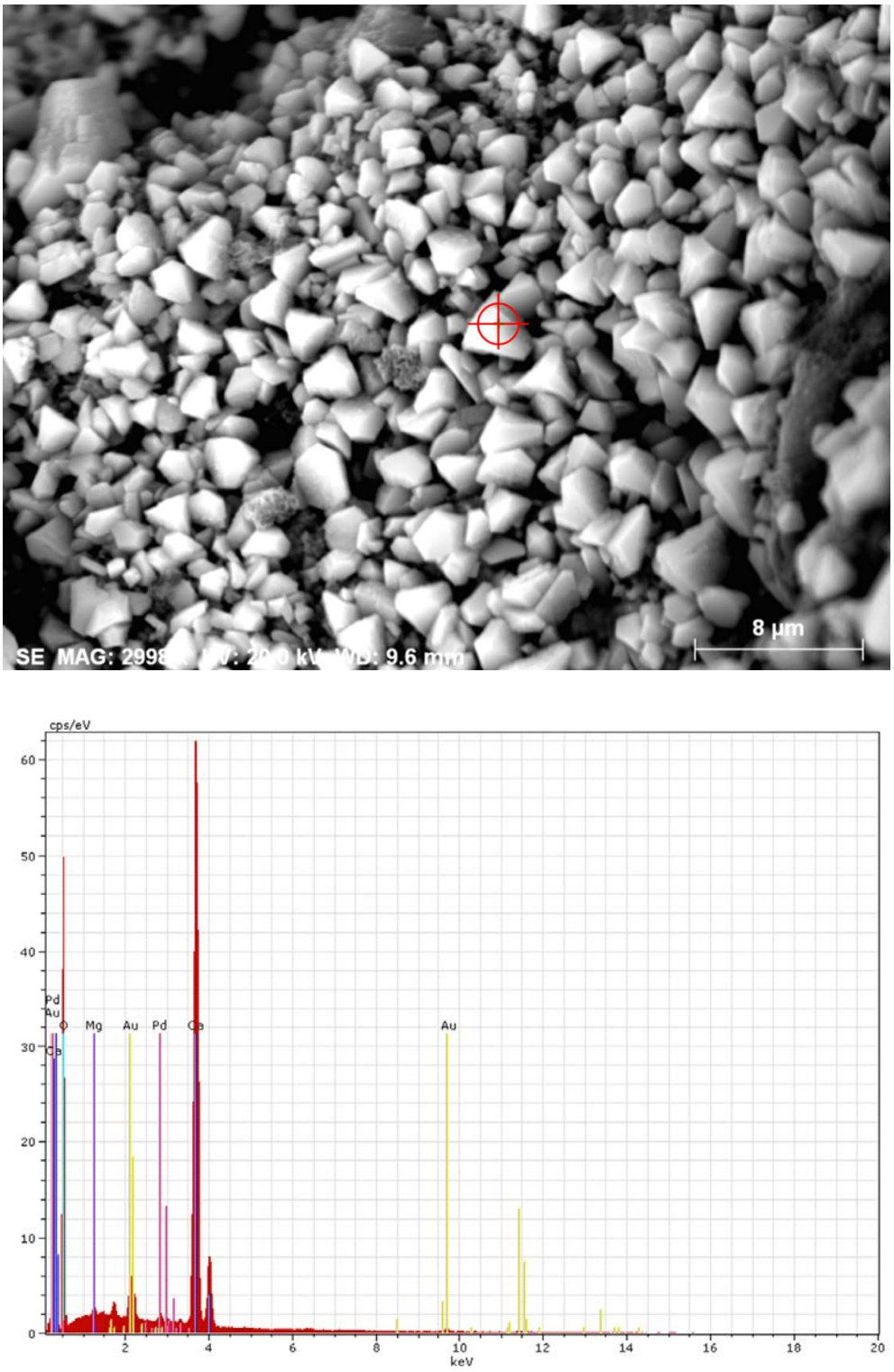


Figura 74 - SEM/EDS na amostra de betão BBL2 aos 105 dias de idade.

Na Fig. 75 temos a prova da sedimentação mineralógica na fissura (SEM). Os picos de Ca e de O indicam a presença de carbonato de cálcio em forma de

calcite, devido ao hábito romboédrico apresentado no SEM, e picos de Si e Ca provando a existência de silicatos de cálcio.

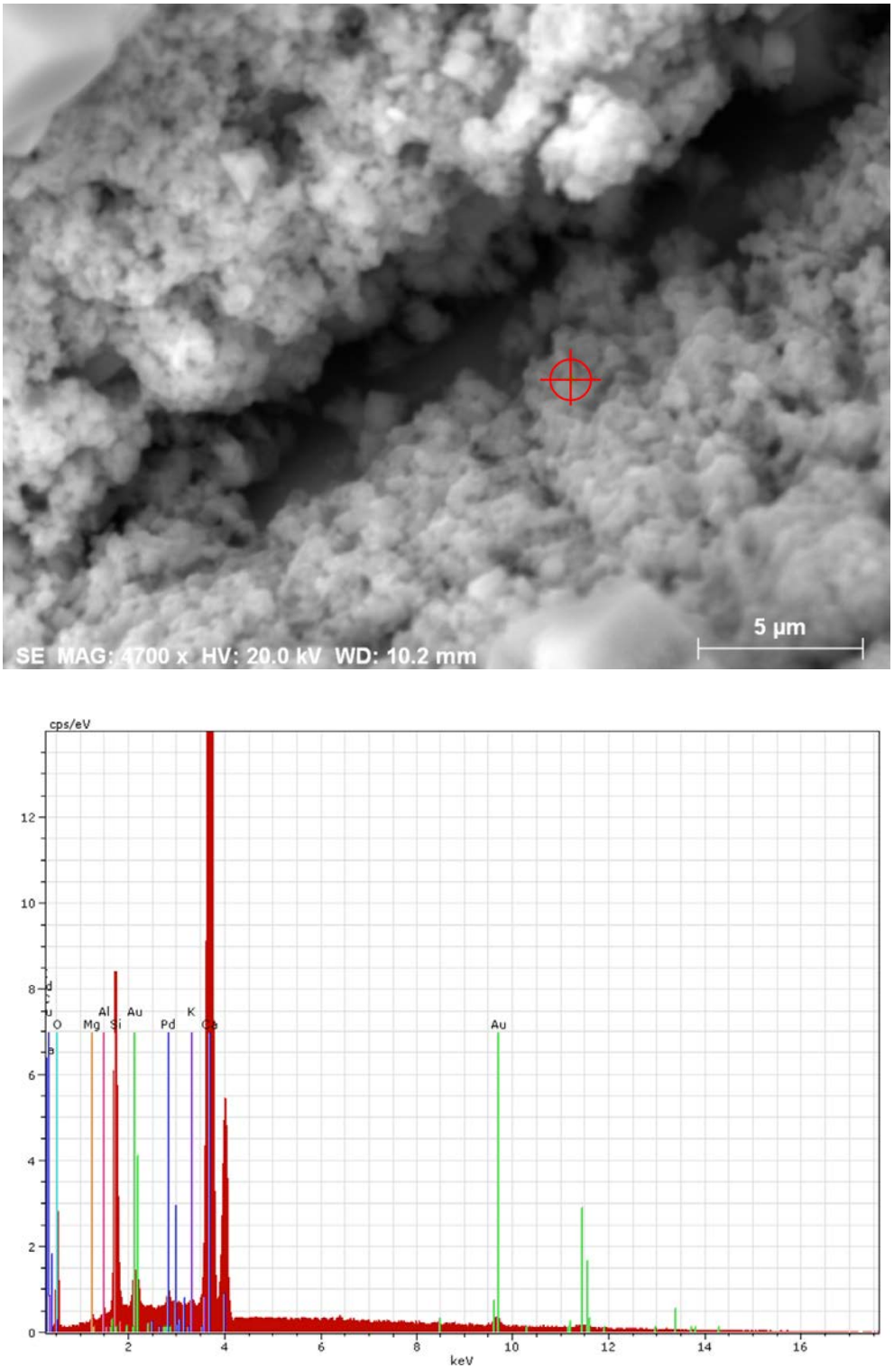


Figura 75 - SEM/EDS na amostra de betão BBL2 aos 105 dias de idade identificando a imagem (d) da Fig. 69.

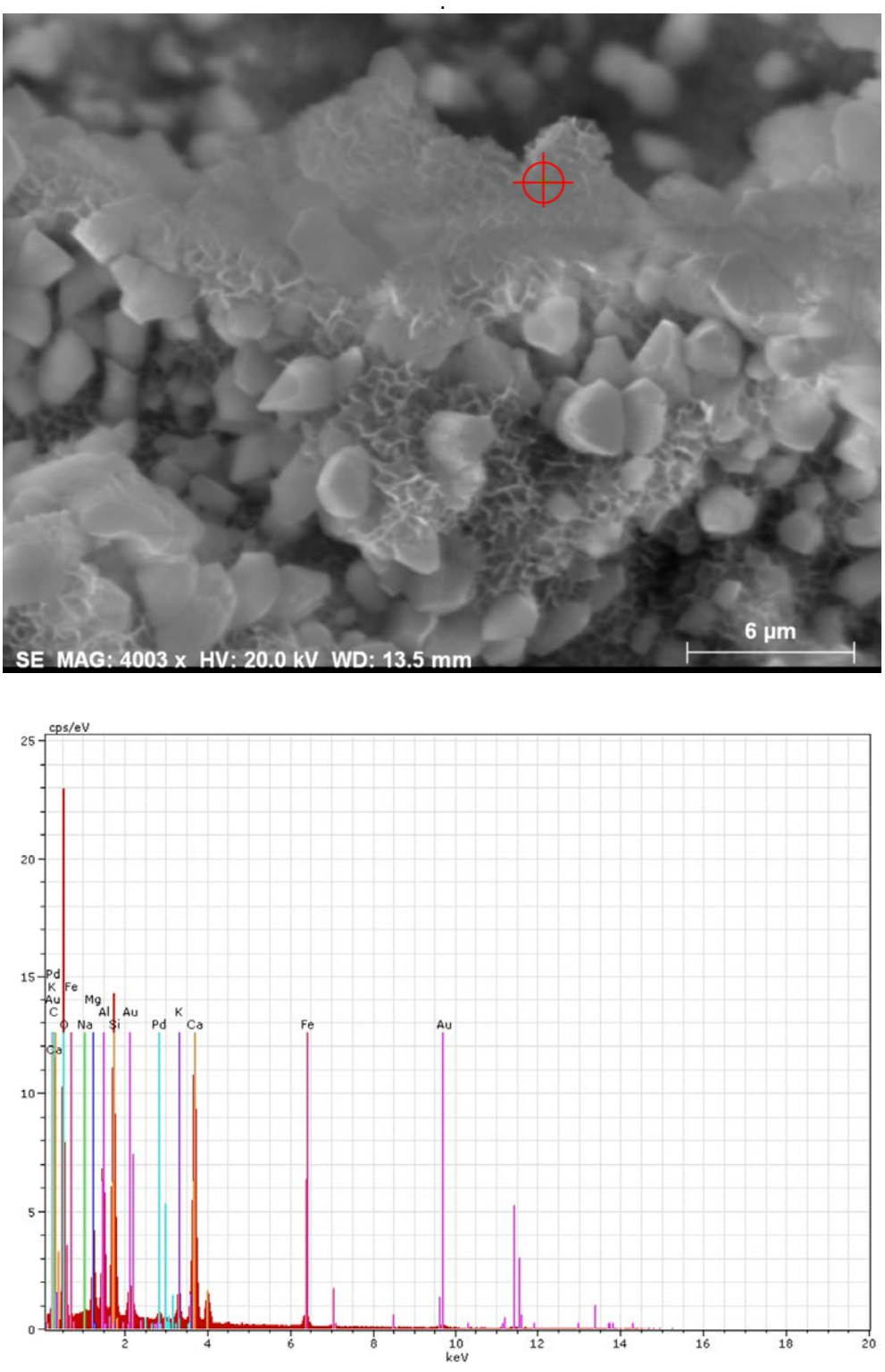


Figura 76 - SEM/EDS na amostra de betão BBL2 aos 105 dias de idade.

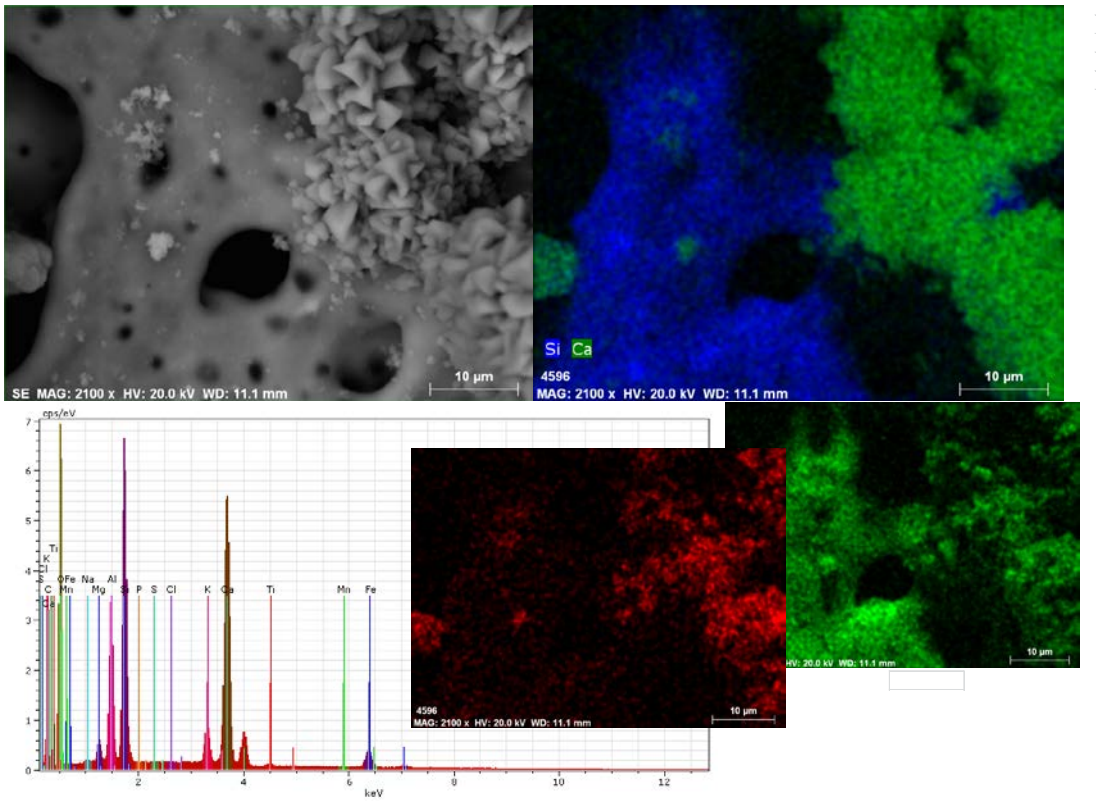


Figura 77 - SEM/EDS aos 35 dias de idade. (b): micrografia da imagem (a) mostrando a distribuição de cálcio e sílica na amostra; (c): EDS da imagem (a); (d): micrografia da imagem (a) mostrando a distribuição de carbono na amostra; (e): micrografia da imagem (a) mostrando a distribuição de oxigénio na amostra.

Na Fig. 76 a presença de um hábito rendilhado verificado no SEM, com picos de Si e Ca indicam a presença de C-S-H. Os picos de Ca, Fe e Al identificam a presença de aluminatos-ferratos tetracálcios na amostra. A presença de Au no EDS deve-se ao tipo de metalização da amostra.

Como podemos verificar na Fig. 77 a distribuição do elemento cálcio na amostra é bastante elevada, confirmando que os cristais formados são de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) e hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$).

Seguem abaixo imagens SEM das várias amostras ao longo do tempo (Fig. 78-82):

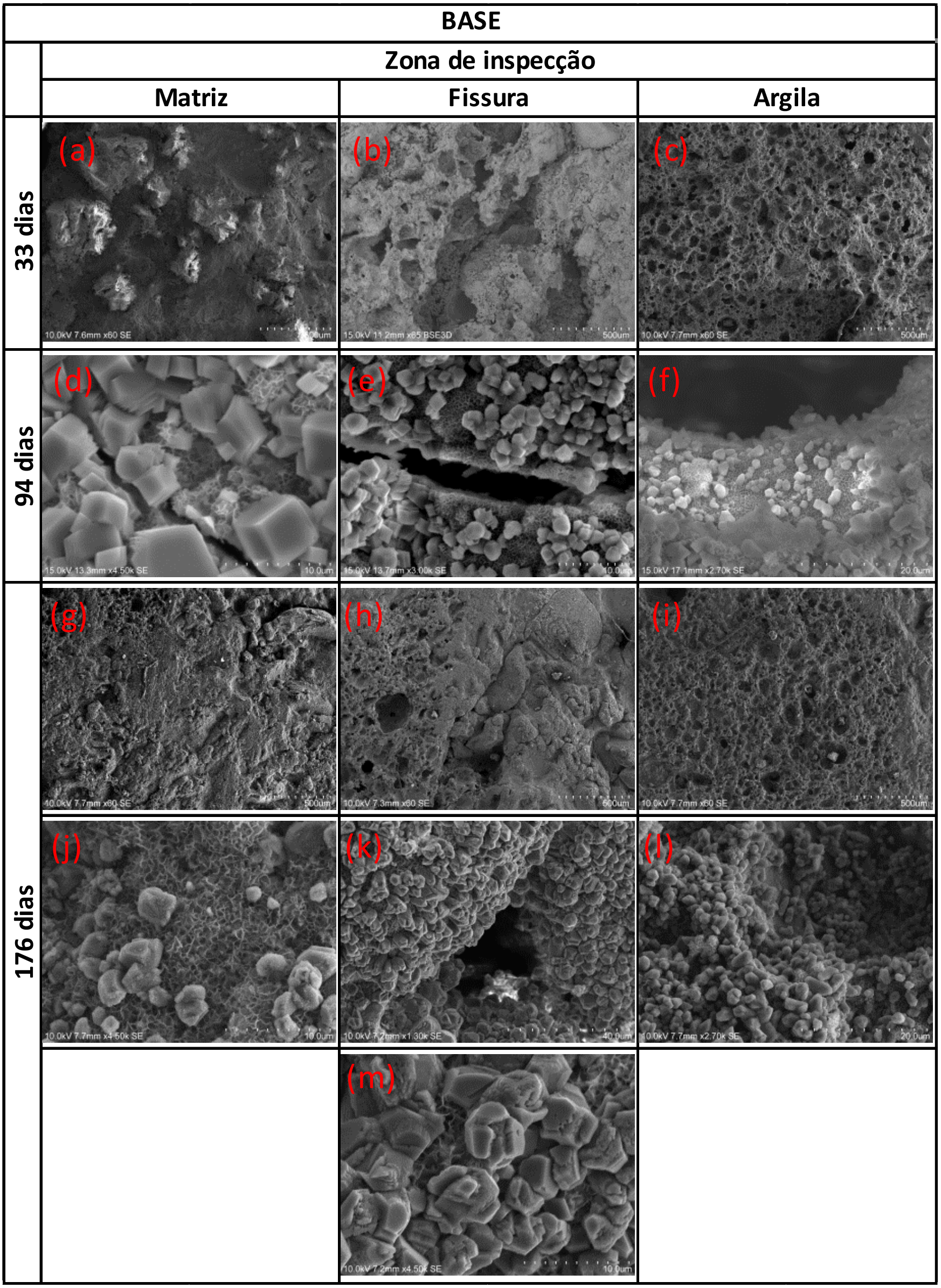


Figura 78 – Micrografia SEM na amostra Base aos 33, 94 e 176 dias. (a):matriz; (b):fissura; (c):argila; (d): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite (romboédrico) e silicatos de cálcio hidratados (rede) na matriz; (e): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite (romboédrico) e silicatos de cálcio hidratados (rede) na fissura; (f): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite (romboédrico) e silicatos de cálcio hidratados (rede) na argila; (g):matriz; (h):fissura; (i):argila; (j): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite (romboédrico) e silicatos de cálcio hidratados (rede) na matriz; (k): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite (romboédrico) e silicatos de cálcio hidratados (rede) na fissura; (l): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite (romboédrico) e silicatos de cálcio hidratados (rede) na argila; (m): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite (romboédrico) e hidróxido de cálcio na fissura.

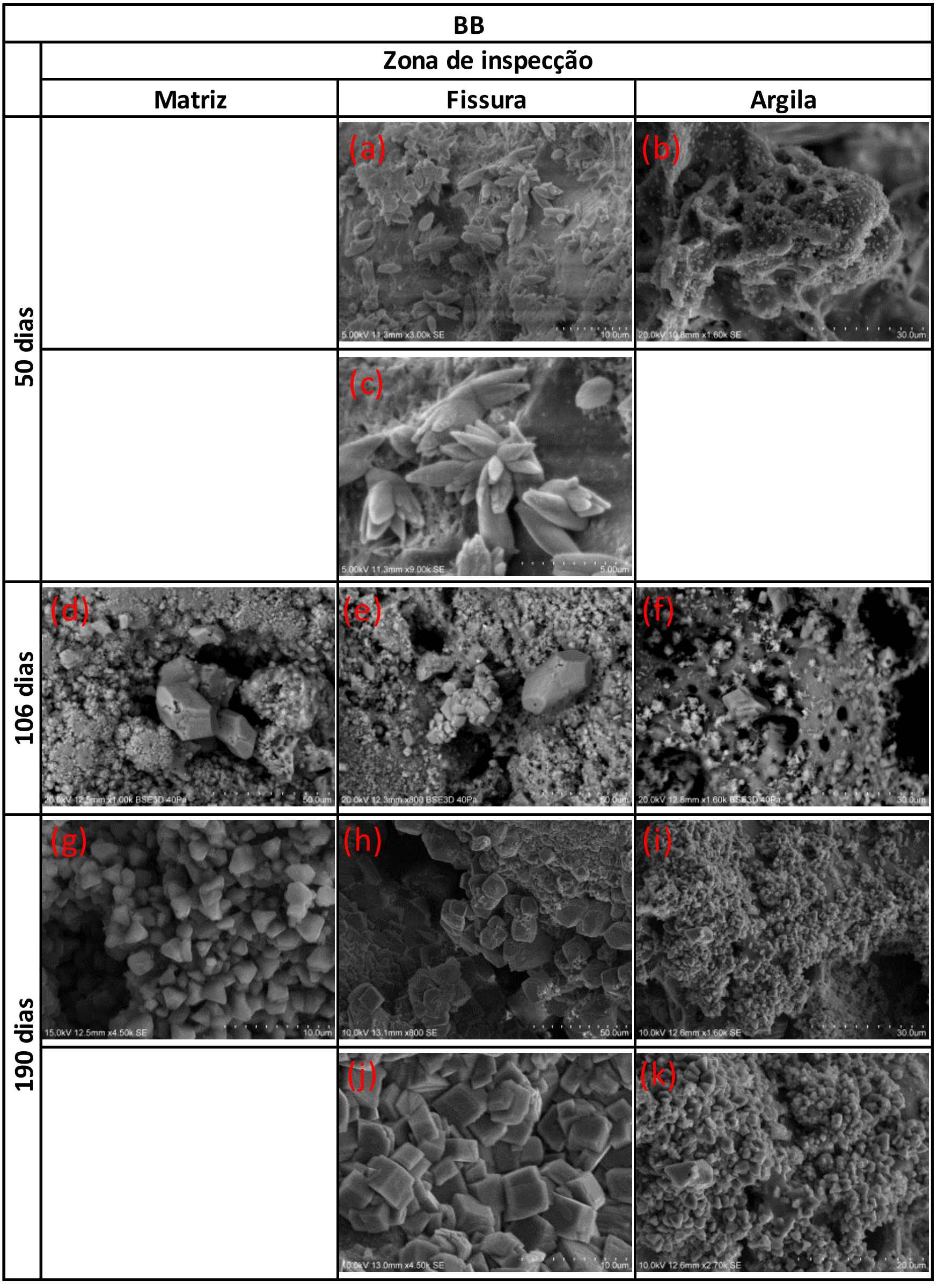


Figura 79 - Micrografia SEM na amostra BB aos 50, 106 e 190 dias. (a): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de aragonite (prismático, acicular) na fissura; (b): micrografia da argila com cristais de hidróxido de cálcio; (c): identificação de carbonato de cálcio com hábito típico de aragonite (prismático, acicular) na fissura (ampliação de (a)); (d): presença de carbonato de cálcio com hábito característico de calcite na matriz do betão; (e): presença de carbonato de cálcio com hábito característico de calcite na fissura; (f): Identificação de cristais de hidróxido de cálcio (portlandita) e carbonato de cálcio (calcite) na argila; (g): sedimentação de calcite na matriz do betão; (h): sedimentação de calcite na fissura; (i): sedimentação de calcite e portlandita na argila; (j): ampliação de (h); (k): ampliação de (i).

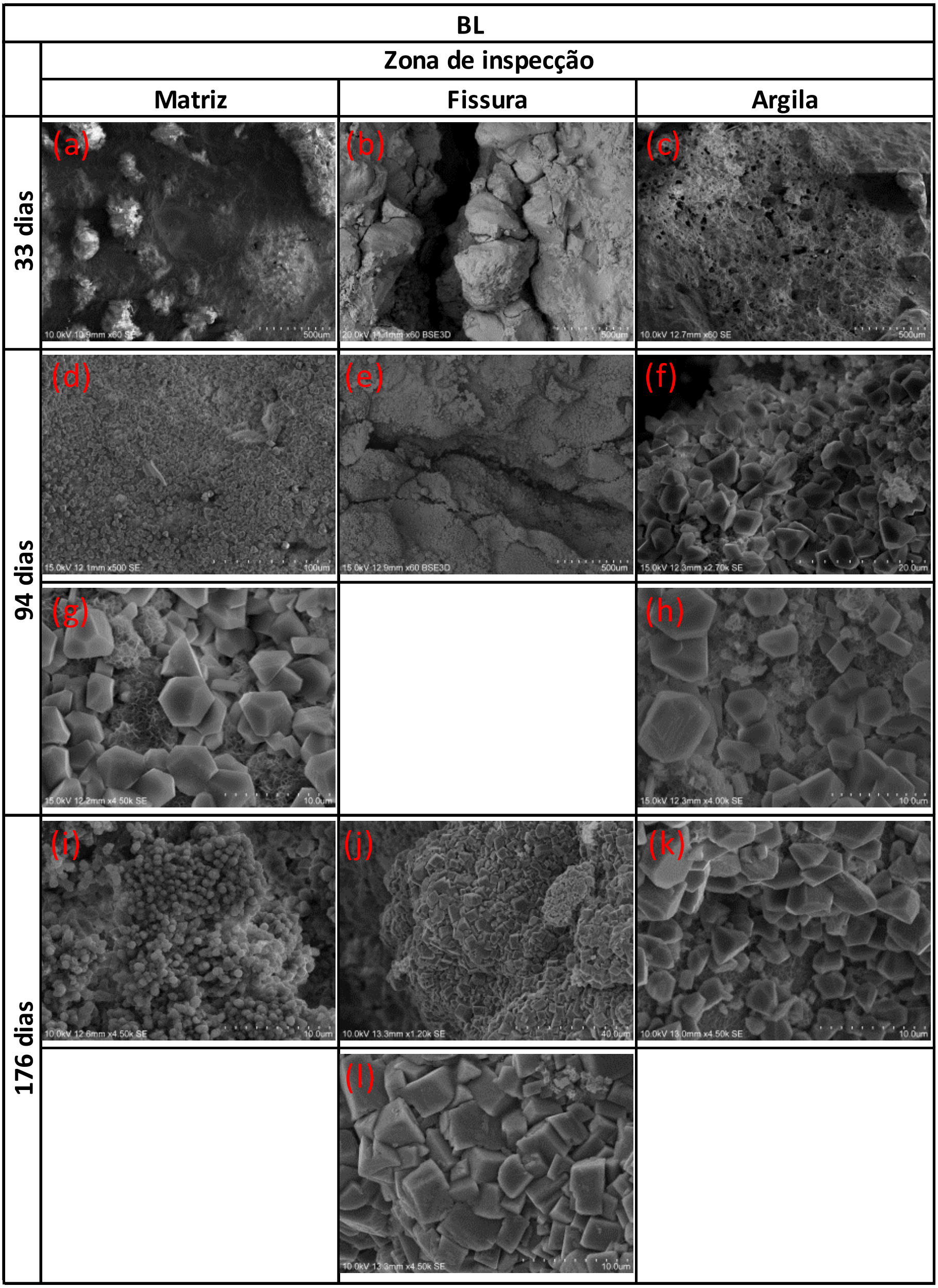


Figura 80 - Micrografia SEM na amostra BL aos 33, 94 e 176 dias. (a):matriz; (b):fissura; (c):argila; (d): matriz; (e): fissura; (f): micrografia da argila com cristais de carbonato de cálcio (calcite) e hidróxido de cálcio (portlandita); (g): ampliação de (d) identificando a presença de carbonato de cálcio com hábito típico de calcite e silicatos de cálcio hidratados; (h): ampliação de (f) identificando a presença de calcite e C-S-H; (i): microesferas de vaterite (j): sedimentação de calcite e portlandita na fissura; (k): sedimentação de calcite e portlandita na argila; (l): ampliação de (j).

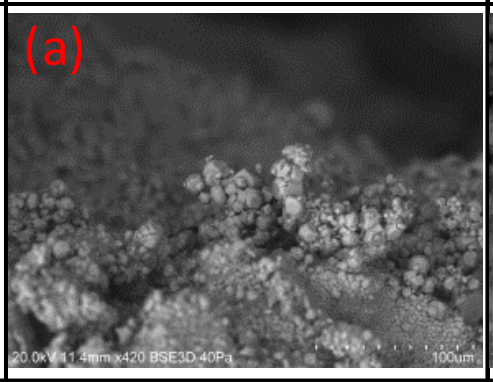
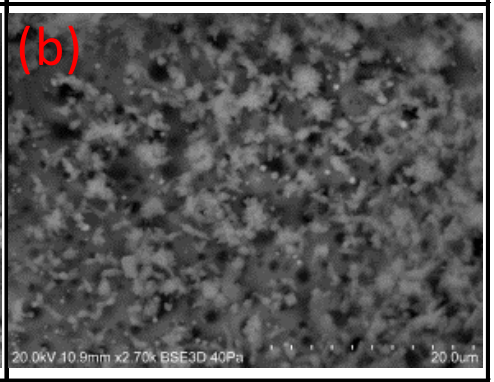
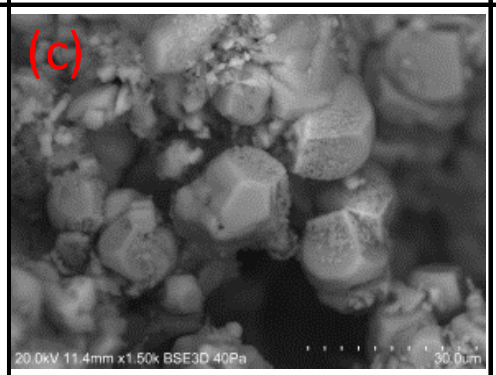
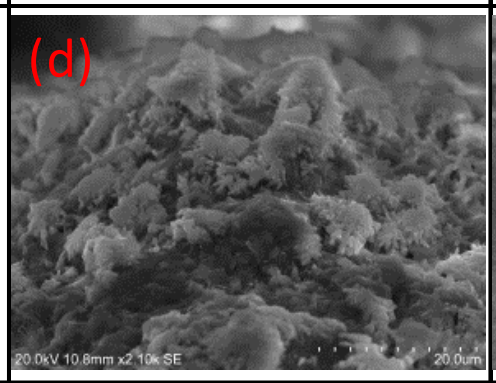
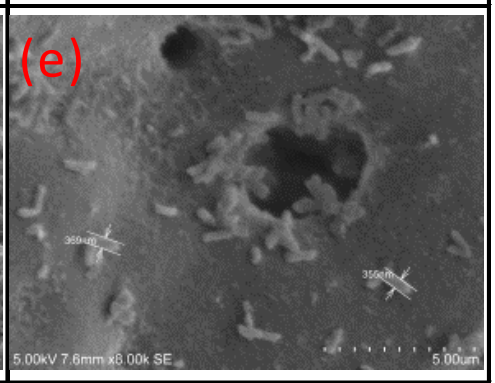
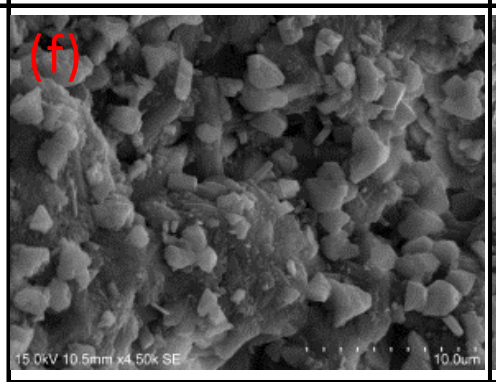
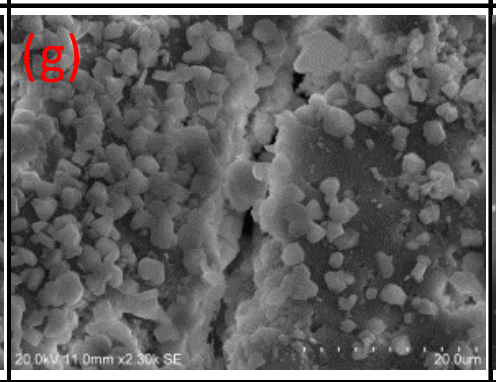
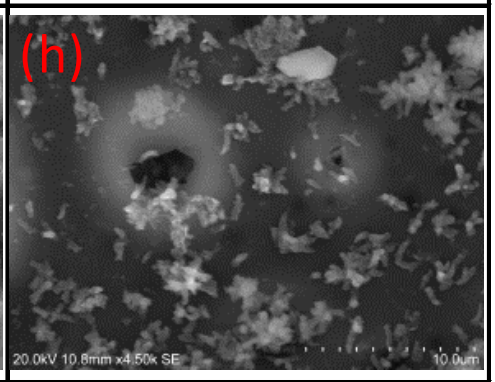
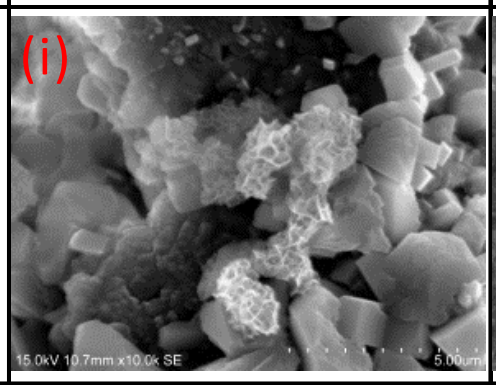
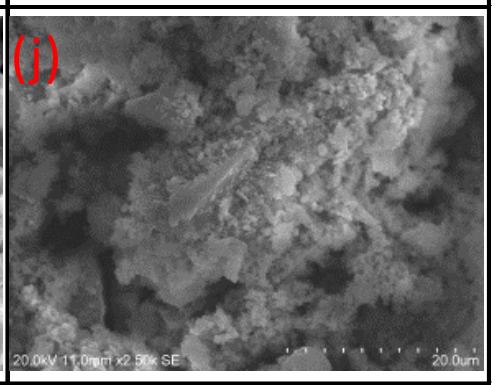
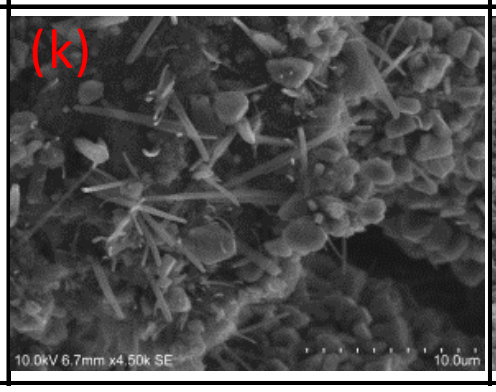
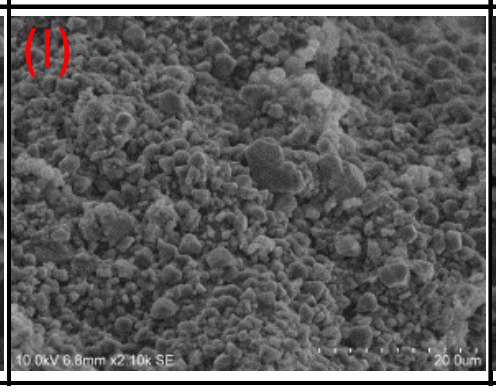
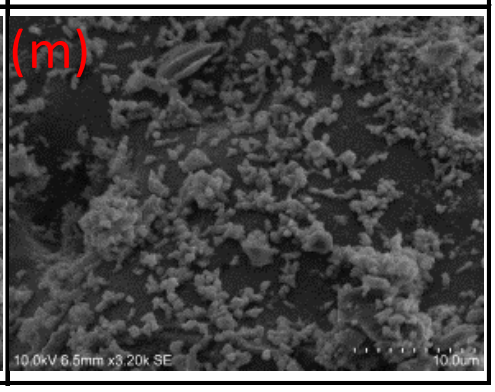
BBL1			
	Zona de inspecção		
	Matriz	Fissura	Argila
31 dias			
			
46 dias			
102 dias			
			
186 dias			

Figura 81 - Micrografia SEM na amostra BBL1 aos 31, 46, 102 e 186 dias. (a):identificação de calcite na fissura; (b):identificação de portlandita na argila; (c): ampliação de (a) identificando hábito típico de calcite (romboédrico); (d): sedimentação de hidróxido de cálcio na zona da fissura; (e): prováveis células vegetativas *Bacillus cohnii*; (f) identificação de calcite) e portlandita na matriz; (g): sedimentação de calcite na fissura; (h): hidróxido de cálcio; (i): ampliação de (g) permitindo também a identificação de C-S-H; (j): sedimentação de hidróxido de cálcio na argila; (k): identificação de calcite, portlandita e etringita; (l): mineralização intensa na fissura; (m): mineralização heterogénea na argila.

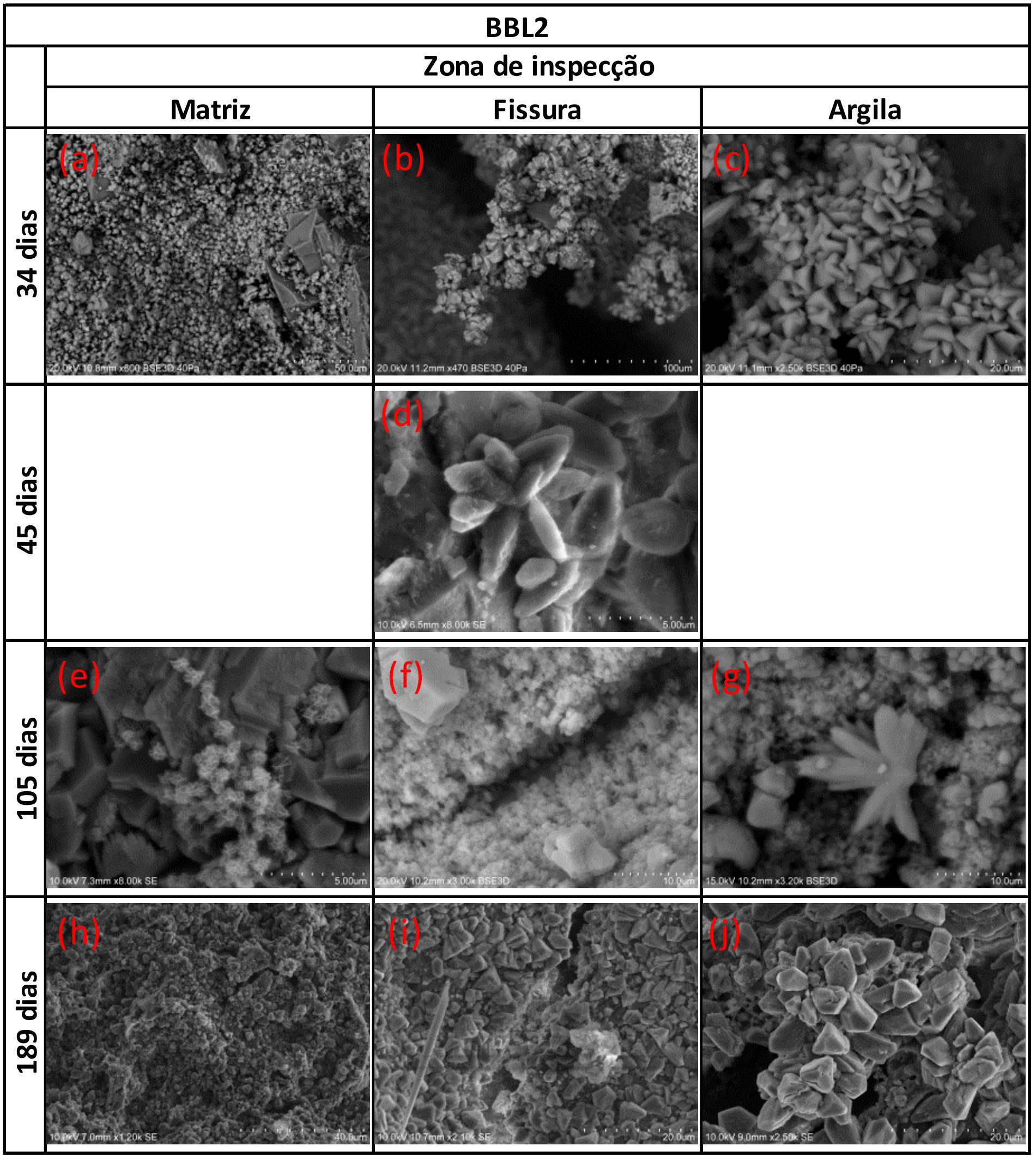


Figura 82 - Micrografia SEM na amostra BBL2 aos 34, 45, 105 e 189 dias. (a):calcite presente na matriz; (b):sedimentação de calcite na fissura; (c): sedimentação de hidróxido de cálcio (portlandita) na argila; (d): identificação de aragonite na amostra; (e): identificação de C-S-H na matriz do betão juntamente com calcite e portlandita; (f): Elevada mineralização da fissura com cristais de calcite e portlandita; (g): Morfologia típica de aragonite e calcite na argila; (h): matriz com mineralização homogénea; (i): elevada mineralização da fissura com cristais de calcite e portlandita; (j): cristais de calcite e portlandita na argila.

6.4. DRX

Na análise de DRX obtiveram-se os seguintes resultados:

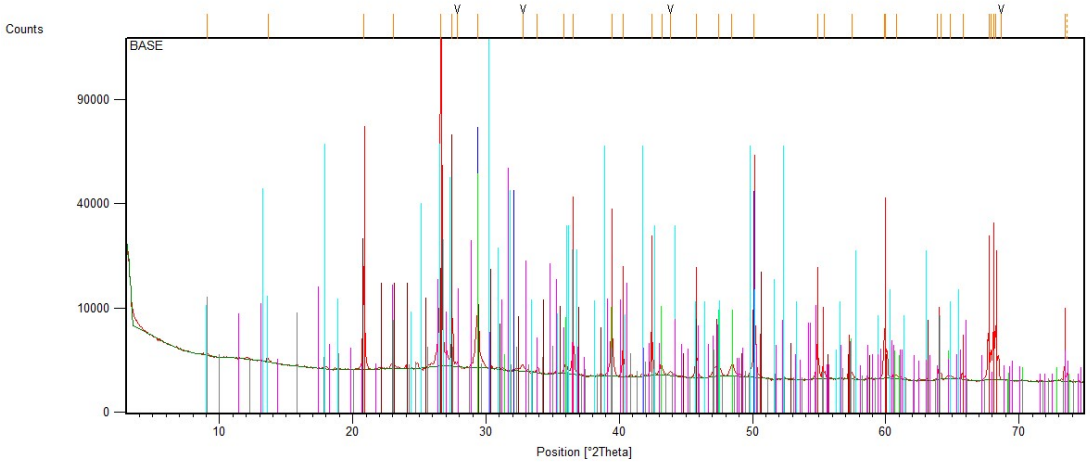


Figura 83 - DRX na amostra de betão BASE aos 156 dias.

São identificados na amostra BASE (Fig. 83) picos de quartzo, C-S-H, calcite, etringita, microcline e quilalaite.

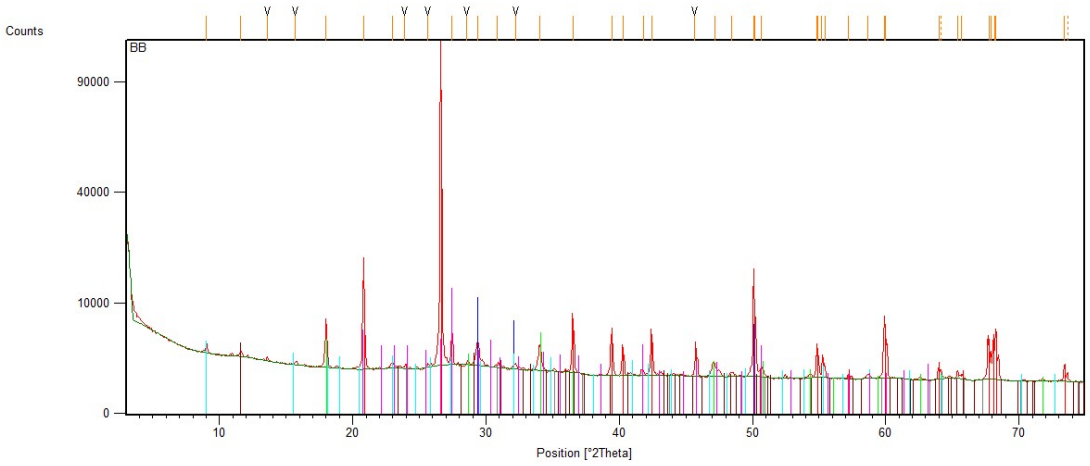


Figura 84 - DRX na amostra de betão BB aos 156 dias.

São identificados na amostra BL (Fig. 84) picos de quartzo, C-S-H, etringita, microcline, portlandita, gesso e anquerite.

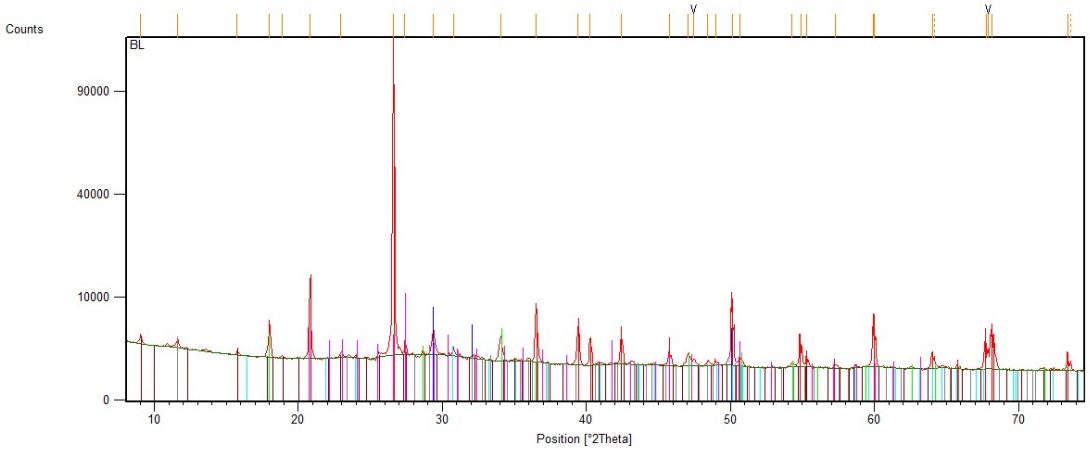


Figura 85 - DRX na amostra de betão BL aos 169 dias.

São identificados na amostra BB (Fig. 85) picos de quartzo, C-S-H, microcline, gesso e dolomite ferroniana.

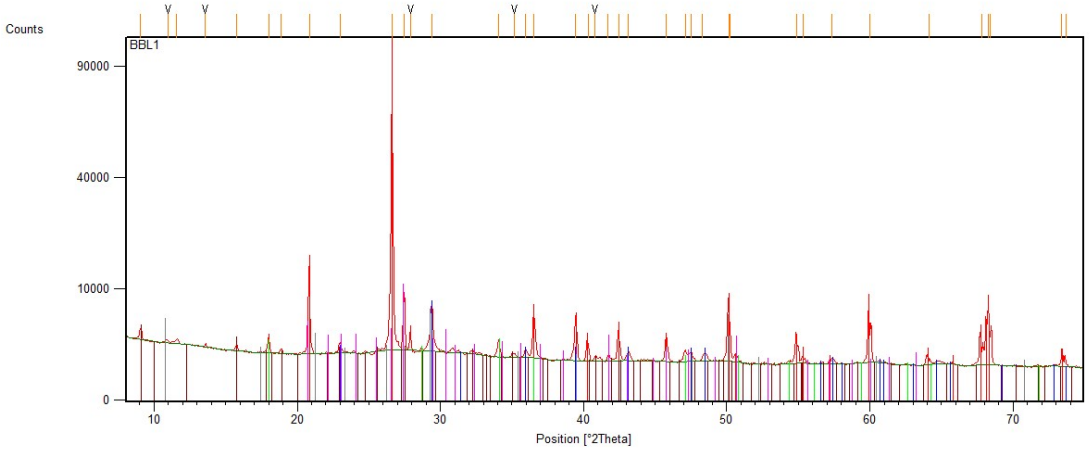


Figura 86 - DRX na amostra de betão BBL1 aos 165 dias.

São identificados na amostra BBL1 (Fig. 86) picos de quartzo, calcite, etringita, microcline, portlandita e gesso.

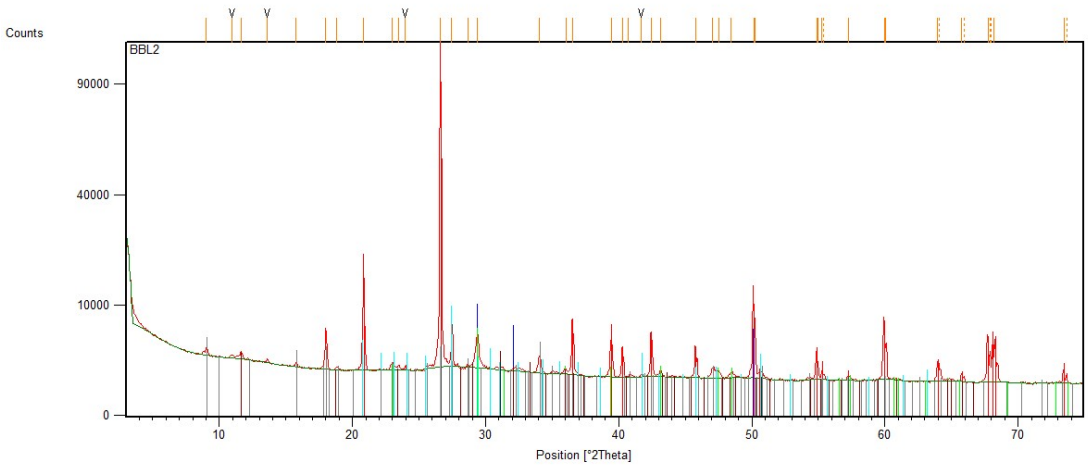


Figura 87 - DRX na amostra de betão BBL2 aos 170 dias.

São identificados na amostra BBL2 (Fig. 87) picos de quartzo, C-S-H, calcite, etringita, microcline, portlandita e gesso. A partir das figuras e de maneira a resumir os resultados obtidos e consoante os minerais que contribuem para esta dissertação foi preparada a Tabela 14 e a Fig. 88.

Tabela 14 – Resultados comparativos das várias amostras da difração de Raios-X

		AMOSTRA				
		BASE	**BB**	**BL**	**BBL1**	**BBL2**
MINERAIS IDENTIFICADOS	Silicato de Cálcio Hidratado	X	X	X		X
	Calcite	X			X	X
	Etringita	X		X	X	X
	Portlandita			X	X	X

Em nenhuma das amostras foi detetada aragonite e vaterite. Verificou-se a presença de C-S-H nas amostras Base, BB, BL e BBL2. A presença de calcite foi detetada na amostra Base, BBL1 e BBL2. Nas amostras de Base, BL, BBL1 e BBL2 foi detetada etringita. A portlandita estava presente nas amostras de BL, BBL1 e BBL2. Tendo em conta os resultados obtidos neste ensaio foi verificada a necessidade da sua execução em várias idades, visto que em vários SEM/EDS a presença de calcite era evidente em todas as amostras. O mesmo aconteceu com os C-S-H e a portlandita (hidróxido de cálcio). Face aos resultados obtidos, e visto fornecer dados pouco coerentes quanto à identificação de minerais nas amostras (tais como a ausência de C-S-H na amostra BBL1 e a ausência de portlandita em BASE e BB), decidimos rejeitar os dados deste ensaio.

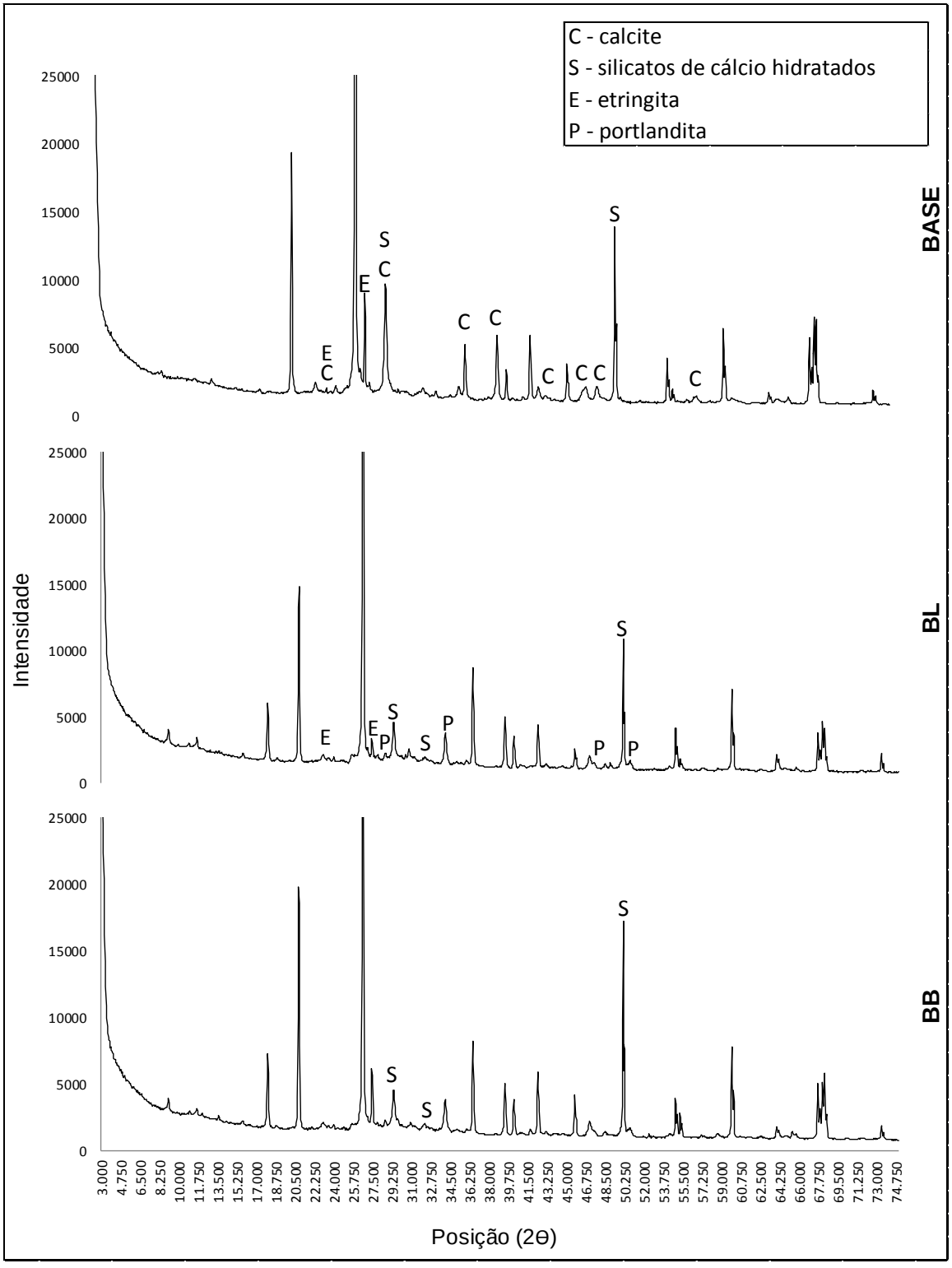


Figura 88 - Gráficos comparativos de DRX das várias amostras.

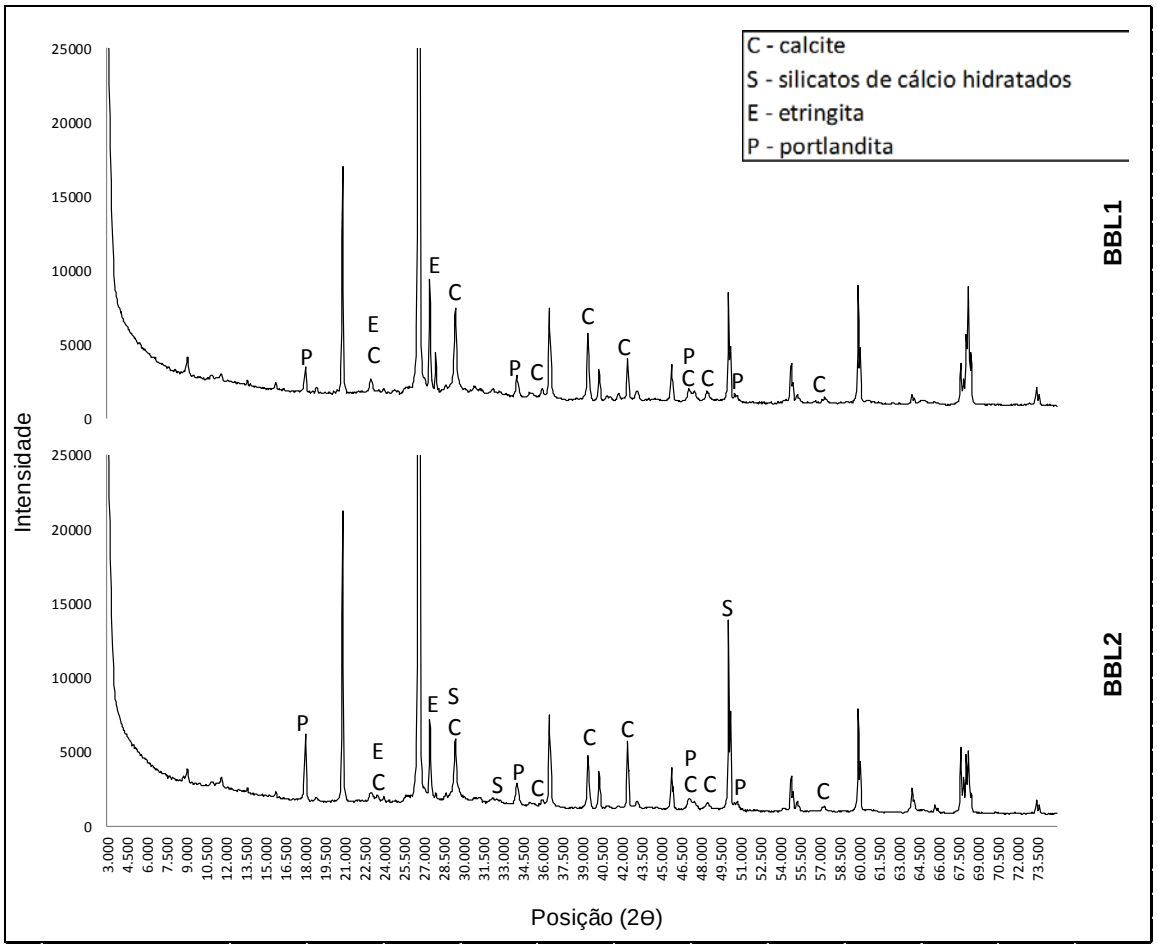


Fig. 88 (continuação) - Gráficos comparativos de DRX das várias amostras.

6.5. MPN

Houve uma extrema dificuldade na execução deste ensaio. A disponibilidade de meios para a sua realização atrasou extremamente a análise das amostras e visto que em investigações anteriores esta análise ter sido processada em idades jovens não conseguimos ter um padrão de comparação.

De qualquer forma decidiu-se executa-lo nas amostras de Base, BB, BBL1 e BBL2. A contaminação das amostras foi extrema, com diversas colónias de bactérias e fungos (Fig. 89) a surgirem nas caixas de *petri*.

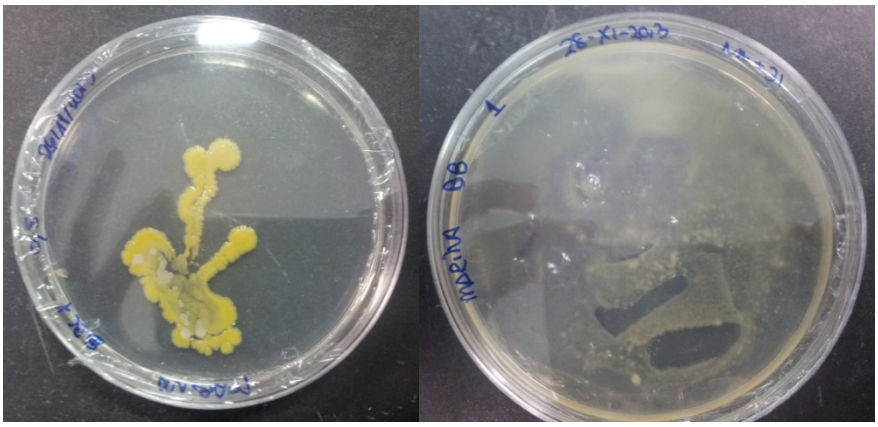


Figura 89 – Resultados de MPN: Colónias após 2 dias de crescimento.

Não foi possível diferenciar com exatidão as colónias que cresceram, muito menos se alguma delas seria de *Bacillus cohnii*.

Decidiu-se descartar este ensaio já que os resultados não foram conclusivos quanto à presença da bactéria.

Em investigações futuras é necessário verificar se o MRD é realmente o meio ideal para recuperação dos esporos bacterianos e células vegetativas retirados por maceração do betão. Pode, eventualmente, ter fragilizado a cultura introduzida pois o seu meio de cultura (extremamente alcalino) é seletivo e não deveriam ter crescido tantas culturas como o verificado. Considera-se que é dispensável também a maceração em câmara de fluxo, visto que as amostras se encontram expostas diariamente a bactérias. Considera-se que este cuidado não evita a contaminação das amostras por parte de outros microrganismos e que por sua vez, não contribui para resultados finais favoráveis.

6.6. Alteração dos padrões de cura

As amostras deste ensaio, após 2 meses de análise além de não apresentarem evidências de selagem das fissuras, não dispunham de água nos tabuleiros metálicos devido à evaporação. Assim que foi detetada a evaporação da água dos tabuleiros metálicos foi decidido que não se deveria nem selar, nem acrescentar, os respetivos meios já que isso alteraria os resultados. Assim como, não daria nenhuma certeza acerca da sua leitura. Após a evaporação total dos meios, as amostras encontravam-se cheias de vermes nas suas proximidades. Não foram obtidos resultados conclusivos e decidiu-se descartar este ensaio e as respetivas amostras BaseL, BaseB e BaseLB.

Em futuras investigações será importante a realização deste ensaio, que deverá ser executado de forma a evitar a evaporação, eventualmente com a utilização de uma película aderente para evitar a evaporação do meio e a contaminação dos meios e das amostras.

7. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

7.1. Ensaios de resistência à compressão

Os valores do ensaio de resistência à compressão reportam-nos para as seguintes classes de resistência à compressão (Tabela 15):

Tabela 15 – Classe de resistência à compressão das várias amostras aos 28 dias.

Amostra	Resistência característica mínima em cubos	Classe de resistência
BASE	24	**LC 20/22**
BASE H	24	**LC 20/22**
BB	17	**LC 12/13**
BL	20	**LC 16/18**
BBL1	23	**LC 20/22**
BBL2	28	**LC 25/28**

A amostra BL foi a que apresentou um comportamento mais invulgar e heterogéneo, perdendo resistência entre os 3 e os 28 dias e voltando a ganhar gradualmente mais resistência até aos 84 dias. A adição de meio precursor mineral prejudica drasticamente o comportamento do betão relativamente à resistência à compressão.

As amostras de betão BASE e BASE H tiveram um comportamento bastante idêntico, mostrando que a alteração do modo de cura das amostras não influenciou a sua resistência. As amostras que apresentaram resistências superiores foram as do betão BBL2, superando em pouco mais de 3 MPa as amostras de betão BASE aos 84 dias.

7.2. Inspeção Visual (Estereomicroscópio)

Ao longo de todo o processo de inspeção visual foi verificada uma mineralização das fissuras, aumentando ao longo do tempo até cerca dos 100 dias de idade, principalmente nas amostras de BBL1 e BBL2 (Fig. 90).

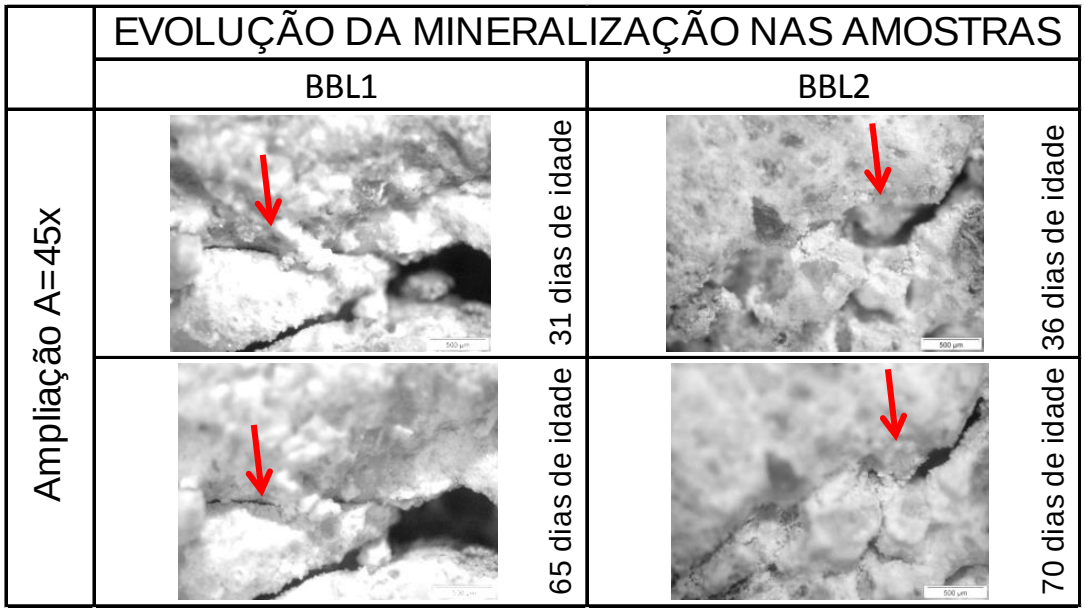


Figura 90 - Mineralização das fissuras das amostras de BBL1 e BBL2 com diferentes idades. Evidências de que as amostras de BBL1 se encontram mais carbonatadas que as de BBL2.

No caso da amostra BASE não foi evidente nenhum tipo de cristalização nas fissuras, apenas alguma dissolução de portlandita em idade inicial na zona envolvente da fissura, mas em idade avançada essa dissolução desapareceu. A amostra BL (Fig. 91) teve um comportamento bastante semelhante à amostra BASE.

A amostra de BB (Fig. 91) apresentou alguma cristalização de cor branca na zona interna da fissura. Apesar dessa cristalização a fissura não foi selada.

A amostra BBL1 teve uma cristalização inicial (31 dias de análise) tão rápida quanto a da amostra BBL2 (36 dias de análise) mas a longo prazo parece ter cessado ao contrário da segunda, que parece aumentar ao longo do tempo, apesar desse aumento se tornar gradualmente mais lento (Fig. 91).

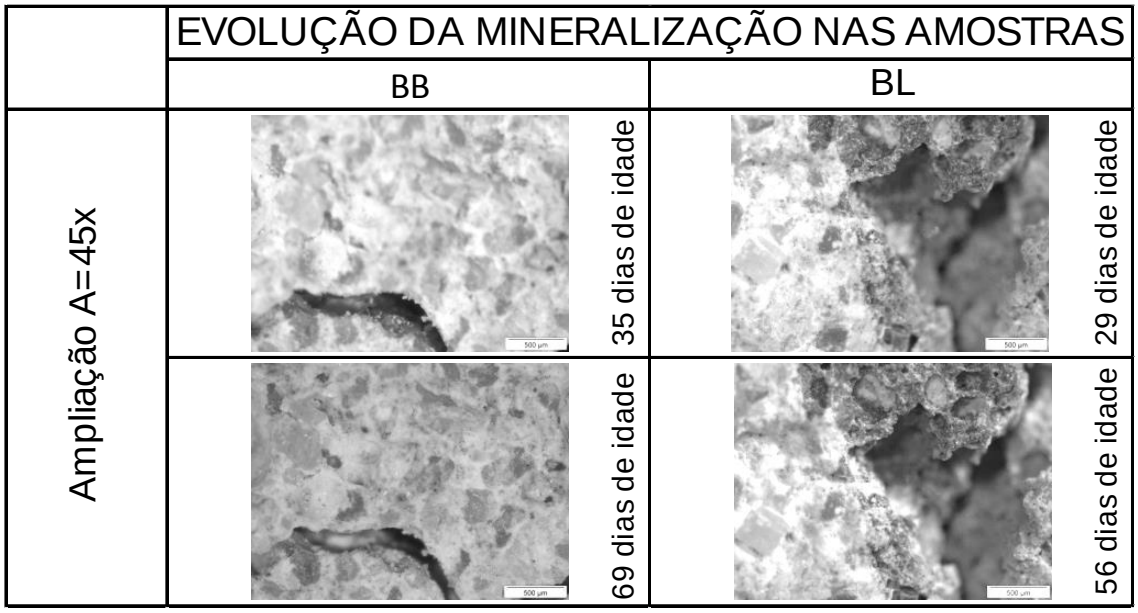


Figura 91 - Mineralização das fissuras das amostras de BB e BL com diferentes idades. Evidências de que as amostras não possuem mineralização capaz de selar fissuras.

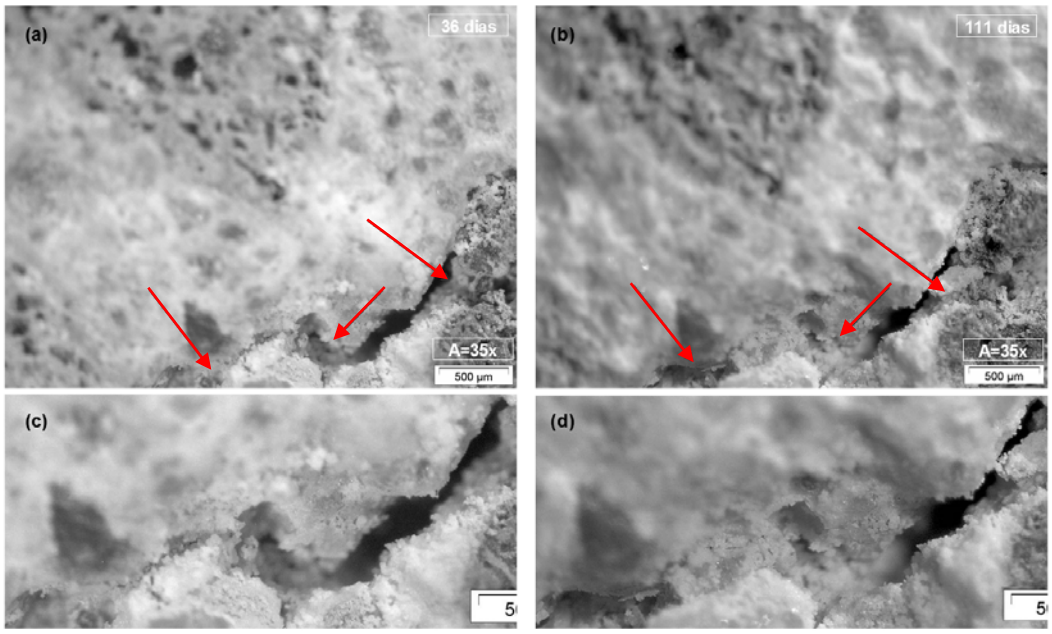


Figura 92 - Tabela comparativa da amostra BBL2, aos (a) 36 e (b) 111 dias com 35x de ampliação; (c): ampliação da zona mineralizada em (a); (d): ampliação da zona mineralizada em (b).

Na Fig. 92 foi possível verificar que a mineralização na fissura não cessou e que em zonas próximas do agregado argila expandida até atuou com alguma eficiência. A distribuição dos cristais formados não foi homogénea, talvez devido

à profundidade da fissura, pois na Fig. 92 (c) conseguiu-se ver a evolução de uma cristalização interna.

Como as amostras se encontravam com uma distribuição homogénea de argila expandida pode-se afirmar que em grandes fissuras este processo não é eficiente a curto prazo (Ver Fig. 93)

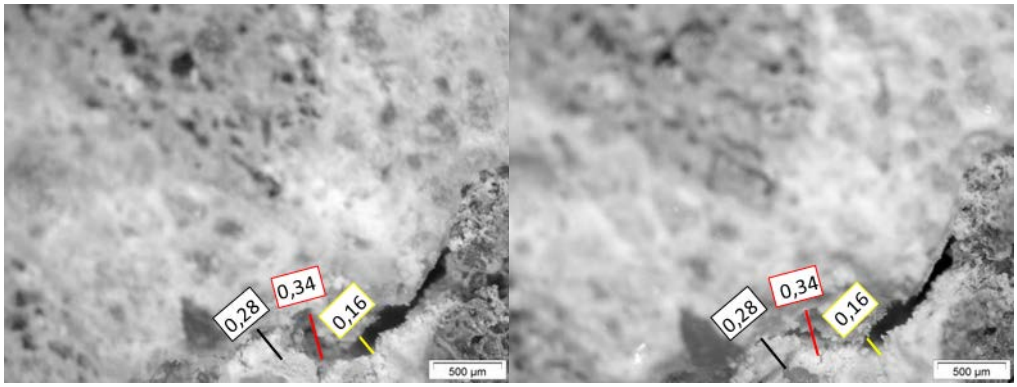


Figura 93 - SEM na amostra BBL2 aos 34 e aos 189 dias

Já em microfissuras, como mostra a Fig. 94 funciona muito bem, apesar de não se terem recolhido dados para avaliar a capacidade de selagem neste tipo de fissuração, pois já foi provado em artigos de especialidade que funcionava.

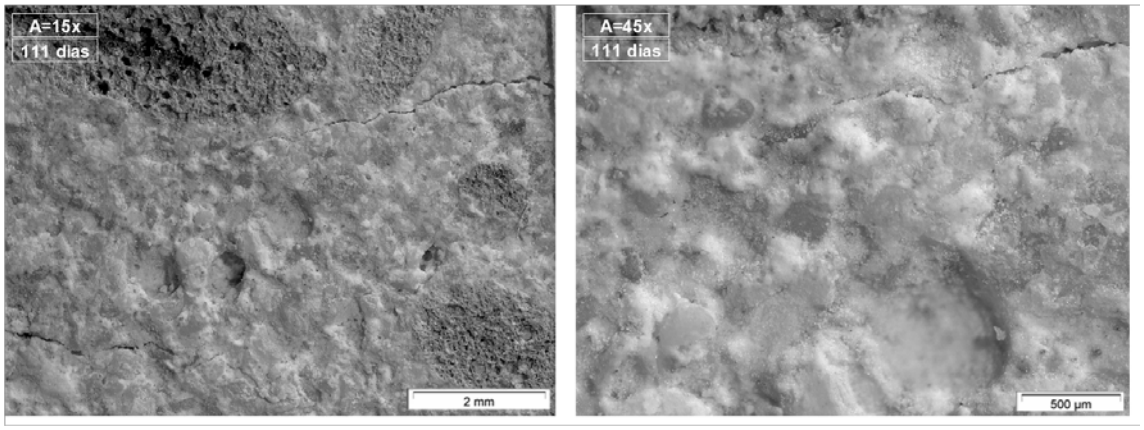


Figura 94 – Análise comparativa de uma microfissura aos 111 dias de idade na amostra de BBL2.

7.3. SEM

Com este equipamento conseguiu-se verificar a presença constante de carbonato de cálcio em forma de calcite em todas as amostras analisadas. Nas amostras de BB, BBL1 e BBL2 foi comprovada a presença de aragonite (forma de carbonato de cálcio que surge através de produção bio mineral - ver Fig. 95 e 96). Conseguiu-se também provar que há uma sedimentação mineralógica nestas amostras (Fig. 97).

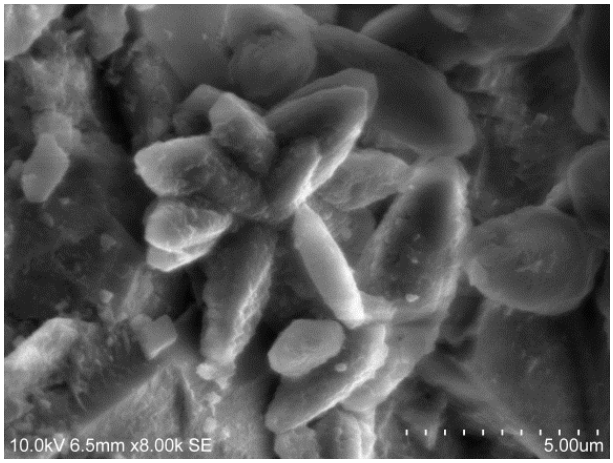


Figura 95 - Aragonite nas amostras de BBL2 (42 dias)

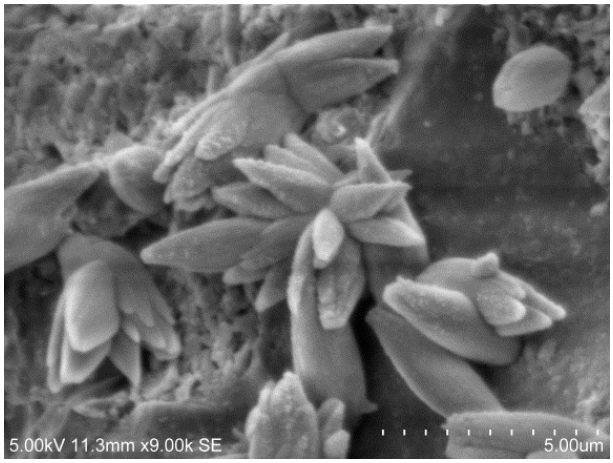


Figura 96- Aragonite nas amostras de BB (50 dias)

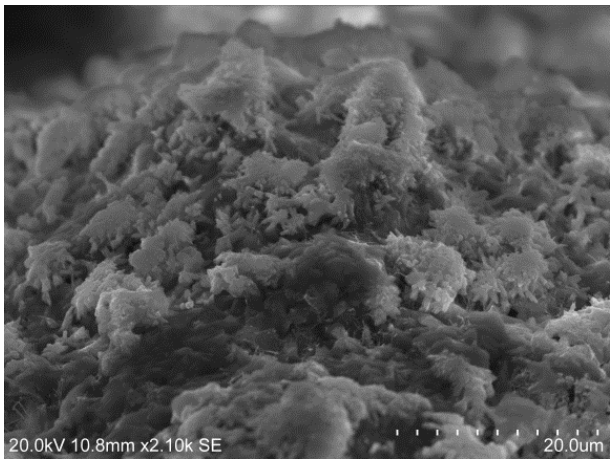


Figura 97 - Sedimentação de C-H nas amostras de BBL1

Devido à disponibilidade do SEM e ao tempo disponível para a sua utilização, as amostras foram analisadas já com alguma idade (mínimo cerca de 30 dias), o que dificultou a deteção de esporos bacterianos e células vegetativas. De qualquer forma existe uma imagem na amostra BB de esporos bacterianos com formato oval, presumindo ser *Bacillus Cohnii* (Fig. 98).

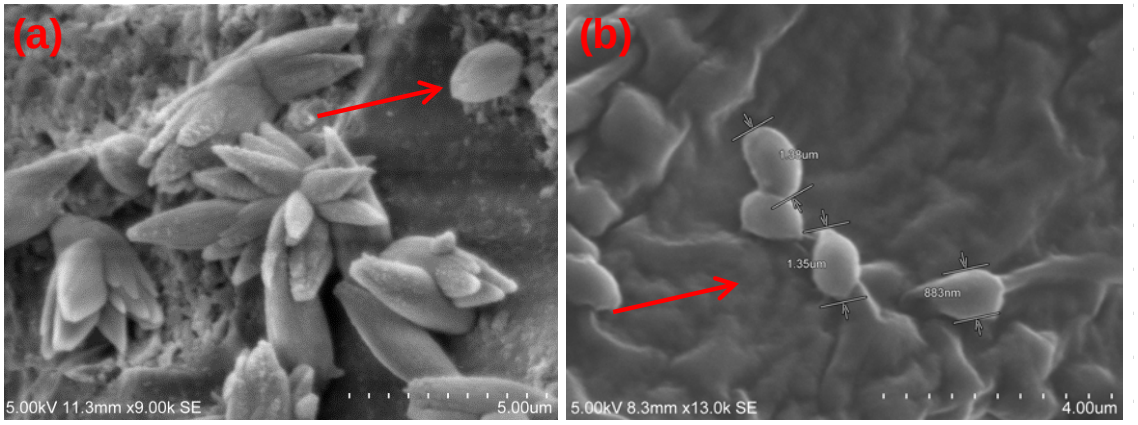


Figura 98 - Comparação de esporos bacterianos na amostra BB com esporos bacterianos cultivados em Meio de esporulação sólido. (a): SEM na amostra BB aos 50 dias; (b): SEM de esporos bacterianos cultivados em Meio de esporulação sólido.

Foi verificada a presença de C-S-H naturalmente presentes na matriz do betão desde o 1º dia (Fig. 99).

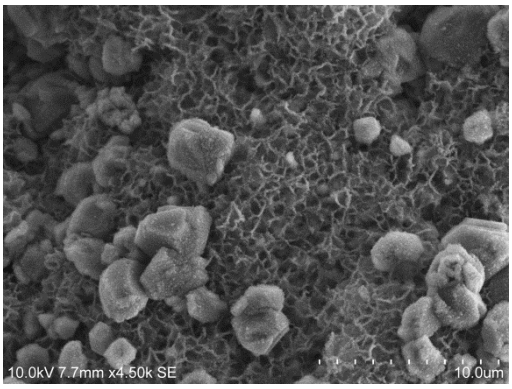


Figura 99 - Presença de C-S-H na matriz da amostra BASE.

7.4. DRX

A difração de Raios-X feita não trouxe conclusões portando decidiu-se rejeitar o ensaio.

7.5. MPN

Este ensaio não foi conclusivo. Todas as amostras ficaram contaminadas apesar de se ter feito o ensaio em meio estéril, não permitiu concluir nada acerca dele. Sendo a bactéria *Bacillus cohnii* bastante seletiva quanto ao meio de crescimento, esta deveria ter crescido no meio alcalino e os outros microrganismos não. Decidiu-se rejeitar este ensaio.

8. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesta dissertação é possível concluir que:

- O BBL2 conseguiu selar 0,28 mm ao fim de 34 dias, e a partir dessa data a mineralização foi crescente mas apenas a suficiente para selar fissuras de 0,16 mm aos 189 dias (Fig. 93);
- O BBL2 foi a composição que apresentou maior resistência à compressão ao fim de 28 dias, justificada pela formação de carbonato de cálcio;
- A adição de esporos e meio precursor mineral em conjunto no mesmo agregado de argila aumenta consideravelmente a resistência à compressão do betão (comparativamente com os resultados obtidos na amostra BASE e BASE H);
- A utilização de meio precursor mineral diretamente na água de amassadura prejudica drasticamente a resistência à compressão do betão (comparativamente com os resultados obtidos na amostra BASE e BASE H);
- A forma de introdução dos esporos bacterianos e meio precursor no betão mostrou ter muita influência nos resultados, como se pode ver nas amostras BBL2 e BBL1;
- Foram detetados esporos bacterianos na amostra BB (Fig. 62) aos 50 dias de idade;
- Foi detetado azoto na análise SEM/EDS do BBL1 (Fig. 67), provando a presença da bactéria pelo menos até aos 46 dias de idade;
- O betão Base não selou qualquer tipo de fissuras, como era de esperar;
- A bio mineralização observada nas amostras ocorreu essencialmente nas primeiras idades (até aos 50 dias), sendo a partir daí bastante lenta, provavelmente devido à cessão da atividade bacteriana;
- A estirpe da bactéria utilizada mostrou ser viável, quando aplicada em conjunto com o meio precursor mineral, lactato de cálcio com extrato de levedura;
- A selagem que ocorreu nas fissuras foi heterogénea, dependendo da localização e proximidade dos agregados de argila que continham a bactéria;

- Foi detetada aragonite nas amostras de BBL2 aos 42 dias (Fig. 94) e na amostra BB aos 50 dias (Fig. 95), mineral esse que provém da metabolização do carbonato de cálcio por parte da bactéria *Bacillus cohnii*, comprovando a atividade bacteriana;
- Mesmo não sendo uma bactéria ureolítica a sua função na sintetização de carbonato de cálcio a partir da metabolização do lactato de cálcio, dióxido de carbono e da portlandita foi bastante viável;
- Não foi possível avaliar se houve, ou não, dissolução do meio precursor mineral na água de cura das amostras;
- A presença de água mostrou ser fundamental para que ocorram as reações que dão origem à formação de carbonato de cálcio;
- Uma vez que a bactéria é alcalifílica e cresce em meio alcalino, para otimizar o MPN e se conseguirem resultados viáveis, recomenda-se que o MRD seja alcalino;
- Não foi observada aragonite nos últimos ensaios de SEM feitos nas amostras, provavelmente porque cessou a atividade bacteriana e a aragonite antes existente acabou por evoluir para um mineral mais estável, como a calcite;
- Em termos de melhores resultados de selagem das fissuras, da melhor amostra para a pior, foram: BBL2, BBL1; As amostras BB, BASE e BL não apresentaram nenhum tipo de selagem.

Há realmente a certeza de que as fissuras seladas têm influência bacteriana e do meio precursor mineral, visto que as amostras de betão Base, BB e BL não apresentaram qualquer tipo de preenchimento mineral. Apesar das amostras BBL1 e BBL2 apresentarem mineralização, a segunda mostra uma maior capacidade de selagem das fissuras devido à introdução conjunta de esporos bacterianos e meio precursor mineral nos mesmos agregados de argila. Portanto, a disponibilidade conjunta destes elementos aumenta a eficiência do processo.

A estagnação da selagem bio mineral pode dever-se à falta de disponibilidade de meio precursor mineral por este se ter dissolvido durante o processo de cura ou devido à extinção de esporos bacterianos nas amostras.

Provavelmente seria mais eficaz no processo de deteção de esporos bacterianos nas amostras, se fosse introduzido ainda no meio de esporulação um componente que os tornasse fluorescentes durante uma análise em microscópio de fluorescência, provando assim a sua presença ou ausência com maior certeza e eficácia.

Em futuros estudos é necessário procurar o elemento Azoto nas amostras visto ser um indicador da presença de bactérias nas amostras.

A presença de água constante nas amostras foi um fator que influenciou a rapidez de selagem das fissuras. Talvez com a presença constante de água nas amostras, o processo efetuado teria sido mais eficaz e provavelmente teríamos conseguido selar as fissuras por completo em idade jovem. Contudo, não representaria a realidade a que as estruturas se encontram sujeitas e portanto os resultados que obteríamos não seriam válidos no meu ponto de vista, devido à possível extinção de esporos bacterianos na estrutura antes do seu contacto prolongado com água.

BIBLIOGRAFIA

Artigos científicos consultados:

Al-Thawadi, S.M. 2011. Ureolitic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand. *Journal of Advanced Science and Engineering Research.* 1, 2011, 98-114.

Biswas, M., *et al.* 2010. Bioremediase a unique protein from a novel bacterium BKH1, ushering a new hope in concrete technology. *Enzyme and Microbial Technology.* 46, 2010, 581-587.

BOCHUM, RUHR-UNIVERSITÄT. http://www.ruhr-uni-bochum.de. [Online] [Citação: 23 de 08 de 2014.] http://www.ruhr-uni-bochum.de/sediment/pictures/CaCO3_web1.jpg.

Bogas, J.A., Gomes, A. e Gomes, M.G. 2012. Estimation of water absorbed by expanding clay aggregates during structural lightweight concrete production. *Materials and Structures.* 45, 2012, 1565-1576.

Boynton, R.S. 1980. *Chemistry and technology of lime and limestone.* s.l. : 2nd edition, New York: J. Wiley and Sons, Inc., 1980.

Chahal, N., Rajor, A. e Siddique, R. 2011. Calcium carbonate precipitation by different bacterial strains. *African Journal of Biotechnology.* 10, 2011, 8359-8372.

Costa, A. e Appleton, J. 2002. Estruturas de Betão I . *Parte II - Materiais.* s.l. : Instituto Superior Técnico, 2002. Departamento de Engenharia Civil.

De Belie, N. e De Muynck, M. 2009. Crack repair in concrete using biodeposition. *Concrete Repair, Rehabilitation and Retrofitting II – Alexander et al (eds).* 2009.

Fenyvesi, O. 2010. Affect of lightweight aggregate to early age cracking in concrete. *Periodica Polytechnica.* 55, 2010, 63-71.

Fonseca, N.M.S. 2009. Betões estruturais com a imcorporação de agregados grossos reciclados de betão - Influência das condições de cura no desempenho

mecânico. *Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Civil.* s.l. : Instituto Superior Técnico, 2009.

Ghosh, P. e Mandal, S. 2006. Development of bioconcrete materials using an enrichment culture of novel thermophilic anaerobic bacteria. *Indian Journal of Experimental Biology.* 44, 2006, 336-339.

Gollapudi, U.K., *et al.* 1995. A new method for controlling leaching through permeable channels. *Chemosphere.* 30, 1995, 695-705.

Jonkers, H.M. 2012. Development and application of bacteria-based self-healing materials. *Delft University of Technology, Microlab, Stevinweg.* 1, 2012, NL-262 8 CN Delft Netherlands.

Jonkers, H.M. e Schlangen, E. 2009. A two component bacteria-based self-healing concrete. *Crc Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton.* 2009, 119-120.

Jonkers, H.M. e Schlangen, E. 2008. Development of a bacteria based self-healing concrete. *In Tailor made concrete structures - new solutions for our society. Proc. I nt. FIB symposium (ed. J. C. Walraven & D. Stoelhorst).* 2008, 425-430.

Jonkers, H.M. 2007. Self-healing concrete: a biological approach. In: van der Zwaag S, editor. Self-healing materials: an alternative approach to 20 centuries of materials science. *The Netherlands: Springer.* 2007, 195-204.

Jonkers, H.M., *et al.* 2010. Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecological Engineering.* 36, 2010, 230-235.

Kloes, van der. 1924. Onze bouwmaterialen. 1924, Deel III, Mortels en beton, Amsterdam: L.J. Veen.

Lubelli, B., *et al.* 2006. Irreversible dilation of NaCl contaminated lime–cement mortar due to crystallization cycles. 4, 2006, Vol. 36, 678-687.

Lubelli, B., Nijland, T.G. e van Hees, R.P.J. 2011. Self-healing of lime based mortars: microscopy observations on case studies. *HERON.* 2011, Vol. 56, Nº 1/2.

M.B.Ali, R.M. 2011. *A Review on emission analysis in cement industries.* s.l. : ELSEVIER, 2011. 2252-2260.

Melo, J.P.S. 2012. Incorporação de Cal em Misturas Cimentícias com Elevados Teores de Adições Minerais. s.l. : Universidade do Minho, 2012. Tese de Mestrado.

Muynck, D.W., *et al.* 2008. Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Construction and Building Materials.* 22, 2008, 875-885.

Neville, A. 1981. *Properties of concrete.* London : Pitman International Text, 1981.

Newbolds, S. e Olek, J. 2001. The influence of curing conditions on strength properties and maturity development of concrete. 2001. Final report, Joint transportation research program, Purdue.

Newman, J. e Choo, B. 2003. Advanced concrete technology: Concrete properties. 2003. Butterworth-Heinemann, Oxford.

Pinheiro-Alves, M.T. e F.G. *Um cimento mais sustentável frente a um ataque severo por sulfatos. .* s.l. : Universidade de Évora, Universidade Politécnica da Catalunha, Universidade do Minho, Portugal.

Radlinska, A.Z. 2008. Reability-based Analyses of early-age cracking in concrete. *Pordue University Graduate School, USA.* 2008.

Schlegel, H.G. 1993. *General Microbiology, 7th edition; tradução Inglês: M. Kogut.* s.l. : Cambridge University Press, 1993. ISBN 0-521-43980-9.

Senot Sangadji, E.S. 2012. *Novel approach to make concrete structures self-healing using porous network concrete.* s.l. : Faculty of Civil Engineering and Geosciences, Delft University of Technology, Delft, Netherlands. , 2012.

Siddique, R. e Chahal, N.K. 2011. Effect of Ureolytic bacteria on concrete properties. *Construction and Building Materials.* 23, 2011, 3791-3801.

Simas, M.D. 2007. Sistemas de protecção do betão face à carbonatação. *Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Civil. Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.* 2007.

Simões, A., *et al.* 2012. *Ciências e Engenharia de Materiais de Construção.* s.l. : M. Clara Gonçalves & Fernanda Margarido, IST Press, 2012. 978-989-8481-17-7.

Spanka, R. e Fritze, D. 1993. Bacillus cohnii sp. nov., a New, Obligately Alkaliphilic, Oval-Spore-Forming Bacillus Species with Ornithine and Aspartic Acid Instead of Diaminopimelic Acid in the Cell Wall. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 43, 1993, 150-156.

Talaiekhozan, A., *et al.* 2014. *A Review of Self-healing Concrete Research Development.* Journal of Environmental Treatment Techniques, 2014, Vol. 2. ISSN: 2309-1185, 1-11.

Toohey, K. S., *et al.* 2007. Self-healing materials with micro vascular networks. 2007, Published online, doi:10.1038/nmat1934.

Van Breugel, K. 2007. Is There a market for self-healing cement-based materials. . 2007, .Proceedings of the first international conference on self-healing materials, Noordwijkaan zee, the Netherlands.

Van der Zwaag, S. 2007. Self-healing materials: an alternative approach to 20 centuries of Material Science. 2007.

Wang, J., *et al.* 2012. Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete. *Construction and Building Materials.* 26, 2012, 532-540.

Wiktor, V. e Jonkers, H. M. 2009. Bio-chemical self-healing agent to prevent reinforcement corrosion in concrete. 2009, Proceeding of the 2nd International Conference on Self-Healing Materials, Chicago, United States.

Wiktor, V. e Jonkers, H. M. 2011. Un nouveau béton auto-cicatrisant grâce à l'incorrporation de bactéries. *Matériaux & Techniques .* 99, 2011, 565-571.

Wu, M., Johannesson, B. e Geiker, M. 2012. Self-healing in cementitious materials and engineered cementitious composite as a self-healing material. *Construction and Building Materials .* 28, 2012, 571-583.

Normas consultadas:

NP EN 1008:2003 - Água de amassadura para betão. Especificações para a amostragem, ensaio e avaliação da aptidão da água, incluindo água recuperada nos processos da indústria de betão, para o fabrico de betão. IPQ.

NP EN 1097-5:2002 - Ensaios para a determinação das propriedades mecânicas e físicas dos agregados: Determinação do teor de humidade por secagem em estufa ventilada. IPQ.

NP EN 12350-1:2009 - Ensaios do betão fresco: Amostragem. IPQ.

NP EN 12350-2:2009 - Ensaios do betão fresco: Ensaio de abaixamento. IPQ.

NP EN 12390-1:2012 - Ensaios do betão endurecido: Forma, dimensões e outros requisitos para o ensaio de provetes e para os moldes. IPQ.

NP EN 12390-2:2009 - Ensaios do betão endurecido: Execução e cura dos provetes para ensaios de resistência mecânica. IPQ.

NP EN 12390-3:2009 - Ensaios do betão endurecido: Resistência á compressão de provetes. IPQ.

NP EN 12390-4:2009 - Ensaios do betão endurecido: Resistência á compressão de provetes. Características das máquinas de ensaio. IPQ.

NP EN 12620:2004 - Agregados para betão. IPQ.

NP EN 197-1:2000 - Cimento: Composição, especificações e critérios de conformidade para cimentos correntes. IPQ.

NP EN 206-1:2007 - Betão: Especificação, desempenho, produção e conformidade. IPQ.

NP EN 933-1:2000 - Ensaios das propriedades geométricas dos agregados: Análise granulométrica, Método da peneiração. IPQ.

NP EN 933-2:1999 - Ensaios das propriedades geométricas dos agregados: Análise granulométrica, Peneiros de ensaio, Aberturas nominais. IPQ.

***Sites* consultados:**

http://www1.ipq.pt/, Dezembro de 2014;

http://www.citg.tudelft.nl/en/research/projects/self-healing-concrete/, durante todo o período de desenvolvimento desta dissertação;

http://www.elsevier.com/, durante todo o período de desenvolvimento desta dissertação;

http://www.understanding-cement.com, durante todo o período de desenvolvimento desta dissertação;

http://www.dsmz.de/, consultado em Janeiro de 2013;

http://www.ruhr-uni-bochum.de/sediment/pictures/CaCO3_web1.jpg., consultada em Setembro de 2014;

http://www.webmineral.com, durante todo o período de desenvolvimento desta dissertação;

https://www.mineralienatlas.de, durante todo o período de desenvolvimento desta dissertação;

http://www.mindat.org, durante todo o período de desenvolvimento desta dissertação;

Galeria de imagens do Google.

ANEXOS

Anexo A – Meios de cultura e identificação da bactéria;

Anexo B – Fichas técnicas dos materiais;

Anexo C – Teor de humidade dos agregados;

Anexo D – Granulometria e massa volúmica dos agregados;

Anexo E – Composição do betão;

Anexo F – Ensaio de resistência à compressão;

Anexo G – DRX.