

ADRIANA GOMEZ ENRIQUEZ

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE *Serratia ureilytica*
COMO AGENTE DE BIOCIMENTAÇÃO E *BIOCLOGGING* PARA
ESTABILIZAÇÃO DE SOLOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

G633i
2017
Gomez-Enriquez, Adriana, 1979-
Isolamento, caracterização e avaliação de *Serratia ureilytica* como agente de biocimentação e *bioclogging* para estabilização de solos / Adriana Gomez-Enriquez. – Viçosa, MG, 2017.

1 tese eletrônica (xi, 55 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Carlos Cardoso Machado.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Engenharia Florestal, 2017.

Inclui bibliografia.

Disponível em: <https://www.locus.ufv.br>

1. Urease. 2. Bactérias. 3. *Serratia ureilytica*. 4. Calcita.
5. Cisalhamento dos solos - Resistência. I. Machado, Carlos
Cardoso, 1951-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Engenharia Florestal. Programa de
Pós-Graduação em Ciência Florestal. III. Título.

GFDC adapt. CDD 22. ed. 634.91146

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

ADRIANA GÓMEZ ENRIQUEZ

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE *Serratia ureilytica* COMO AGENTE DE BIOCIMENTAÇÃO E BIOCLOGGING PARA ESTABILIZAÇÃO DE SOLOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiarum*.

APROVADA: 21 de agosto de 2017.


Giovani Levi Sant'Anna


Elizabeth Neireda Silva Oliveira de Paula


Cláudio Henrique de Carvalho Silva
(Coorientador)


Marcos Rogério Tótole
(Coorientador)


Carlos Cardoso Machado
(orientador)

“Somo de longe e estamos aqui a procura de conhecimentos
Que nós leva através de hoje sim e do amanhã quem sabe,
O tudo de bom pela amizade conquistada e pela vitória conseguida, nossa humildade de
sempre”

Chiquinho da floresta

Dedico

Aos meus pais, Maria e Maximiliano. Por seu amor e apoio incondicional, por
brindar-me sempre o melhor deles, e por me incentivar ao cumprir minhas metas.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a DEUS, por sua presença na minha vida, pelas bênçãos recebidas e por guiar os meus caminhos;

Aos meus pais, pelo amor infinito, pelos ensinamentos, por estar sempre presentes, mesmo na distância e por me incentivar para cumprir meus sonhos;

A meus Irmãos Viviana, Duverney e Vanessa pelo amor, incentivo e apoio incondicional;

A meus sobrinhos Santiago, Emmanuel e Jacobo, luz da minha vida, pela cumplicidade e por me proporcionar sempre momentos de alegria;

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa (UFV), e ao Departamento de Engenharia Florestal (DEF), pela oportunidade de realizar o Doutorado, proporcionando-me todas as ferramentas para cumprir os objetivos propostos;

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado pelo convenio PEG-PG;

Agradeço as empresas Duratex S.A, Agroflor e o Eldorado Brasil, pelo apoio à pesquisa e concessão da bolsa no último ano do Doutorado;

Ao Professor Carlos Cardoso Machado, pela confiança depositada, pelos ensinamentos que contribuíram para minha formação profissional e pessoal, pelo apoio constante e o incentivo nos momentos de dificuldade;

Ao professor Marcos Rogerio Tótola pelos ensinamentos, a paciência e a dedicação no desenvolvimento da pesquisa;

A Karlos Kalks pelos ensinamentos, pela paciência e apoio na realização de testes do laboratório de microbiologia;

A Giovanni Levi Sant`ana, pela amizade, ensinamentos e apoio nos testes do laboratório de geotecnia;

Aos colegas do Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia para o meio ambiente, pelos ensinamentos e conselhos na realização dos experimentos e pelos momentos de distração, que sempre levavam o café da tarde;

Agradeço a Marcela Camacho e a Bruna Leão, por sus orientações, ajuda e conselhos no desenvolvimento dos experimentos e principalmente pela sua amizade;

Ao Givanildo Miguel, pelo apoio incondicional, por sua companhia e paciência nos momentos de estresse e por me brindar sempre o melhor;

Agradeço ao Professor Hernan Rojas, meu exemplo a seguir como pesquisador, agradeço pelos ensinamentos, por me incentivar no caminho da pesquisa e por sua amizade;

Ao professor Harold Tafur por seu apoio incondicional, incentivo para realizar a pós-graduação, e pela confiança depositada;

Agradeço aos amigos do DEF, Pamella, Leonardo, Álvaro, Reginaldo, Lyvia, Juliana, Naiara, Cristina, Arthur e Breno, pelos bons momentos, pela ajuda e os incentivos do dia a dia para cumprir nossos objetivos;

A Eliane Sampaio de Freitas, pelo apoio incondicional nos momentos difíceis, pela companhia nas madrugadas para realizar os experimentos, pelos bons momentos, risadas, festas, tênis, concelhos...em fim, obrigada por tudo, você se tornou uma amiga muito especial;

E finalmente e não menos importante, agradeço aos meus amigos do coração Irina, Tatiana, Carlos, Sara, Andressa e Nívia, que sempre estarão aqui, nos momentos bons e também nos ruins, sem importar a distância.

SUMARIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. OBJETIVO GERAL.....	3
1.2. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	4
2. CAPITULO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
2.1. BIOMINERALIZAÇÃO	7
2.2. PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO MICROBIOLOGICAMENTE INDUZIDO (MICP).....	8
2.3. MECANISMO DE PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CALCIO	8
2.4. POLIMORFISMO DE CRISTAIS DE CARBONATO DE CALCIO.....	9
2.5. A MICP NA ESTABILIZAÇÃO DE SOLOS.....	10
2.6. FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DO MICP	11
2.7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	13
3. CAPITULO 2: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE <i>Serratia ureolytica</i> PARA PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CALCIO	16
3.1. INTRODUÇÃO	16
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.2.1 <i>Isolamento e seleção de microrganismos ureolíticos para precipitação de calcita ..</i>	<i>17</i>
3.2.2 <i>Meio de cultura.....</i>	<i>18</i>
3.2.3 <i>Atividade ureolítica.....</i>	<i>18</i>
3.2.4 <i>Avaliação do efeito do pH sobre a atividade ureolítica</i>	<i>19</i>
3.2.5 <i>Avaliação da Temperatura</i>	<i>19</i>
3.2.6 <i>Identificação do isolado por sequenciamento parcial do rDNA 16S</i>	<i>19</i>
3.2.7 <i>Estabelecimento da relação entre densidade óptica (D.O) e massa de células (mg/mL).....</i>	<i>19</i>
3.2.8 <i>Microscopia óptica.....</i>	<i>20</i>
3.2.9 <i>Desenho experimental e análise de dados.....</i>	<i>20</i>
3.3. RESULTADOS.....	21
3.3.1 <i>Isolamento e seleção de microrganismos.....</i>	<i>21</i>
3.3.2 <i>Efeito da fonte de nitrogênio sobre a atividade ureolítica</i>	<i>21</i>
3.3.3 <i>Efeito do pH sobre a atividade ureolítica.....</i>	<i>23</i>

3.3.4	<i>Efeito da temperatura sobre a atividade ureolítica</i>	24
3.3.5	<i>Identificação do isolado por sequenciamento parcial do rDNA 16S</i>	25
3.3.6	<i>Atividade específica da uréase</i>	25
3.3.7	<i>Análise microscópica de cristais de CaCO₃ obtidos a partir de atividades ureolíticas o isolado S. ureilytica LBBMA70</i>	26
3.4.	DISCUSSÃO.....	27
3.5.	CONCLUSÕES.....	29
3.6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
4.	CAPITULO 3: OTIMIZAÇÃO DA PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO INDUZIDO MICROBIOLOGICAMENTE POR <i>Serratia Ureilytica sp.</i> EM SOLOS ARENOSOS	34
4.1.	INTRODUÇÃO.....	34
4.2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.2.1	<i>Microrganismos</i>	35
4.2.2	<i>Parâmetros das colunas e montagem do experimento</i>	36
4.2.3	<i>Tratamentos</i>	37
4.2.4	<i>Obtenção de amostras</i>	38
4.2.5	<i>Densidade óptica</i>	38
4.2.6	<i>Atividade ureolítica</i>	39
4.2.7	<i>Concentração de amônio</i>	39
4.2.8	<i>Permeabilidade</i>	39
4.3.	RESULTADOS.....	40
4.3.1	<i>Efeito da concentração de células</i>	41
4.3.2	<i>Efeito da solução de Fixação</i>	43
4.3.3	<i>Efeito da concentração da solução cimentante</i>	44
4.3.4	<i>Efeito na Permeabilidade do solo</i>	44
4.4.	DISCUSSÃO.....	46
4.5.	CONCLUSÕES.....	46
4.6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
5.	ANEXOS	52
6.	CONCLUSÃO GERAL	55

SUMARIO DE FIGURAS

Figura 3-1. Avaliação da atividade ureolítica no tempo, para sete isolados em três meios de cultura. a)Meio-Ureia, B)Meio-sulfato, c)Meio Ureia-Sulfato.....	22
Figura 3-2. Efeito do pH e o meio de cultura na atividade ureolítica, a) Atividade no tempo Meio-Ureia; b) Atividade no tempo meio-Sulfato; c) Comparação de médias da atividade no meio Ureia; d) Comparação de médias de atividade no meio-Sulfato. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes	24
Figura 3-3 .Avaliação do efeito da temperatura na atividade ureolítica do isolado #70. a) Atividade ureolítica determinadas em intervalos de tempo; b) Comparação de médias da atividade ureolítica em função da temperatura. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes	25
Figura 3-4. Atividade específica, atividade ureolítica, e densidade ótica determinadas para S. Ureilytica no tempo.	26
Figura 3-5. Imagens de precipitação de carbonato de cálcio em microscópio óptico. a) Observação em resolução 20X; b) Observação em resolução 100 X.....	27
Figura 4-1. Esquema de montagem do experimento.....	37
Figura 4-2. Medidas de densidade óptica do efluente. a) Colunas 1, 2, 3 com diferentes volumes de solução bacteriana; b) colunas 4, 5 e 6 com igual volume de solução bacteriana.....	42
Figura 4-3. Medições do efluente das colunas 1,2 e 3. a) Atividade ureolítica, b) Concentração de amônio.....	43
Figura 4-4. Avaliação do efeito da injeção da solução de fixação. a) Efeito na atividade ureolítica, b) Efeito na concentração de amônio.	44
Figura 4-5. Efeito da precipitação de carbonato de cálcio na permeabilidade do solo ...	45

RESUMO

GOMEZ-ENRIQUEZ, Adriana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2017. **Isolamento, caracterização e avaliação de *Serratia ureilytica* como agente de biocimentação e *bioclogging* para estabilização de solos.** Orientador: Carlos Cardoso Machado. Coorientador: Marcos Rogério Tótola.

Estradas não pavimentadas constitui-se em um importante componente de infraestrutura rodoviária, pois permite o fluxo regular de mercadorias e serviços, facilitando a fixação e desenvolvimento das atividades rurais, principalmente as relacionadas com o setor agrícola e florestal. Conservar a superfície destas estradas é fundamental para garantir uma trafegabilidade ótima, diminuir processos erosivos, e evitar impactos negativos sociais e ambientais. Por tanto, é necessário melhorar as propriedades geomecânicas dos solos mediante a estabilização, porém os métodos utilizados muitas vezes resultam ineficientes ou são economicamente y/o ambientalmente inviáveis em alguns projetos, sendo necessário propor novas metodologias. A bioestabilização de solos surge como uma nova alternativa para este fim que se baseia na precipitação de cristais de carbonato de cálcio nos grãos do solo para aumentar sua resistência mecânica. É um processo complexo pelos diferentes fatores que intervêm sendo necessário avalia-os para propor uma metodologia de aplicação em campo. Neste sentido, o objetivo desta tese foi definir uma metodologia para implementação da biocimentação em solos de estradas não pavimentadas que permitam aumentar a resistência mecânica do solo. A tese foi desenvolvida em três capítulos; no primeiro capítulo se apresenta uma revisão de literatura dos principais conceitos e fatores que intervêm no processo. No segundo capítulo, foram identificados e avaliados microrganismos ureolíticos eficientes na precipitação de carbonato de cálcio, para caracterizar e otimizar as condições da precipitação de carbonato de cálcio microbiologicamente induzida (MICP) para fins de biocimentação. 160 colônias foram isoladas de amostras de solo, das quais, foram selecionados 7 isolados para identificar os microrganismos com maior atividade ureolítica baixo diferentes condições de meio de cultura, pH e temperatura. Os resultados evidenciaram que a bactéria *Serratia ureilytica*, uréase positiva, foi identificada de forma inédita como um microrganismo eficiente na precipitação de carbonato de cálcio que apresenta altas taxas de atividade ureolítica variando entre 50-80 mM de ureia hidrolisada/min, dependendo das condições do meio. Já no capítulo 3, foi estudada uma

metodologia de precipitação de carbonato de cálcio em areias usando *Serratia ureilytica sp*, em que foram avaliadas concentrações de solução bacteriana e soluções de cálcio, para identificar a metodologia mais eficiente no processo. Os resultados permitiram identificar que aplicações de 12.5% do volume dos poros, seguida pela aplicação de uma solução de fixação de 50 mM CaCl₂ e posteriormente a aplicação de uma solução cimentante é a metodologia mais eficiente para precipitar carbonato de cálcio em solos arenosos. Enfim, a *Serratia ureilytica sp* foi identificado como um microorganismo promissório na precipitação de carbonato de cálcio em areias, com altas taxas de atividade urelítica, maior das reportadas atualmente na literatura. O processo resultou na diminuição da permeabilidade nos solos tratados, evidenciando a viabilidade para aumentar a resistência mecânica de solos de estradas não pavimentadas.

ABSTRACT

GOMEZ-ENRIQUEZ, Adriana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2017. **Isolation, characterization and evaluation of *Serratia ureilytica* as a biocimentation and bioclogging agent for soil stabilization.** Adviser: Carlos Cardoso Machado. Co-advisers: Marcos Rogerio Tótola.

Unpaved roads is an important component of road infrastructure, because it allows for regular flow of goods and services, facilitating the establishment and development of rural activities, especially those related to the agricultural and forestry sector. Conserving the surface of these roads is essential to guarantee optimal trafficability, reduce erosion processes, and avoid negative social and environmental impacts. Therefore, it is necessary to improve the geomechanical properties of soils by means of stabilization, but the methods used are often inefficient or are economically and environmentally unfeasible in some projects, being necessary to propose new methodologies. Soil biostabilization appears as a new alternative for this purpose, which is based on the precipitation of calcium carbonate crystals in soil grains to increase their mechanical resistance. It is a complex process due to the different factors involved and it is necessary to evaluate them to propose a methodology for application in the field. In this sense, the objective of this thesis was to define a methodology for the implementation of biocement in soils of unpaved roads that allow to increase the mechanical resistance of the soil. The thesis was developed in three chapters; the first chapter presents a literature review of the main concepts and factors that intervene in the process. In the second chapter, ureolytic microorganisms efficient in the precipitation of calcium carbonate were identified and evaluated to characterize and optimize the conditions of microbiologically induced calcium carbonate precipitation (MICP) for biocimentation purposes. 160 colonies were isolated from soil samples, of which, 7 isolates were selected to identify the microorganisms with greater ureolytic activity under different conditions of culture medium, pH and temperature. The results showed that the bacterium *Serratia ureilytica*, positive urea, was unprecedentedly identified as an efficient microorganism in the precipitation of calcium carbonate that presents high rates of ureolytic activity ranging between 50-80 mM of hydrolyzed urea / min, depending on the conditions of the middle. In chapter 3, a methodology for precipitation of calcium carbonate in sands was studied

using *Serratia ureilytica* sp, in which concentrations of bacterial solution and calcium solutions were evaluated, in order to identify the most efficient methodology in the process. The results allowed to identify that applications of 12.5% of the pore volume, followed by the application of a fixation solution of 50 mM CaCl₂ and later the application of a cementing solution is the most efficient methodology to precipitate calcium carbonate in sandy soils. Finally, *Serratia ureilytica* sp was identified as a promising microorganism in the precipitation of calcium carbonate in sands, with high rates of urelitic activity, higher than those currently reported in the literature. The process resulted in a decrease in permeability in the treated soils, showing the feasibility to increase the mechanical resistance of soils of unpaved roads.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Estradas não pavimentadas constitui-se em um importante componente de infraestrutura rodoviária, pois permite o fluxo regular de mercadorias e serviços, facilitando a fixação e desenvolvimento das atividades rurais, principalmente as relacionadas com o setor agrícola e florestal. Sua manutenção e conservação são essenciais para diminuir impactos negativos socioeconômicos e ambientais (ZOCCAL; SILVA, 2016).

Conservar a superfície das estradas é fundamental para evitar processos erosivos, pois são áreas altamente compactadas e com taxas de infiltração muito baixas, que causam excesso de escoamento superficial e conseqüentemente desprendimento de solo, mesmo com chuvas de baixa ou moderada intensidade (SOSA-PÉREZ; MACDONALD, 2017). A erosão provocada pela água no leito e nas margens de estradas não pavimentadas é um dos principais fatores para sua degradação e está diretamente relacionada com o material do leito, as propriedades físico-químicas do solo, as condições hidrológicas da região, a intensidade do tráfego e o declive, entre outros fatores (PRUSKI, F. et al., 2013; FU; NEWHAM; RAMOS-SCHARRÓN, 2010).

Os principais parâmetros que caracterizam a resistência de um solo a processos erosivos são a “Erodibilidade” ou a susceptibilidade de um solo a erosão, e a “Tensão Crítica de Cisalhamento” que é a força máxima que deve ser aplicada para que ocorra o desprendimento das partículas (WANG et al., 2013; PRUSKI, F. et al., 2013). Esses parâmetros são afetados pela resistência mecânica do solo e suas propriedades físico-químicas, tais como a textura, estrutura, conteúdo de matéria orgânica, permeabilidade, densidade aparente e a estabilidade de agregados, entre outros (HOSSEINI et al., 2016; SAFARI et al., 2016; WANG, B. et al., 2013).

Nesse sentido, aumentar a resistência mecânica dos solos é fundamental para diminuir processos erosivos decorrentes em estradas não pavimentadas. Entre as técnicas propostas para tal fim, está a estabilização de solos que visa melhorar a força e aumentar a resistência ao amolecimento pela água. O método consiste no tratamento do solo para ligar suas partículas, pela adição de materiais ou pela aplicação de processos mecânicos que melhoram as propriedades geotécnicas como a compressibilidade, resistência,

permeabilidade, redução da plasticidade e durabilidade (FIROOZI et al., 2017; MAKUSA, 2012).

A estabilização do solo pode ser feita por métodos mecânicos ou químicos. O método mecânico consiste na alteração física das partículas nativas do solo, por vibração ou compactação induzida, já a estabilização química depende principalmente de reações químicas entre o estabilizador (material cimentício) e minerais do solo (materiais pozolânicos) para obter o efeito desejado (MAKUSA, 2012).

Esses métodos, proporcionam muitas vantagens desde o ponto de vista da engenharia de solos. Porém, sua aplicação é limitada pela disponibilidade do material de estabilização ou pela incompatibilidade entre o solo e o agente cimentante, uma vez que os agentes químicos utilizados, podem reagir com os minerais presentes no solo, ocasionando alteração do pH, troca de cátions, carbonatação por migração de cal e outras reações que afetam as propriedades físicas do solo, além de geram um impacto negativo ao meio ambiente (FIROOZI et al., 2017).

A estabilização química utiliza cimento e outros produtos químicos como ligantes do solo para aumentar a resistência ao cisalhamento ou reduzir a condutividade da água no solo. No entanto, o uso desses produtos não é sustentável a longo prazo, porque requerem uma quantidade considerável de recursos naturais (calcário) e energia para sua produção, resultando em uma metodologia custosa e inviável para áreas grandes (CHU et al., 2015)

Nesse sentido, é necessário propor métodos alternativos de estabilização do solo que melhore as propriedades geotécnicas do solo sem gerar impactos negativos ao curto e longo prazo. Assim, recentemente tem se proposto a estabilização de solos por meios biológicos ou “bioestabilização” que consiste na precipitação de cristais de carbonato de cálcio nos grãos do solo, melhorando suas propriedades geotécnicas por induzir a diminuição dos espaços porosos e aumentar o conteúdo de sólidos (MARTINEZ; BARKOUKI, 2011). Alguns estudos evidenciam que o processo melhora a resistência ao cisalhamento e diminui a permeabilidade e erodibilidade dos solos (IVANOV; CHU, 2008; KIM; YOUN, 2016; SHAHRONKHI-SHAHRAKI et al., 2015; SHARMA; R., 2016; SOON et al., 2013; WEI-SOON; MLIN-LEE; SIEW-LING, 2012; WHIFFIN; VAN PAASSEN; HARKES, 2007)

O processo microbiológico depende de bactérias ureolíticas (não patogênicas), para hidrolisar ureia na presença de íons cálcio, resultando na precipitação de cristais de carbonato de cálcio. É um processo complexo, pois envolvem reações bioquímicas que podem ser afetadas por diversos fatores, como temperatura, concentrações de células

bacterianas, tipo de bactérias, disponibilidade de locais de nucleação, mineralogia e tamanhos de partículas do solo, entre outros (UMAR, et al., 2016). A maioria dos estudos desenvolvidos na área, estão focados na avaliação desses fatores. Porém, as pesquisas ainda são escassas e na estabilização de solos não se conhece uma metodologia eficiente para sua aplicação. Nesse contexto se propõe o seguinte trabalho cujos objetivo é:

1.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo desta tese foi definir uma metodologia para implementação da biocimentação em solos para fins de uso em estradas não pavimentadas, que permitam aumentar a resistência mecânica do solo. Três capítulos são apresentados:

No capítulo 1: “Fundamentação teórica”, se apresenta uma descrição dos principais conceitos e uma revisão de literatura do processo de biocimentação.

No capítulo 2: “Isolamento, caracterização e otimização de bactérias uréase positiva para precipitação de calcita”, foram selecionados e avaliados microrganismos ureolíticos com alta atividade para formação de carbonato de cálcio. Determinaram-se ainda as condições ótimas para potencializar sua atividade ureolítica.

O capítulo 3: “Otimização da precipitação de carbonato de cálcio microbiologicamente induzida por *serratia ureilytica sp* em solos arenosos”; foram determinadas as aplicações ótimas de reagentes no solo para a precipitação de carbonato de cálcio e foi verificado o efeito do processo na permeabilidade de um corpo de prova à base de areia.

1.2. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

CHU, J. *et al.* Use of Biogeotechnologies for Soil Improvement. *Ground Improvement Case Histories: Compaction, Grouting and Geosynthetics provides*. 1. ed. Butterworth-Heinemann, 2015. p. 569–589.

FIROOZI, A. A. *et al.* Fundamentals of soil stabilization. *International Journal of Geo-Engineering*, v. 8, n. 26, p. 1–16, 2017.

FU, B.; NEWHAM, L. T. H.; RAMOS-SCHARRÓN, C. E. A review of surface erosion and sediment delivery models for unsealed roads. *Environmental Modelling & Software*, v. 25, n. 1, p. 1–14, 2010.

HOSSEINI, M. *et al.* Estimation of soil mechanical resistance parameter by using particle swarm optimization, genetic algorithm and multiple regression methods. *Soil and Tillage Research*, v. 157, n. 1, p. 32–42, 2016.

IVANOV, V.; CHU, J. Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 7, p. 139–153, 2008.

KIM, G.; YOUN, H. Microbially induced calcite precipitation employing environmental isolates. *Materials*, v. 9, n. 468, p. 1–10, 2016.

MAKUSA, G. P. Soil stabilization methods and materials in engineering practice - state of the art review. *Department of Civil, Environmental and Natural resources engineering, Division of Mining and Geotechnical Engineering, Luleå University of Technology, Sweden*, v. 1, p. 1–35, 2012.

MARTINEZ, B. *et al.* Upscaling of microbial induced calcite precipitation in 0.5m columns: experimental and modeling results. *Geo-Frontiers*, p. 4049–4059, 2011.

PRUSKI, F. Conservação de solo e água: práticas mecânicas para o controle da erosão hídrica. 1. ed. *Editora UFV*, 2013, p. 279.

SAFARI, A. *et al.* Impact of different parts of skid trails on runoff and soil erosion in the hyrcanian forest (northern Iran). *Geoderma*, v. 263, p. 161–167, 2016.

SHAHRONKHI-SHAHRAKI, R. *et al.* Improving sand with microbial-induced carbonate precipitation. *Proceedings of the Institution of Civil Engineers - Ground Improvement*, v. 168, n. 3, p. 217–230, 2015.

SHARMA, A.; R., R. Study on effect of microbial induced calcite precipitates on strength of fine grained soils. *Perspectives in Science*, v. 8, p. 198–202, 2016.

SOON, N. W. *et al.* Improvements in engineering properties of soils through microbial-induced calcite precipitation. *KSCE Journal of Civil Engineering*, v. 17, n. 4, p. 718–728, 2013.

SOSA-PÉREZ, G.; MACDONALD, L. H. Reductions in road sediment production

and road-stream connectivity from two decommissioning treatments. *Forest Ecology and Management*, v. 398, p. 116–129, 2017.

UMAR, M.; KASSIM, K. A.; PING CHIET, K. T. Biological process of soil improvement in civil engineering: A review. *Journal of Rock Mechanics and Geotechnical Engineering*, v. 8, n. 5, p. 767–774, 2016.

WANG, B. *et al.* Soil erodibility for water erosion: A perspective and Chinese experiences. *Geomorphology*, v. 187, p. 1–10, 2013.

WEI-SOON, N.; MLIN-LEE, L.; SIEW-LING, H. An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement. *International Journal of Civil, Environmental, Structural, Construction and Architectural Engineering*, v. 6, n. 2, p. 723–729, 2012.

WHIFFIN, V. S.; VAN PAASSEN, L. A.; HARKES, M. P. Microbial Carbonate Precipitation as a Soil Improvement Technique. *Geomicrobiology Journal*, v. 24, n. 5, p. 417–423, 2007.

ZOCCAL, J.; SILVA, P. Manutenção de estradas e conservação da água em zona rural: adequação de erosões em estradas rurais. *Companhia de desenvolvimento Agrícola de São Paulo-CODASP*, v. 2, p. 1-118, 2016.

2. CAPÍTULO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O solo usado para a construção de estradas deve ter uma especificação especial para resistir as tensões de tração e espectro de deformações, geralmente são suscetíveis a processos erosivos e é necessário melhorar suas propriedades geomecânicas. A maioria das vezes, o solo deve passar por um processo de estabilização, que consiste na mistura de outros materiais com granulometria diferente ou de agentes de cimentação para aumentar a resistência ao cisalhamento e aumentar a capacidade de suporte (AFRIN, 2017; MACHADO, C et al., 2003; MACHADO, 2013).

A estabilização de solos, poder ser de dois tipos: Mecânica ou química. A estabilização mecânica é a mais utilizado na construção de estradas, trata-se de uma correção granulometria feita pela adição, retirada ou mistura de partículas de solo para obter um material que atenda as especificações exigidas e que pode ser sometido a compactação e/ou densificação pela aplicação de energia mecânica, para aumentar a estabilidade do solo e conseqüentemente a resistência mecânica (AFRIN, 2017). A principal desvantagem desse tipo de estabilização é que requer a adição de grandes volumes de solo que em muitas ocasiões é escasso no local e a distância de transporte das jazidas aumenta os custos da obra, tornando-o inviável.

Quando a estabilização mecânica não é eficiente, é necessário misturar o solo com aditivos químicos que garantam o aumento da resistência mecânica. Esta metodologia conhecida como estabilização química, requer a adição de produtos como cimento, cal ou betumes, entre outros, que atuam como ligantes do solo. Quando se adiciona estes agentes estabilizadores ao solo natural, ocorrem reações químicas que ajudam a atingir a umidade ótima para uma boa compactação, promovendo o preenchimento dos poros e assegurando a melhoria das propriedades físicas e mecânicas do solo (AFRIN, 2017; CHU et al., 2015; MACHADO, C. et al., 2003). Os resultados do processo, dependem principalmente das reações químicas que acontecem entre os estabilizadores e os minerais presentes no solo; esse tipo de estabilização pode resultar custosa, sobretudo para sua implementação em grandes extensões.

A seleção do método de estabilização depende de diversos fatores, sobretudo os relacionados com as propriedades físico-químicas e mecânicas do solo. Em alguns tipos de solos, os métodos comuns resultam ineficientes ou inadequados, sendo necessário desenvolver novas alternativas de estabilização que sejam eficientes, econômicas e

ambientalmente viáveis. Nesse contexto, outros métodos de estabilização são atualmente propostos como a “bioestabilização ou biocalcificação, que consiste na precipitação de um mineral entre os poros do solo, gerando uma redução da permeabilidade e um aumento da resistência mecânica (BESSLER; RODRIGUES, 2008; CARMONA; OLIVEIRA; LEMOS, 2016). É um evento biológico que ocorre comumente na natureza e baseia-se no processo de biomineralização que é detalhado neste capítulo.

2.1. BIOMINERALIZAÇÃO

A biomineralização é a alteração química de um ambiente por atividade microbiana, que resulta na precipitação de minerais (STOCKS-FISCHER; GALINAT; BANG, 1999). A maioria dos cristais formados consiste em minerais inorgânicos, mas também podem conter compostos orgânicos, que regulam o processo. Geralmente, esses minerais apresentam uma composição química definida e estrutura interna cristalina, com formas geométricas más o menos regulares. Os minerais produzidos podem ser silicatos em algas e diatomáceas, carbonatos de cálcio em invertebrados, fosfatos e carbonatos em vertebrados. O processo é comum nos seres vivos, por exemplo, na formação óssea, nas conchas, nas cascas de ovos, entre outros (ANBU *et al.*, 2016; DHAMI, N. K.; REDDY; MUKHERJEE, 2013).

Existem três mecanismos para a produção de biominerais: (1) A mineralização controlada biologicamente, que consiste em atividades celulares que direcionam especificamente a formação de minerais, que são sintetizados diretamente em um local específico dentro da célula, mas apenas sob certas condições. (2) A mineralização de influência biológica, definida como o processo pelo qual a precipitação mineral passiva é causada pela presença de matéria orgânica da superfície celular, como substâncias poliméricas extracelulares associadas a biofilmes e; (3) a mineralização induzida biologicamente, definida como uma modificação química de um ambiente por atividade biológica que resulta em supersaturação e precipitação de minerais (ANBU *et al.*, 2016).

O processo de mineralização associado às atividades metabólicas microbianas geralmente leva a um aumento da alcalinidade ambiental, facilitando a precipitação de carbonato de cálcio; um mineral muito comum na natureza, se encontra presente em estruturas geológicas, rocas e organismos vivos como esqueletos de corais, conchas dos moluscos e cascas de ovos de aves e répteis. A precipitação de carbonato de cálcio é realizada por numerosas espécies bacterianas e pode ocorrer em diversos ambientes como solos, águas doces, oceanos e lagos; o processo acontece por mineralização induzida, uma

vez que dependentes das condições ambientais (BRENNAN; LOWENSTEIN; HORITA, 2004; WEI *et al.*, 2015).

2.2. PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO MICROBIOLOGICAMENTE INDUZIDO (MICP)

O processo refere-se à formação de carbonato de cálcio a partir de uma solução supersaturada, a qual está associada à presença de células microbianas e atividades bioquímicas (MUYNCK; BELIE; VERSTRAETE, 2010). Durante a MICP, os organismos são capazes de secretar um ou mais produtos metabólicos (CO_3^{2-}) que reagem com íons Ca_2^+ no ambiente, resultando na subsequente precipitação de minerais.

Existem quatro formas principais do processo MICP: hidrólise de uréia, desnitrificação, redução de ferro férrico e redução de sulfato. O mecanismo de reação de hidrólise da uréia é bastante simples, o processo de reação é fácil de controlar e uma elevada concentração de CO_3^{2-} pode ser obtida em um período relativamente curto. A hidrólise da uréia produz carbonato e amônia, aumentando o pH e a concentração de carbonato, que depois se combina com o cálcio ambiental para precipitar como carbonato de cálcio (MUYNCK; BELIE; VERSTRAETE, 2010; WANG, Z. *et al.*, 2017).

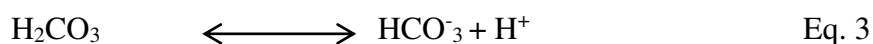
A atividade da uréase é encontrada em uma ampla gama de microrganismos, principalmente nos gêneros *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium* e *Desulfotomaculum*. Algumas espécies produzem níveis particularmente elevados de urease, a exemplo de *Sporosarcina pasteurii* (anteriormente *Bacillus pasteurii*) e por isto é muito utilizada para induzir a precipitação de calcita (MUJAH, *et al.*, 2016; MUYNCK *et al.*, 2010).

2.3. MECANISMO DE PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CALCIO

A enzima urease catalisa a hidrólise da uréia em amônio e carbonato. Nessa reação, um mol de uréia é hidrolisada para um mol de amônia e um mol de ácido carbâmico (Eq. 1), que é hidrolisada espontaneamente para outro mol de amônia e ácido carbônico (Eq. 2).



Esses dois produtos (NH_3 e H_2CO_3) são mais equilibrados em água para formar bicarbonato (Eq. 3) e dois moles de amônio e de íons hidróxido (Eq. 4). Os íons hidróxido resultam em um aumento de pH, que pode mudar o equilíbrio do bicarbonato, resultando na formação de carbonato (Eq. 5). Essa mudança pode então precipitar os íons metálicos.



A geração de NH_4^+ aumenta o pH local e a reação continua espontaneamente para formar carbonato de cálcio (ANBU et al., 2016).

2.4. POLIMORFISMO DE CRISTAIS DE CARBONATO DE CALCIO

O carbonato de cálcio induzido microbiologicamente pode resultar em diferentes fases de CaCO_3 ; calcita, aragonita e vaterita três polimorfos anidros, dois fases cristalinas hidratadas: monohidrocalcita ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e ikaíta ($\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e várias fases amorfas (ACC) com diferenças no grau de hidratação (DHAMI, N.; REDDY; MUKHERJEE, 2013a). A calcita e a vaterita são os cristais mais comuns e estáveis, induzidos por bactérias ureolíticas, já a aragonita é metaestável. A produção desses polimorfos dependem de seus ambientes de cultivo, de as cepas bacterianas, o pH e a temperatura (WEI et al., 2015).

Diversos estudos evidenciam que o tipo de bactérias influencia na precipitação dos diferentes polimorfos de carbonato de cálcio. A calcita por exemplo, é formada por MICP por bactérias como *Sporosarcina sp.* (WEI et al., 2015; WHIFFIN; VAN PAASSEN; HARKES, 2007), *B. firmus* e *B. Sphaericus* (ERCOLE et al., 2007), *Bacillus subtilis* e *B. cerus* (DHAMI, N.; REDDY; MUKHERJEE, 2013a), entre outras. Microrganismos como *B.thuringiensis* induzem principalmente a formação de vaterita (DHAMI, N. K.; REDDY; MUKHERJEE, 2013), assim como, *Lysinibacillus sp.* (LV et al., 2017) e *S. pasteurii* (MALEKI et al., 2016).

Além dos microrganismos, outros fatores têm sido avaliados para identificar a predominância da precipitação de diferentes tipos de cristais de carbonatos de cálcio. zhang; Guo e Cheng,(2015), avaliaram o efeito da MICP nas propriedades mecânicas do solo utilizando diferentes fonte de cálcio com *Sporosarcina pasteurii*, é identificaram que cloreto de cálcio e o nitrato de cálcio favorecem a precipitação de calcita, enquanto que

o acetato de cálcio facilita a precipitação de aragonita. Assim, fatores como a cepa bacteriana, a fonte de cálcio, a temperatura, a presença de íons de sulfato e cromato, podem influenciar na formação de polimorfos de carbonato de cálcio (ACHAL; PAN, 2014; GONZÁLEZ-LÓPEZ; FERNANDEZ-GONZALES; JIMENEZ, 2012; ZHANG; GUO; CHENG, 2014, 2015).

2.5. A MICP NA ESTABILIZAÇÃO DE SOLOS

O tratamento microbiano no solo consiste em usar a precipitação de carbonato de cálcio para produzir ligações e cimentação no solo, a fim de aumentar a resistência ao cisalhamento e/ou preencher os poros do solo para reduzir a condutividade da água. De acordo com os resultados e métodos aplicados no processo, vários termos são utilizados: quando o tratamento de MICP aumenta a resistência ao cisalhamento o processo é denominado “*biocimentação*”; se o efeito é reduzir a permeabilidade do solo é denominado “*bioclogging*” (Figura 2.1). Normalmente, os materiais de ligação para produzir biocimentação também reduzirão a permeabilidade do solo ao mesmo tempo devido à redução no espaço poroso. No entanto, existem biocimentos que produzirão apenas biocimentação e outros bioclogging. A MICP no solo, pode ser realizada em laboratório ou em situ, se for feito em situ o tratamento é denominado “*biogrouting*” (CHU et al., 2015).

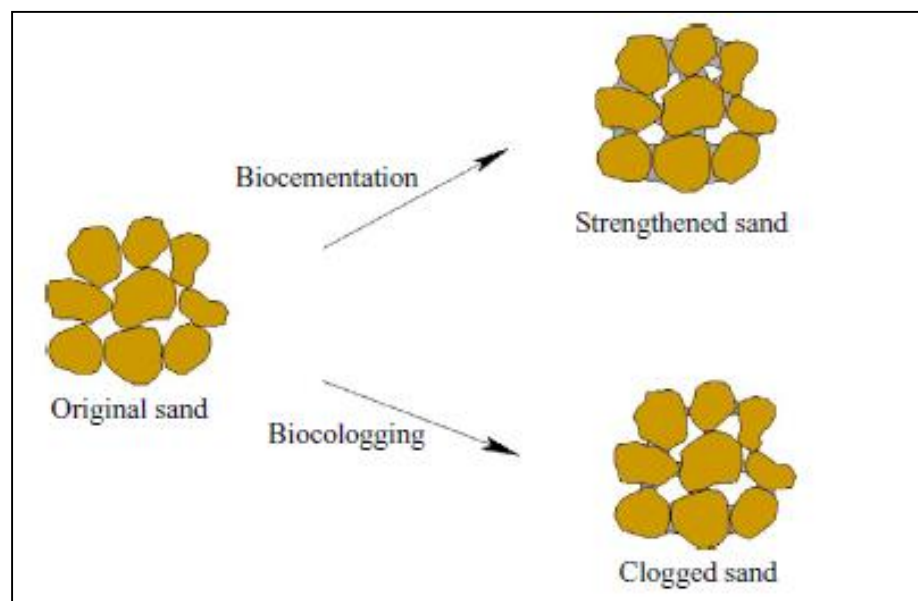


Figura 2-1. Ilustração esquemática do processo de biocimentação e bioclogging. Fonte (CHU et al. 2015).

O processo precipita cristais de CaCO_3 nos grãos do solo, reduzindo a porosidade e aumentando a resistência do material. O processo microbiológico depende de bactérias ureolíticas (não patogênicas), é comum no ambiente, o que faz com que o tratamento in situ do solo, provavelmente não necessite da introdução de bactérias que não sejam nativas, sendo essa uma vantagem para o processo (SHAHRONKHI-SHAHRAKI et al., 2015).

A MICP utilizada na estabilização de solos é um procedimento complexo, pois involucra processos microbiológicos, interação com os minerais do solo que podem gerar diferentes reações químicas, interação com partículas de solo e suas propriedades físico-químicas, além de fatores ambientais. O estudo destes fatores são os principais objetivos das pesquisas na precipitação de carbonato de cálcio, pois ainda não há uma metodologia eficiente definida para sua aplicação em campo.

Nesse contexto, alguns estudos tem sido realizados para avalia fatores como a atividade ureolítica de microrganismos, a redução da permeabilidade em solos tratados, (IVANOV; CHU, 2008; WHIFFIN; VAN PAASSEN; HARKES, 2007); o efeito nas concentrações de soluções de cálcio (CHU; STABNIKOV; IVANOV, 2012), o efeito na resistência ao cisalhamento, a rigidez de solo, o tamanho das partículas do solo no volume dos cristais e o grau de saturação nas propriedades geotécnicas dos solos tratados (CHENG, LIANG; CORD-RUWISCH; SHAHIN, 2013b; HARKES et al., 2010; MONTOYA; DEJONG, 2015).

Os resultados de pesquisas anteriores mostram que a MICP é eficiente e pode aumentar a resistência mecânica do solo, convertendo-se em uma metodologia potencial para diversas aplicações da geotecnia. No entanto, é um processo novo que ainda está na fase experimental, sendo necessário avaliar os diferentes fatores que interferem e de igual maneira, é indispensável definir uma metodologia de aplicação em campo, que seja eficiente e que seja economicamente viável.

2.6. FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DO MICP

As características dos cristais de carbonato de cálcio (tamanho, forma e distribuição) são fundamentais para melhorar as propriedades dos solos tratados com MICP. Isso ocorre porque diferentes tamanhos, formas e padrões de distribuição de precipitação de CaCO_3 podem produzir diferentes respostas de força de solos (MUJAH; SHAHIN; CHENG, 2016). A variação desses cristais é dada por os diferentes fatores que intervêm

no processo, tais como a temperatura, a atividade ureolítica, a disponibilidade de locais de nucleação, o pH, o grau de saturação e a concentração da solução de cimentação (MUJAH; SHAHIN; CHENG, 2016).

Fatores como a concentração inicial de ureia, de carbonato de cálcio e de células bacterianas foram avaliadas por Okwadha; Le (2010), para analisar o efeito na quantidade de carbonato de cálcio precipitado. O experimento realizado com *Sporosarcina pasteurii* a uma temperatura constante de 25° C, indicaram que a maior concentração de cálcio e de células bacterianas, maior formação de cristais. Os autores destacaram que a maior eficiência obtida nas condições experimentais, foi quando se injetaram 666 mM de uréia e 250 mM de Ca^{2+} a $2,3 \times 10^8$ células mL^{-1} de concentração de células bacterianas.

O volume de suspensão bacteriana é também um dos fatores que intervêm na eficiência da MICP. Esse fator foi avaliado por Rowshanbakht et al., (2016) em colunas de solos arenosos, testando três volumes diferentes de suspensão de *Sporosarcina pasteurii*. Os resultados indicaram que a maior volume de injeção de suspensão bacteriana (100% do volume dos poros), maior perda de bactérias e atividade ureolítica na coluna. A maior eficiência de injeção foi encontrada quando a suspensão bacteriana é um terço do volume dos poros.

Dependendo das condições experimentais utilizadas, da cepa bacteriana, do tipo de solo, etc, a eficiência do processo pode variar; isso faz necessário que sejam avaliados os diferentes fatores que podem alterar os resultados esperados na precipitação de carbonato de cálcio com fins de estabilização de solos.

2.7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ACHAL, V.; PAN, X. Influence of calcium sources on microbially induced calcium carbonate precipitation by *Bacillus* sp. CR2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 173, n. 1, p. 307–317, 2014.

AFRIN, H. A Review on Different Types Soil Stabilization Techniques. *International Journal of Transportation Engineering and Technology*, v. 3, n. 2, p. 19–24, 2017.

ANBU, P. *et al.* Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *SpringerPlus*, v. 5, n. 1, 2016.

BESSLER, K. E.; RODRIGUES, L. C. Os polimorfos de carbonato de cálcio - Uma síntese fácil de aragonita. *Quimica Nova*, v. 31, n. 1, p. 178–180, 2008.

BRENNAN, S.; LOWENSTEIN, T.; HORITA, J. Seawater chemistry and the advent of biocalcification. *Geology*, v. 32, n. 6, p. 473–476, 2004.

CARMONA, J.; OLIVEIRA, P.; LEMOS, L. Biostabilization of a Sandy Soil Using Enzymatic Calcium Carbonate Precipitation. *Procedia Engineering*, v. 143, p. 1301–1308, 2016.

CHENG, L.; CORD-RUWISCH, R.; SHAHIN, M. A. Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation at various degrees of saturation. *Canadian Geotechnical Journal*, v. 50, p. 81–90, 2013.

CHU, J. *et al.* Use of Biogeotechnologies for Soil Improvement. *Ground Improvement Case Histories: Compaction, Grouting and Geosynthetics provides*. 1. ed. Ed. Butterworth-Heinemann, 2015. p. 569–589.

CHU, J.; STABNIKOV, V.; IVANOV, V. Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation on Surface or in the Bulk of Soil. *Geomicrobiology Journal*, v. 29, n. 6, p. 544–549, 2012.

DHAMI, N.; REDDY, M.; MUKHERJEE, A. Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in microbiology*, v. 4, p. 1–13, 2013.

DHAMI, N.; REDDY, M.; MUKHERJEE, A. Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n. 5, p. 707–714, 2013a.

ERCOLE, C. *et al.* Bacterially induced mineralization of calcium carbonate: The role of exopolysaccharides and capsular polysaccharides. *Microscopy and Microanalysis*, v. 13, n. 1, p. 42–50, 2007.

GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.; FERNANDEZ-GONZALES, A.; JIMENEZ, A. Influencia

del Co^{2+} en el Polimorfismo del CaCO_3 . *Revista de la Sociedad Española de Mineralogía*, v. 16, p. 174–175, 2012.

HARKES, M. P. *et al.* Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement. *Ecological Engineering*, v. 36, n. 2, p. 112–117, 2010.

IVANOV, V.; CHU, J. Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 7, p. 139–153, 2008.

LV, J. *et al.* Vaterite induced by *Lysinibacillus* sp . GW-2 strain and its stability. *Journal of Structural Biology*, p. 1–9, 2017.

MACHADO, C. C. *et al.* Classificação tecnológica de solos e resíduos industriais. *Revista Árvore*, v. 27, n. 5, p. 657–668, 2003.

MACHADO, CARLOS. *Estradas rurais e florestais*. Viçosa: Editora UFV, 2013.

MALEKI, M. *et al.* Performance of microbial-induced carbonate precipitation on wind erosion control of sandy soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 13, n. 3, p. 937–944, 2016.

MONTOYA, B. M.; DEJONG, J. T. Stress-strain behavior of sands cemented by microbially induced calcite precipitation. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, p. 1–10, 2015.

MUJAH, D.; SHAHIN, M. A.; CHENG, L. State-of-the-art review of biocementation by microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. *Geomicrobiology Journal*, v. 0451, p. 1–14, 2016.

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

OKWADHA, G. D. O.; LI, J. Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. *Chemosphere*, v. 81, p. 1143–1148, 2010.

ROWSHANBAKHT, K. *et al.* Effect of injected bacterial suspension volume and relative density on carbonate precipitation resulting from microbial treatment. *Ecological Engineering*, v. 89, p. 49–55, 2016.

SHAHRONKHI-SHAHRAKI, R. *et al.* Improving sand with microbial-induced carbonate precipitation. *Proceedings of the Institution of Civil Engineers Ground Improvement* 2, v. 168, n. 3, p. 217–230, 2015.

STOCKS-FISCHER, S.; GALINAT, J. K.; BANG, S. S. Microbiological precipitation of CaCO_3 . *Soil Biology and Biochemistry*, v. 31, n. 11, p. 1563–1571, 1999.

WANG, Z. *et al.* Review of Ground Improvement Using Microbial Induced

Carbonate Precipitation (MICP). *Marine Georesources & Geotechnology*, v. 35, p. 1135–1146, 2017.

WEI, S. *et al.* Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments. *Brazilian journal of microbiology*, v. 46, n. 2, p. 455–464, 2015.

WHIFFIN, V. S.; VAN PAASSEN, L. A.; HARKES, M. P. Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiology Journal*, v. 24, n. 5, p. 417–423, 2007.

ZHANG, Y.; GUO, H. X.; CHENG, X. H. Influences of calcium sources on microbially induced carbonate precipitation in porous media. *Materials research Innovations*, v. 18, p. 79–84, 2014.

ZHANG, Y.; GUO, H. X.; CHENG, X. H. Role of calcium sources in the strength and microstructure of microbial mortar. *Construction and Building Materials*, v. 77, p. 160–167, 2015.

3. CAPITULO 2: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE *Serratia ureolytica* PARA PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CALCIO

3.1. INTRODUÇÃO

A precipitação de carbonato de cálcio induzido microbiologicamente (MICP) refere-se a formação de carbonato de cálcio a partir de uma solução supersaturada, favorecida pela presença de células metabolicamente ativas, além de soluções de cálcio e ureia (MUYNCK; BELIE; VERSTRAETE, 2010). No processo, as células bacterianas produzem a enzima uréase para hidrolisar a ureia, resultando na liberação de amônio (NH_4^+) e carbonato (CO_3^{2-}), a reação provoca um aumento no pH facilitando a formação de minerais carbonato de cálcio (MARTINEZ, B. C. et al., 2013; SHARMA; R., 2016; WANG, Z. et al., 2017) .

A MICP tem sido objeto de diversos estudos, principalmente, no tratamento de solos, como proposta metodológica para melhorar as suas propriedades geotécnicas ao induzir a diminuição dos espaços porosos e aumentar o conteúdo de sólidos (MARTINEZ; BARKOUKI, 2011). Pesquisas desenvolvidas com areias indicam que o processo reduz a permeabilidade (CHU; STABNIKOV; IVANOV, 2012), melhora a resistência ao cisalhamento e reduz a condutividade hidráulica (KIM; YOUN, 2016; SHAHRONKHI-SHAHRAKI et al., 2015; SHARMA; R., 2016; SOON et al., 2013).

O processo envolve atividades metabólicas dos microrganismos e reações químicas que o tornam complexo e pode ser afetado por diversos fatores. Umar et al. (2016) indicam que fatores como temperatura, concentração de células bacterianas, tipo de bactérias, salinidade e pH do meio, concentração de íons de cálcio, disponibilidade de locais de nucleação, mineralogia e tamanhos das partículas minerais influenciam na precipitação de carbonato de cálcio. No entanto, estudos que avaliam o efeito desses fatores ainda são escassos.

Entre os fatores mencionados, o tipo de bactéria é determinante na precipitação de carbonato de cálcio, pois é a encarregada da produção de uréase, necessária para catalisar a hidrólise da ureia (ANBU et al., 2016). Diversos microrganismos apresentam a enzima, mas alguns produzem níveis elevados, tais como *Sporosarcina pasteurii*, amplamente estudada na MICP para melhorar as propriedades mecânicas do solo (MARTINEZ et al.,

2013; SHAHRONKHI-SHAHRAKI et al., 2014; SHARMA; R., 2016; WHIFFIN; VAN PAASSEN; HARKES, 2007). Outros microrganismos, como *Bacillus megaterium* (SOON et al., 2013) e *Bacillus sphaericus* (CHENG, LIANG; CORD-RUWISCH; SHAHIN, 2013b) também foram estudados e se mostraram eficientes no processo.

Kim e Youn (2016) compararam a atividade da urease e a precipitação de carbonato de cálcio entre *Sporosarcina pasteurii* e isolados de *B. lentus*, *Sporosarcina sp.*, *S. saprophyticus* e *S. globispor.* Os resultados indicaram que os quatro isolados analisados apresentaram maior atividade da urease quando comparados com a *S. pasteurii*. Neste sentido, identificar e caracterizar microrganismos eficientes para precipitação de carbonato de cálcio é um aporte importante no estudo da MICP, pois podem ser identificados microrganismos com alta produção de urease que possam otimizar o processo.

Por isto, o objetivo deste estudo foi isolar, identificar e caracterizar microrganismos ureolíticos eficientes com potencial aplicação em MICP, além de otimizar as condições de produção de urease por um dos isolados.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Isolamento e seleção de microrganismos ureolíticos para precipitação de calcita

Amostras de solo foram coletadas em duas áreas de pastagem na zona rural de Viçosa, MG-Brasil, para isolamento de microrganismos urease positivos. Cada amostra de solo de 0,5g foi adicionada em 10 mL de meio TSB + Ureia (0,8 g/10mL) e incubada em agitador orbital durante 24 h a 200 r.p.m e 30°C. Após este tempo, as amostras foram diluídas em série (10^{-1} até 10^{-9}) em solução salina estéril (NaCl 0,85%).

A diluição seriada foi plaqueada em meio TSA-Ureia contendo 40g/L de TSA; 1,33 M de ureia e 15 g/L de ágar e encubadas a 30°C por 2 a 3 dias. Após o surgimento de colônias 160 foram selecionadas ao acaso (80 colônias de cada amostra de solo) e inoculadas em meio TSA-Ureia, contendo 0,012 g/L de vermelho de fenol (como indicador de pH), com pH ajustado em 6,2.

A seleção de microrganismos ureolíticos foi feita pela avaliação do aumento do pH ao redor das colônias, resultante da atividade da uréase. Na hidrólise da ureia, os microrganismos sintetizam a enzima urease para catalisar a degradação da ureia (presente no meio de cultivo) e produzir CO₂ e NH₃, à medida que a hidrólise resulta em amônio

(NH_4^+) e carbonato (CO_3^{2-}) o pH aumenta criando um microambiente alcalino ao redor da célula (STOCKS-FISCHER; GALINAT; BANG, 1999).

O vermelho de fenol resulta em uma coloração avermelhada ao redor da colônia do microrganismo quando o pH fica acima de 8.1. Com base nessa reação, selecionou-se os isolados que apresentaram os maiores halos de cor vermelho ao redor das colônias. A avaliação do diâmetro do halo foi feita às 24 h após a inoculação. Esses isolados foram posteriormente submetidos à avaliação da atividade ureolítica em três meios de cultura e diferentes valores de pH (8,9, 9,5, 10.5 e 11).

3.2.2 Meio de cultura

Três meios de cultura foram avaliados para se determinar o efeito na atividade ureolítica. Os meios continham uma solução básica (20 g/L de extrato de levedura e 0,1 mM de NiCl_2), variando porém quanto a fonte de nitrogênio. O meio M.U continha 170mM de Ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$); o meio M.Sa continha 170mM de sulfato de amônio (NH_4)₂ SO_4) e o meio M.USa continha 170mM equimolar de Ureia e Sulfato de amônio.

Três testes foram realizados, sendo que no primeiro se avaliou a atividade ureolítica durante 36 h, registrando-se leituras em intervalos iguais de tempo (12 h) a partir do crescimento do inóculo. No segundo teste, a avaliação foi feita durante 216 h, registrando-se leituras em intervalos de 24 h e o terceiro teste foi avaliado por 96 h registrando-se valores a cada 24h.

3.2.3 Atividade ureolítica

A atividade ureolítica foi determinada em função da condutividade elétrica, seguindo a metodologia proposta por Whiffin et al. (2007), que considera um incremento da condutividade elétrica em condições padrão, uma vez que a reação de hidrólise resulta no íon NH_4^+ .

Adicionou-se 1 mL de solução bacteriana em 5 mL de solução de ureia a 3 M e 4 mL de água destilada, registrando-se a variação de condutividade durante 5 minutos a 25°C. A atividade ureolítica foi determinada considerando-se a diluição de 1/10 (WHIFFIN, et al., (2007). Uma unidade da atividade ureolítica (U) é definida como a quantidade da enzima que degrada 1 μmol de ureia por minuto a 25 °C.

3.2.4 Avaliação do efeito do pH sobre a atividade ureolítica

Para se determinar o efeito do pH na atividade ureolítica e no meio de cultura, foram testados cinco valores de pH (8; 9; 9,5; 10,5; 11) nos meios M.U e M.Sa. A atividade ureolítica do isolado selecionado foi avaliada durante 96 h, registrando-se as leituras em intervalos de tempo de 24 h.

3.2.5 Avaliação da Temperatura

O efeito da temperatura foi avaliado determinando-se a atividade ureolítica em três temperaturas (25, 30 e 35°C), registrando-se as leituras durante 52 horas. O microrganismo foi incubado no meio de cultura e pH estabelecidos como ótimos nos experimentos anteriores.

Uma curva de calibração foi necessária para se determinar a atividade ureolítica nas temperaturas de 30 e 35°C (Anexo A), considerando-se que a metodologia proposta por Whiffin et al. (2007) foi desenvolvida para se trabalhar a 25°C.

3.2.6 Identificação do isolado por sequenciamento parcial do rDNA 16S

A extração do DNA total da cultura foi realizada por protocolo simplificado de extração de DNA baseado em lise térmica (MOORE et al., 2004), adaptado por Boniek et al. (2010). A amplificação do fragmento parcial do rDNA 16S foi realizada utilizando-se *primers* universais para Bactéria 5F (5' – TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCA – 3') e 531 R (5' TACCGCGGCTGCTGGCAC- 3') (HALL et al., 2003). A reação de amplificação (PCR) foi efetuada em termociclador (Master Gradient, Eppendorf-Germany). Os produtos resultantes da reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (12 g/L), em tampão TAE 0,5 X e foram purificados com o KIT ilustra TM GFXTM PCR DNA e Gel *Band Purification* (GE Healthcare). O produto purificado foi enviado para sequenciamento pela empresa Myleus Biotecnologia (BR). Finalmente a sequência nucleotídica foi comparada com aquelas armazenadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e o alinhamento das bases foi realizado com o auxílio do algoritmo BLAST.

3.2.7 Estabelecimento da relação entre densidade óptica (D.O) e massa de células (mg/mL)

A densidade óptica (DO) foi usada como um indicador da concentração de biomassa necessária para gerar a curva de crescimento e a determinação da atividade específica da

uréase. Para isso, a cultura foi incubada até se obter uma D.O de 4; diluições foram realizadas para se preparar suspensões celulares e posteriormente determinar os valores de D.O, secagem em estufa e determinação de massa seca. A D.O foi determinada utilizando um espectrofotômetro *Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis* a um comprimento de onda de 600 nm.

A atividade específica foi obtida pela relação entre a atividade ureolítica e a biomassa seca por unidade de volume. A avaliação da atividade ureolítica foi feita em intervalos de tempo de 12 horas durante 76 horas. Simultaneamente foi avaliada a densidade óptica para se estimar a massa de células por unidade de volume (mg/mL).

A biomassa seca foi obtida ajustando-se uma regressão linear entre valores de biomassa seca determinada para diferentes concentrações de célula e a densidade óptica respectiva (Anexo B). Três repetições foram realizadas para cada experimento.

3.2.8 Microscopia óptica

A formação de cristais de carbonato de cálcio resultante da atividade ureolítica e subsequente reação do HCO_3 com o cálcio foi analisada por microscopia óptica. Para isso, uma solução foi preparada contendo 0,5 mL de suspensão bacterina (obtida nas condições ótimas definidas nesse estudo) e 1mL de uma solução cimentante (1 M CaCl_2 e 1M de Ureia) para induzir a MICP. Uma amostra do precipitado foi coletada para preparação das lâminas e análise de microscópico.

3.2.9 Desenho experimental e análise de dados

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC). O efeito do meio de cultura foi analisado como um experimento fatorial de 3 X 2, que consiste em três meios (M.U, M.Sa e M.USa) e dois isolados (#70 e #147), com três repetições. O efeito do pH foi analisado como um experimento fatorial 2 X 5 que consiste em dois meios (M.U, M.Sa) e cinco valores de pH (8; 9; 9,5; 10,5 e 11), com 4 repetições. A avaliação da temperatura foi feita pela análise de um fator com três repetições. Todos os parâmetros foram analisados por análise de variância (ANOVA) e as mídias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) usando-se o software MiniTab (Versão 18).

3.3. RESULTADOS

3.3.1 Isolamento e seleção de microrganismos

Foram avaliadas 160 colônias isoladas de duas amostras de solos, com base no pH do meio de cultura resultante da hidrólise da ureia. Nessa avaliação foram selecionados 22 isolados, sendo 11 de cada uma das amostras de solo estudadas. O critério da seleção foi a presença de halos de hidrólise maiores ou iguais a 4,5 cm após 24 horas da inoculação.

Os 22 isolados selecionados que apresentaram maior alteração do pH foram novamente avaliados. Os testes foram feitos 12 horas após a inoculação, registrando as leituras em intervalos de tempo de 1 hora e durante 9 horas (Figura 3.1). Após este período, os isolados que apresentaram maior atividade ureolítica, medida pela alteração do pH (diâmetro do halo), e no menor tempo, foram selecionados para continuar com as avaliações (isolados #9, 54, 70, 147, 153, 154,160).

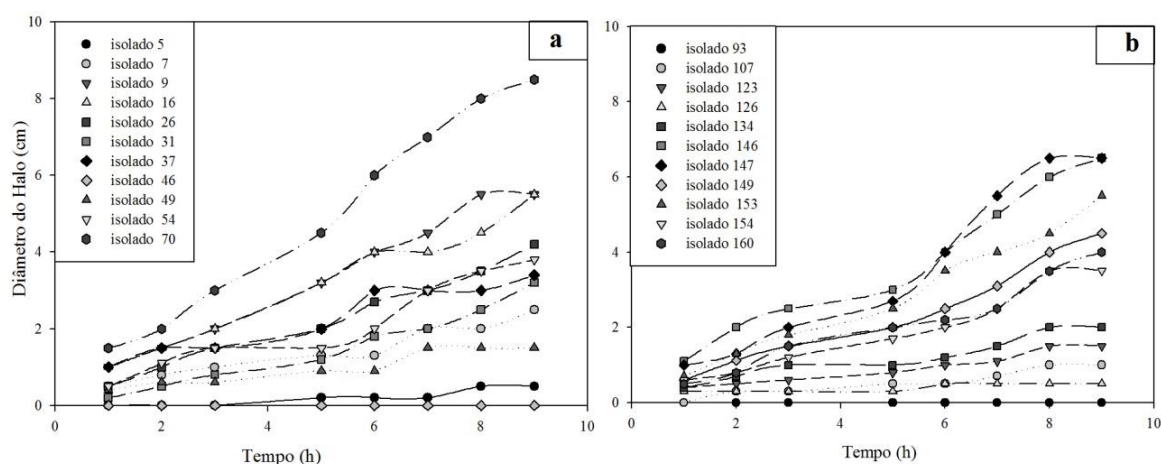


Figura 3-1 Avaliação do diâmetro do halo em intervalos de tempo. a) Isolados amostras do solo A; b) Isolados amostras do solo B

3.3.2 Efeito da fonte de nitrogênio sobre a atividade ureolítica

A atividade ureolítica dos isolados #9, 54, 70, 147, 153, 154 e 160 foi determinada nos três meios de cultura avaliados. Os valores mais elevados de hidrólise de ureia foram obtidos com o isolado #70 (77, 59 e 49 mM de ureia hidrolisada/min nos meios M.U, M.Sa e M.USa respectivamente). Em seguida, destacou-se o isolado #147 que, no entanto, apresentou atividade ureolítica máxima cerca de 50% inferior ao isolado #77 (Figura 3.2).

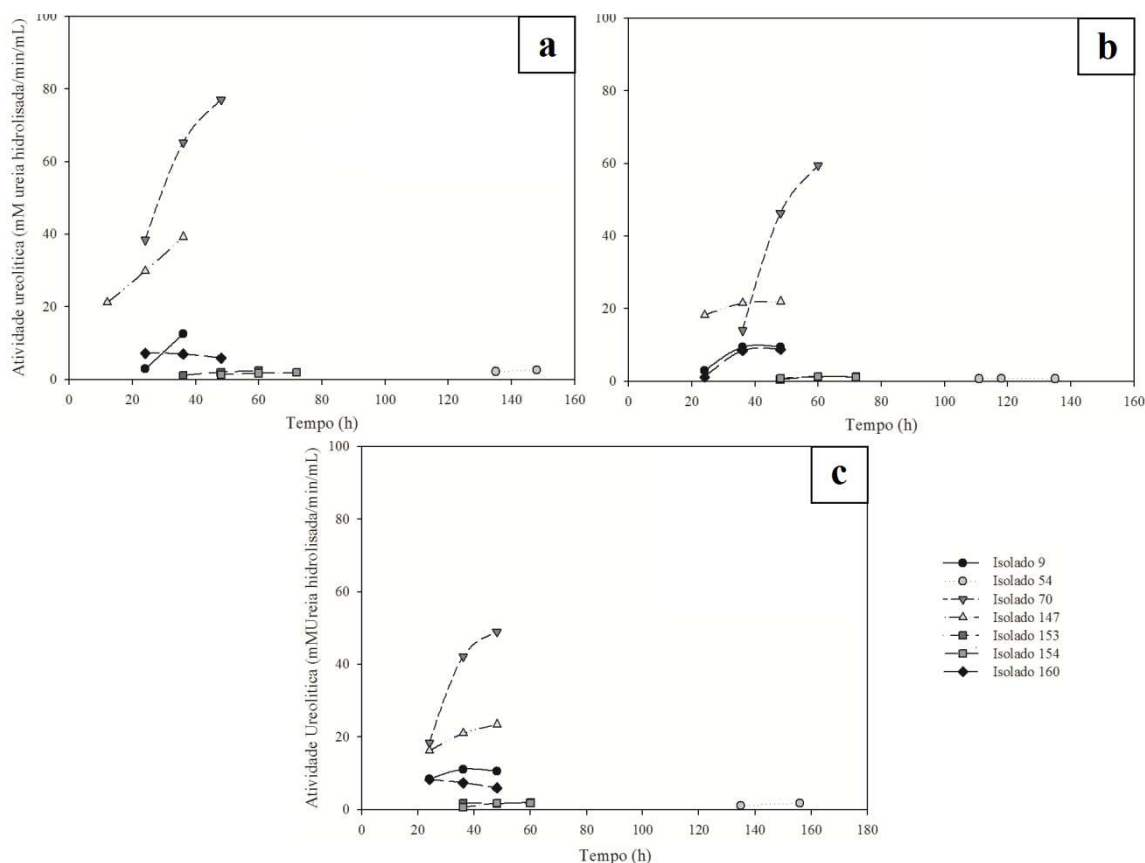


Figura 3-2. Avaliação da atividade ureolítica no tempo, para sete isolados em três meios de cultura: a) Meio M.U, B) Meio M.Sa, c) Meio M.USa

Os isolados #9 e #160 apresentaram atividades ureolíticas inferiores a 13 mM de ureia hidrolisada/min nos três meios. Ainda que esse valor de atividade de urease seja baixo, comparativamente aos obtidos com os isolados #70 e #147, são ainda potencialmente adequados para utilização em MICP, pois a literatura reporta que a atividade ureolítica de diversos microrganismos para precipitação de carbonato de cálcio com fins de melhoras de solo se encontram entre 4 a 50 mM de ureia/min (MUJAH; SHAHIN; CHENG, 2016). Já a atividade ureolítica dos isolados #54, #153, #154 foram inferiores a 3mM de ureia hidrolisada/min, sendo os menores, por tanto, considerados pouco eficientes para a precipitação de calcita. Os isolados #70 e #147 foram selecionados para continuar com os testes de seleção e otimização.

Um novo experimento com os isolados #70 e #147 foi realizado para se identificar o isolado com maior atividade ureolítica e o efeito no meio de cultura, avaliando-se a atividade ureolítica máxima registrada durante 216 h de incubação. Os resultados foram analisados estatisticamente e houve diferença significativa entre os isolados, os meios de cultura e a interação ($p < 0,05$).

A comparação de médias pelo teste de Tukey identificou que o isolado #70 registrou maior atividade que o isolado #147. Destacando-se ainda que a atividade ureolítica do primeiro foi maior no meio M.Sa do que nos demais meios de cultura. A atividade ureolítica do isolado #147 não diferiu quando o mesmo foi cultivado nos três meios de cultura avaliados (Tabela 3-1).

Tabela 3-1. Atividades ureolíticas máxima registrada para cada isolado em três meios de cultura. Letras em maiúscula (A,B) indicam a diferença significativa entre isolados e as letras em minúscula(a,b,c) indicam a diferença significativa entre meios ($p < 0,05$).

Isolado	Meio de cultura	Atividade Ureolítica (mM de ureia hidrol./min)
#70	Ureia	67Ab
	Sulfato	98 Aa
	Ureia-Sulfato	67 Ab
#147	Ureia	45Bc
	Sulfato	36Bc
	Ureia-Sulfato	38Bc

O isolado #70 foi selecionado para continuar com as avaliações, por ter apresentado a maior atividade ureolítica. Conduziu-se então um novo experimento, visando avaliar o efeito do pH sobre a atividade ureolítica, nesse novo experimento, avaliaram-se somente os meios M.U e M.Sa.

3.3.3 Efeito do pH sobre a atividade ureolítica

. Os maiores valores de atividade foram obtidos com 24 h após a inoculação, para todos os valores de pH e nos dois meios de cultura (Fig. 3-3). Diferenças significativas foram determinadas entre os meios de cultura e entre os cinco valores de pH testados ($p < 0,05$).

A atividade ureolítica do isolado #70 cultivado em meio M.U manteve-se elevada em toda a faixa de pH avaliada, apresentando um pico de atividade no pH 10,5 (fig. 3-3c). No meio M.Sa, a atividade ureolítica decresceu com o aumento do pH, sendo completamente inibida quando o cultivo se deu em valores de $pH \geq 10,5$ (fig. 3-3d). Isso pode indicar que o microrganismo expressa diferentes uréases, dependendo da fonte de nitrogênio fornecida.

A análise dos dados experimentais indicou que o meio M.U com pH 10,5 propicia condições adequadas para se obter atividades ureolíticas elevadas com o isolado #70. É

importante destacar que, em termos de custos o meio M.U é mais econômico do que o meio M.Sa.

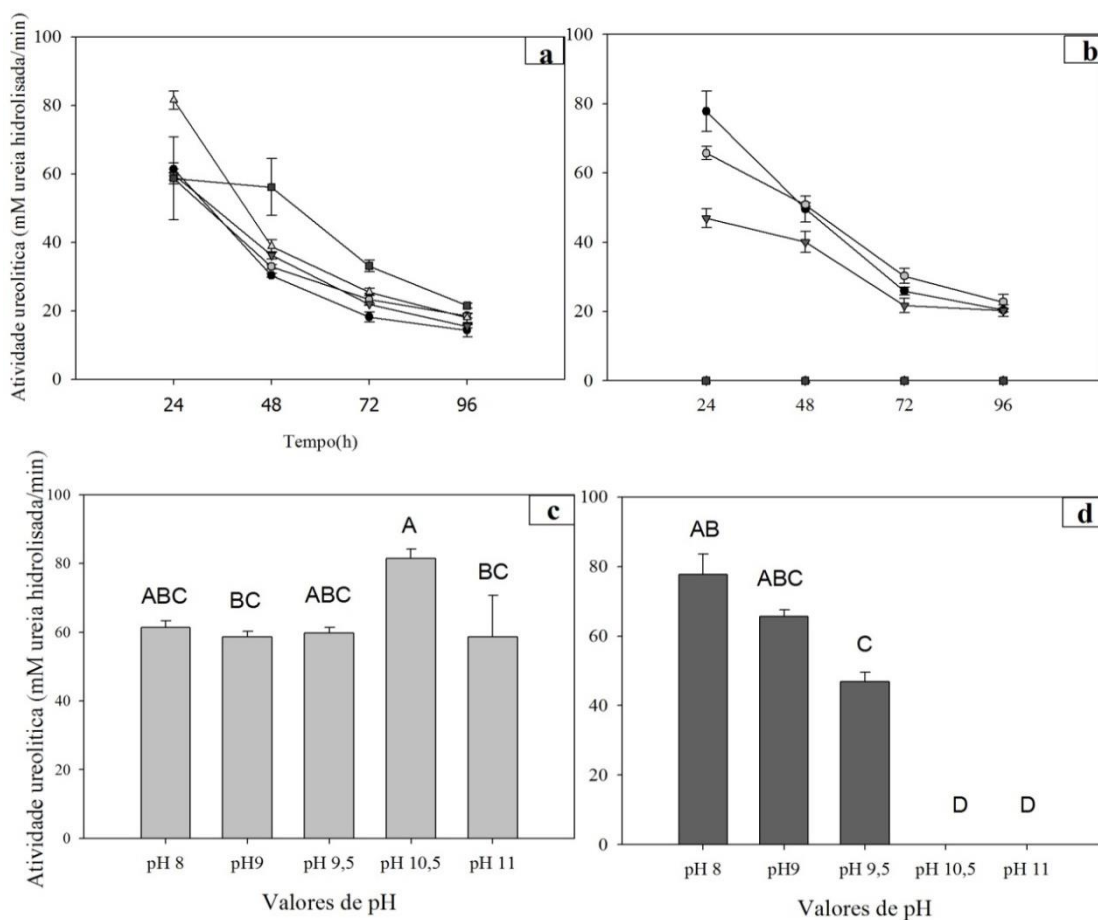


Figura 3-3. Efeito do pH sobre a atividade ureolítica do isolado #70 em dois meios de cultura a) meio M.U; b) meio M.Sa; c) Comparação de médias de atividade ureolítica no meio M.U, no tempo de 24 horas; d) Comparação de médias de atividade ureolítica no meio M.Sa no tempo 24 horas. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao 5%.

3.3.4 Efeito da temperatura sobre a atividade ureolítica

O efeito da temperatura de cultivo sobre a atividade ureolítica foi determinado considerando-se a atividade máxima registrada no tempo. Os valores máximos de atividade foram obtidos em diferentes intervalos de tempo para cada temperatura. A 35°C, o tempo necessário para se alcançar a atividade máxima foi 4 horas superior ao obtido na incubação a 30°C e 8 horas superior ao obtido na incubação a 25°C. A análise de variância identificou diferença significativa entre as temperaturas. A maior atividade ureolítica foi obtida na temperatura de 35°C (Figura 3-4).

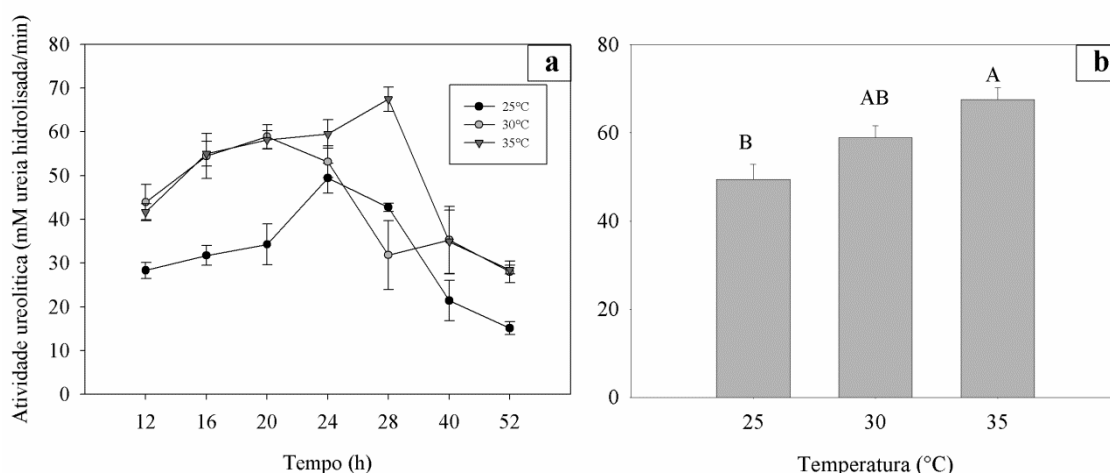


Figura 3-4 .Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade ureolítica do isolado #70. a) Atividade ureolítica determinadas em intervalos de tempo; b) Comparação de médias da atividade ureolítica máxima em função da temperatura. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5%.

3.3.5 Identificação do isolado por sequenciamento parcial do rDNA 16S

Os resultados da identificação do isolado #70 pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA mostraram identidade de 99% com as espécies *Serratia marcescens* e *Serratia ureilytica*. Uma vez que só a espécie *S. ureilytica* contém a enzima urease. Concluímos que o isolado #70 pertence a espécie *S. ureilytica*, a qual foi recentemente descrita por (BHADRA,2005). O isolado foi registrado na coleção de cultivos do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o meio ambiente como *Serratia. ureilytica* LBBMA70

3.3.6 Atividade específica da uréase

A atividade específica da uréase no isolado *S. ureilytica* LBBMA70 foi praticamente invariável durante o cultivo em meio M.U, oscilando entre 30 a 35 mM de ureia hidrolisada /min/mg de massa. A elevação da atividade específica ocorre entre 24 e 50 horas após a inoculação e depois começa a descer (Figura 3-5).

Por outro lado, a atividade ureolítica varia no tempo, estando associado a concentração de células, evidenciando um aumento entre as 12 e 36 horas.

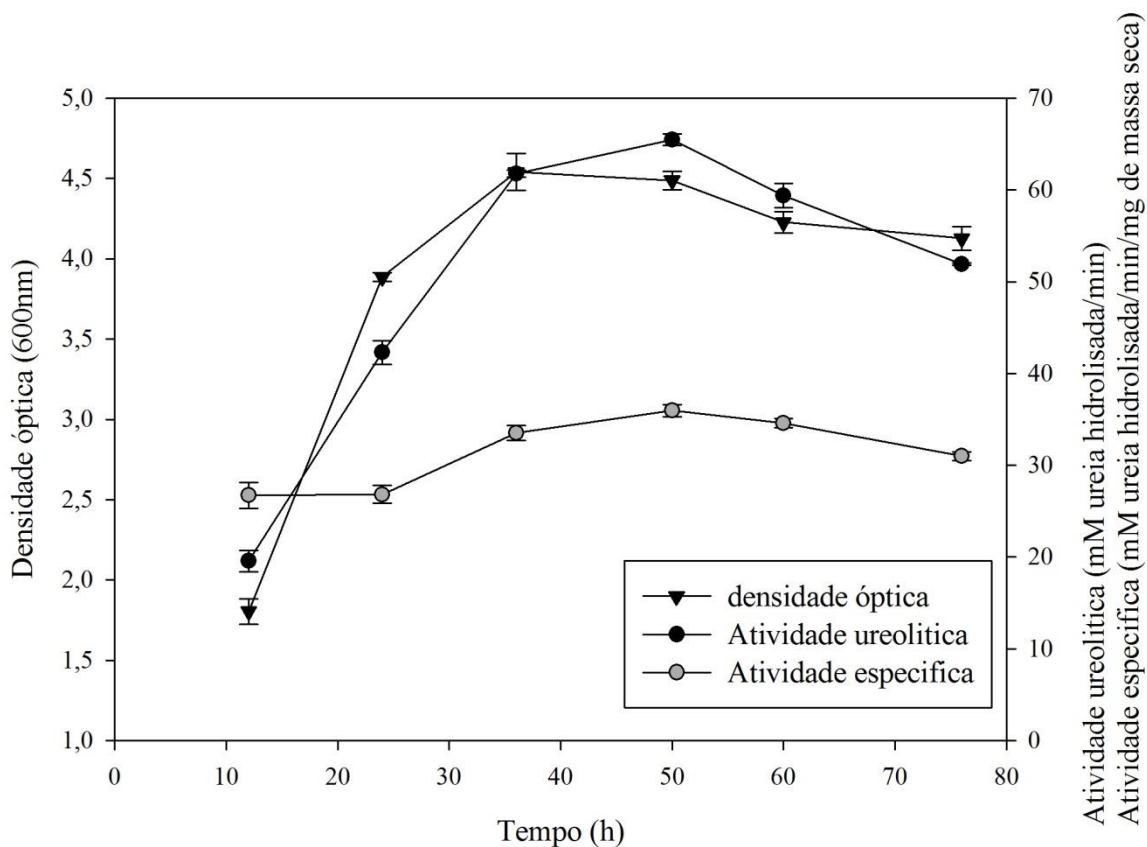


Figura 3-5. Atividade específica, atividade ureolítica, e densidade óptica determinadas para *S. ureilytica* no tempo.

3.3.7 Análise microscópica de cristais de CaCO_3 obtidos a partir de atividades ureolíticas o isolado *S. ureilytica* LBBMA70

Estruturas geométricas arredondadas, com tonalidade esverdeada foram observadas em resoluções de 20X e 100X, assim como a presença de células. Na microscopia de varredura, observou-se algumas estruturas com formas geométricas definida, retangulares e planas que permitiram confirmar a formação de cristais. (Figura 3-6).

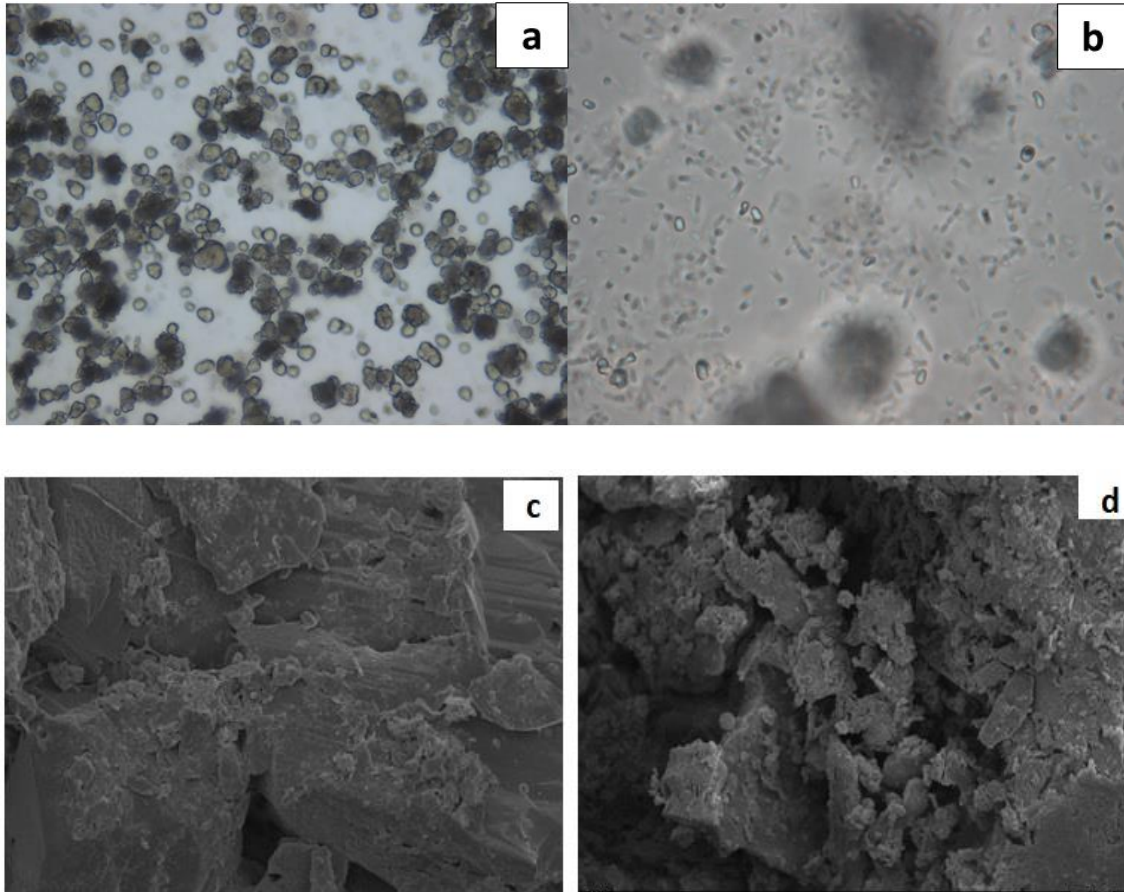


Figura 3-6. Imagens de precipitação de carbonato de cálcio em microscópio óptico y microscopia de varredura. a) Observação em resolução 20X; b) Observação em resolução 100 X; c) y d) imagens de microscópio de varredura obtidas de amostras de solo tratadas com a solução bacteriana

3.4. DISCUSSÃO

Microrganismos urease positivos, durante a hidrólise da ureia tendem a elevar o pH do meio, tanto pela liberação de hidróxido durante a reação quanto pela produção de amônio (ANBU *et al.*, 2016). A avaliação da mudança do pH foi uma metodologia rápida e eficiente para a seleção dos microrganismos ureolíticos, pois aqueles que apresentam maior alteração do pH no meio de cultura, são potencialmente, aqueles que possuem maiores taxas de atividade ureolítica.

O Isolado #70, identificado como *Serratia ureilytica*, apresentou as maiores taxas de atividade ureolítica quando comparado com os outros isolados. Em condições ótimas determinadas nesse estudo (meio M.U, pH 10,5) a atividade máxima registrada foi de 80 mmol de ureia hidrolisada/min. Esse valor é muito superior aos reportados em outros estudos para *Sporosarcina pasteurii*, que variam entre 2 a 50 mmol de ureia

hidrolisada/min (HARKES et al., 2010; MALEKI et al., 2016; WHIFFIN; VAN PAASSEN; HARKES, 2007)

Outros microrganismos têm sido reportados como potencialmente aplicáveis no processo MICP, por apresentarem altas atividades ureolíticas. Citam-se por exemplo, *B. megaterium* ATCC14581 (SOON et al., 2013), com atividade de uréase entre 20 e 60 mM de ureia hidrolisada/min ; *K. flava* CR1, com 47,2 mmol de ureia hidrolisada/min; *B. thuringiensis*, com 62 mmol de ureia hidrolisada/min; *Halomonas* sp (UMAR; KASSIM; PING CHIET, 2016); *Bacillus* sp. CPB2, com atividade ureolítica de 6,2 mmol de ureia hidrolisada/min (CHU; STABNIKOV; IVANOV, 2012); *Bacillus* sp. MCP11, com 33 mM de ureia hidrolisada/min (AL-THAWADI, 2013); *B. simplex* AP9, com 49,3 mmol de ureia hidrolisada/min (ACHAL; PAN, 2011). Por outro lado, Kim e Youn (2016) reportaram quatro isolados com atividades ureolíticas superiores a *Sporosarcina pasteurii*(controle) identificados como *S. saprophyticus*, *S. globispora*, *B. lentus*, and *Sporosarcina* sp.

Em relação ao gênero *Serratia*, destacasse o isolamento de uma *Serratia* sp a partir de rocha de mármore, a qual foi descrita como sendo capaz de formar carbonato de cálcio, porém não foi determinada sua atividade ureolítica (BHARTI; SRIVASTAVA; THAKUR, 2014). Em quanto, *Serratya Ureilytica* não foram encontrados relatos na literatura sobre a utilização no processo MICP.

A Avaliação da atividade ureolítica no tempo permitiu identificar a variação da atividade em função da concentração de células. Os resultados desse estudo mostraram que o meio de cultura, o pH do meio e a temperatura interferem na atividade ureolítica de *Serratia ureilytica* LBBMA70.

Alguns trabalhos reportaram que o pH ótimo para urease é de 8,0, havendo redução da atividade em valores de pH acima desse valor (GOROSPE et al., 2013; STOCKS-FISCHER; GALINAT; BANG, 1999). Whiffin (2004) indica que há um efeito bioquímico do pH na atividade da urease de *S. pasteurii*, e que atividades ótimas se encontram em valores de pH entre 7 e 8. No entanto, outros estudos tem reportado favorecimento da atividade ureolítica e formação de CaCO₃ em valores de pH acima de 8 (CHENG, L., 2012; MALEKI et al., 2016).

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que altas atividades ureolíticas podem ser obtidas durante o cultivo de *Serratia ureilytica* LBBMA70 em valores elevados de pH (atividade máxima a pH 10,5) dependendo do meio de cultura. Esse resultado pode ser favorável no processo MICP, uma vez que culturas incubadas em meios de cultivo

com pH mais elevados podem reduzir o tempo para iniciar o processo (DASKALAKIS et al., 2015). Como vantagem adicional, destacasse a baixa probabilidade de contaminação da cultura por outros microrganismos, já que poucas espécies crescem em ambientes alcalinos.

O meio de crescimento utilizado também é importante para definir as condições ótimas para precipitação da calcita. Diferentes meios têm sido utilizados, sendo o mais comum o meio B4, utilizado por Boquet et al. (1973) durante os primeiros estudos de biomineralização. Outros meios têm se mostrado eficientes no processo MICP, incluindo aqueles que fazem uso de peptona bacteriológica como componente principal (DASKALAKIS et al., 2015), e o sulfato de amônio (CHENG, LIANG; CORD-RUWISCH; SHAHIN, 2013b) também avaliado neste estudo.

A temperatura é outro fator que influencia no processo de MICP pois reações como a hidrólise da ureia pela uréase dependem da temperatura. Para a maioria das uréases, a temperatura ideal varia de 20 a 37 °C (OKWADHA; LI. 2010). Neste estudo, foi observado que, para condições *standard* (meio M.U, pH 10.5), a atividade ureolítica aumenta com o aumento da temperatura (20 a 35°C) e maiores taxas de atividade de ureases são obtidas a 35°. Isto também foi reportado por Daskalakis et al. (2015), que determinaram a temperatura ótima de atividade de uréase de *B. pumilus* ACA-DC 4061 como sendo de 30 °C, obtendo maior precipitação de carbonato de cálcio nessa temperatura.

3.5. CONCLUSÕES

A bactéria *Serratia ureilytica*, uréase positiva, foi identificada de forma inédita como um microrganismo eficiente na precipitação de carbonato de cálcio que apresenta altas taxas de atividade ureolítica variando entre 50-80 mM de ureia hidrolisada/min, dependendo das condições do meio.

S. ureilytica apresenta as taxas mais altas de uréase quando é estabelecida em meio-ureia, pH 10,5 e temperatura de 35°C.

3.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHAL, V.; PAN, X. Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation. *Current Microbiology*, v. 62, n. 3, p. 894–902, 2011.

AL-THAWADI, S. M. Consolidation of Sand Particles by Aggregates of Calcite Nanoparticles Synthesized by Ureolytic Bacteria under Non-Sterile Conditions. *Journal of Chemical Science and Technology*, v. 2, n. 3, p. 141–146, 2013.

ANBU, P. *et al.* Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *SpringerPlus*, v. 5, n. 1, 2016.

B. C. MARTINEZ, T. H. BARKOUKI, J. D. D. AND T. R. G. Upscaling of Microbial Induced Calcite Precipitation in 0.5m Columns: Experimental and Modeling Results. *Geo-Frontiers*, n. August 2016, p. 4049–4059, 2011.

BHADRA, B.; ROY, P.; CHAKRABORTY, R. *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea-utilizing species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, n. 5, p. 2155–2158, 2005.

BHARTI, R. K.; SRIVASTAVA, S.; THAKUR, I. S. Journal of Environmental Chemical Engineering Isolation , purification , characterization and mass spectroscopic analysis of carbonic anhydrase from *Serratia* sp . for sequestration of carbon dioxide and formation of calcite. *Biochemical Pharmacology*, v. 2, n. 1, p. 31–39, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2013.11.018>>.

BOQUET, E.; BORONAT, A.; RAMOS-CORMENZANA, A. Production of Calcite (Calcium Carbonate) Crystals by Soil Bacteria is a General Phenomenon. *Nature*, v. 246, p. 527–529, 1973.

CANESCHI, F. P. Estudos geoambientais em solos modificados quimicamente. 2012.

CAO, L.; ZHANG, K.; ZHANG, W. Detachment of road surface soil by flowing water. *Catena*, v. 76, n. 2, p. 155–162, jan. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0341816208001616>>. Acesso em: 26 mar. 2014.

CHENG, L. Innovative Ground Enhancement by Improved Microbially Induced CaCO₃ Precipitation Technology. n. March, p. 251, 2012.

CHENG, L.; CORD-RUWISCH, R.; SHAHIN, M. A. Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation. *Canadian Geotechnical Journal*, v. 50, n. 1, p. 81–90, 2013a.

CHENG, L.; CORD-RUWISCH, R.; SHAHIN, M. A. Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation. v. 90, n. January 2012, p. 81–90, 2013b.

CHU, J. *et al.* Optimization of calcium-based bioclogging and biocementation of sand. *Acta Geotechnica*, v. 9, n. 2, p. 277–285, 2014.

CHU, J.; STABNIKOV, V.; IVANOV, V. Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation on Surface or in the Bulk of Soil. *Geomicrobiology Journal*, v. 29, n. 6, p. 544–549, 2012a. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490451.2011.592929>>.

CHU, J.; STABNIKOV, V.; IVANOV, V. Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation on Surface or in the Bulk of Soil. *Geomicrobiology Journal*, v. 29, n. 6, p. 544–549, 2012b.

DASKALAKIS, M. I. *et al.* Vaterite bio-precipitation induced by *Bacillus pumilus* isolated from a solutional cave in Paiania, Athens, Greece. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 99, p. 73–84, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830514003643>>.

FU, B.; NEWHAM, L. T. H.; RAMOS-SCHARRÓN, C. E. A review of surface erosion and sediment delivery models for unsealed roads. *Environmental Modelling & Software*, v. 25, n. 1, p. 1–14, jan. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364815209001832>>. Acesso em: 3 abr. 2014.

GOROSPE, C. M. *et al.* Effects of different calcium salts on calcium carbonate crystal formation by *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 18, n. 5, p. 903–908, 2013.

HARKES, M. P. *et al.* Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement. *Ecological Engineering*, v. 36, n. 2, p. 112–117, 2010.

IVANOV, V.; CHU, J. Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 7, n. 2, p. 139–153, 2008.

KEMPERS, A. J.; ZWEERS, A. Ammonium determination in soil extracts by the salicylate method. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 17, n. 7, p. 715–723, 1986.

KIM, G.; YOUN, H. Microbially induced calcite precipitation employing environmental isolates. *Materials*, v. 9, n. 6, 2016.

MALEKI, M. *et al.* Performance of microbial-induced carbonate precipitation on wind erosion control of sandy soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 13, n. 3, p. 937–944, 2016.

MARTINEZ, B. C. *et al.* Experimental Optimization of Microbial-Induced

Carbonate Precipitation for Soil Improvement. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, v. 139, n. 4, p. 587–598, 2013. Disponível em: <[http://ascelibrary.org/doi/10.1061/\(ASCE\)GT.1943-5606.0000787](http://ascelibrary.org/doi/10.1061/(ASCE)GT.1943-5606.0000787)>.

MUJAH, D.; SHAHIN, M. A.; CHENG, L. State-of-the-art review of biocementation by microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. *Geomicrobiology Journal*, v. 451, n. September, p. 01–52, 2016a. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01490451.2016.1225866>>.

MUJAH, D.; SHAHIN, M. A.; CHENG, L. State-of-the-Art Review of Biocementation by Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP) for Soil Stabilization. *Geomicrobiology Journal*, v. 451, n. September, p. 1–14, 2016b. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01490451.2016.1225866>>.

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

NEUPANE, D. *et al.* Distribution of mineralized carbonate and its quantification method in enzyme mediated calcite precipitation technique. *Soils and Foundations*, v. 55, n. 2, p. 447–457, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sandf.2015.02.018>>.

NG, W.; LEE, M.; HIL, S. An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, v. 62, n. 2, p. 723–729, 2012. Disponível em: <<http://waset.org/journals/waset/v62/v62-131.pdf>>.

OKWADHA, G. D. O.; LI, J. Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. *Chemosphere*, v. 81, n. 9, p. 1143–1148, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.066>>.

RAMMELT, C. F.; LEUNG, M. W. H. Tracing the Causal Loops Through Local Perceptions of Rural Road Impacts in Ethiopia. *World Development*, v. 95, p. 1–14, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.worlddev.2017.02.024>>.

SAFARI, A. *et al.* Impact of different parts of skid trails on runoff and soil erosion in the Hyrcanian forest (northern Iran). *Geoderma*, v. 263, p. 161–167, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.09.010>>.

SHAHRONKHI-SHAHRAKI, R. *et al.* Improving sand with microbial-induced carbonate precipitation. p. 1–14, 2014.

SHARMA, A.; R., R. Study on effect of Microbial Induced Calcite Precipitates on

strength of fine grained soils. *Perspectives in Science*, v. 8, p. 198–202, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213020916300477>>.

SOON, N. W. *et al.* Improvements in engineering properties of soils through microbial-induced calcite precipitation. *KSCE Journal of Civil Engineering*, v. 17, n. 4, p. 718–728, 2013.

STOCKS-FISCHER, S.; GALINAT, J. K.; BANG, S. S. Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 31, n. 11, p. 1563–1571, out. 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071799000826>>. Acesso em: 3 abr. 2015.

THOMAZ, E. L.; PERETTO, G. T. Science of the Total Environment Hydrogeomorphic connectivity on roads crossing in rural headwaters and its effect on stream dynamics. *Science of the Total Environment, The*, v. 550, p. 547–555, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.100>>.

UMAR, M.; KASSIM, K. A.; PING CHIET, K. T. Biological process of soil improvement in civil engineering: A review. *Journal of Rock Mechanics and Geotechnical Engineering*, v. 8, n. 5, p. 767–774, 2016.

WANG, Z. *et al.* Review of Ground Improvement Using Microbial Induced Carbonate Precipitation (MICP). *Marine Georesources & Geotechnology*, v. 618, n. March, p. 1064119X.2017.1297877, 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1064119X.2017.1297877>>.

WHIFFIN, V. S. Microbial CaCO₃ Precipitation for the Production of Biocement. *Phd Thesis*, n. September, p. 1–162, 2004.

WHIFFIN, V. S.; VAN PAASSEN, L. A.; HARKES, M. P. Microbial Carbonate Precipitation as a Soil Improvement Technique. *Geomicrobiology Journal*, v. 24, n. 5, p. 417–423, 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490450701436505>>.

4. CAPITULO 3: OTIMIZAÇÃO DA PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO INDUZIDO MICROBIOLOGICAMENTE POR *Serratia Ureilytica* sp. EM SOLOS ARENOSOS

4.1. INTRODUÇÃO

A biocimentação é um processo que junta as partículas do solo com minerais formados pela precipitação de carbonato de cálcio induzida microbiologicamente (MIPC), atribuindo maior resistência ao cisalhamento e reduzindo sua permeabilidade (NG; LEE; HII, 2012).

O efeito da MIPC nas propriedades físicas, químicas e mecânicas do solo tem sido objeto de diferentes estudos. A permeabilidade do solo é uma das propriedades mais estudadas, principalmente em solos arenosos que apresentam uma permeabilidade relativamente alta. Areias tratadas microbiologicamente podem reduzir até 50% o coeficiente de permeabilidade (CHENG, LIANG; CORD-RUWISCH; SHAHIN, 2013b; IVANOV; CHU, 2008; WHIFFIN; VAN PAASSEN; HARKES, 2007).

Chu et al. (2014) relataram uma redução da permeabilidade em solos tratados com MICP, assim como um aumento da resistência ao cisalhamento em areias usando *Bacillus s.p.* O efeito da biocimentação em outras propriedades mecânicas do solo também foi reportado, como o aumento na resistência à compressão não confinada de solos tratados (SHAHRONKHI-SHAHRAKI *et al.*, 2014; SHARMA; R., 2016), aumento na resistência ao cisalhamento (MUJAH; SHAHIN; CHENG, 2016; SOON et al., 2013), redução da condutividade hidráulica (SOON *et al.*, 2013) e aumento na resistência do solo à penetração (MALEKI *et al.*, 2016).

A formação de cristais, assim como o efeito nas propriedades do solo, depende de diversos fatores, tais como a concentração de células, disponibilidade de íons de cálcio (OKWADHA; LI, 2010), disponibilidade de pontes de nucleação, distribuição das bactérias no solo (HARKES *et al.*, 2010; WHIFFIN; VAN PAASSEN; HARKES, 2007), método de injeção, entre outros.

O processo MICP em areia envolve dois estágios principais: (1) a adsorção da enzima urease ou células de bactérias produtoras de uréase em grãos de areia e (2) a hidrólise enzimática da ureia que acompanha a formação de cristais de carbonato de cálcio (CHU et al., 2014). A eficiência desses estágios resulta em uma distribuição uniforme de carbonato de cálcio.

Whiffin et al. (2007) avaliaram o efeito do MICP nas propriedades mecânicas do solo e definiram uma metodologia de fixação bacteriana baseada no efeito da força iônica de transporte microbiano. Nesse processo, a suspensão bacteriana é injetada sobre o solo e seguida por um fluido de fixação (com alta salinidade) para aderir as células às partículas do solo, reduzindo a repulsão eletrostática, resultando em bactérias distribuídas homoganeamente ao longo do solo. Esta metodologia foi utilizada e otimizada por Harkes et al. (2010), usando *Sporosarcina pasteurii*.

Considerando que o tipo de bactéria, a concentração bacteriana, a fixação e as concentrações de cálcio afetam o MICP, o objetivo desse estudo foi definir uma metodologia de precipitação de carbonato de cálcio em areias usando *Serratia ureilytica sp.*, assim como determinar a eficiência do método na redução da permeabilidade de um corpo de prova arenoso.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Microrganismos

A bactéria urease positiva usada foi a *Serratia ureilytica sp.*, isolada de amostra de solo obtida em uma bacia de manutenção de equídeos localizada em frente ao hospital veterinário da UFV. O estudo foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o meio ambiente da Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Colônias isoladas da bactéria foram cultivadas sob condições aeróbicas estéreis, em meio Agar TSA-Ureia contendo 40g/L de TSA; 1,33 M de ureia e 5 g/L de ágar. A incubação foi feita a 30°C por 72h. Colônias isoladas foram utilizadas para inoculação em meio líquido contendo 20g/L de extrato de levedura, 0,1 mM de NiCl₂ e 0,17M de ureia, a um pH de 10,5 (condições definidas no capítulo 2).

A cultura foi incubada a 30°C e 200 rpm em shaker durante 24 horas para se alcançar a fase estacionária. A densidade óptica (DO600) da cultura variou entre 2,5 a 2,9 e a atividade da urease foi de aproximadamente 30 mM de ureia hidrolisada/min.

4.2.2 Parâmetros das colunas e montagem do experimento

A precipitação de carbonato de cálcio microbiologicamente induzido por *S. ureilytica* foi testada em colunas de areia padronizada segundo a Norma Brasileira BR 7214. As frações granulométricas desse solo são descritas na Tabela 1.

Seis colunas de solo foram estabelecidas em seringas de 60mL e cada coluna representava um tratamento. A montagem foi feita seguindo a metodologia modificada proposta por Whiffin et al. (2007): foi colocada no fundo da coluna uma camada de filtro (parte abrasiva de uma esponja de cozinha) de aproximadamente 1 cm, seguida por uma camada de solo de aproximadamente 9 cm de altura e novamente uma camada de filtro no topo da coluna (Figura 1). As colunas foram preenchidas por imersão em água e dando leves batidas na seringa na medida em que a areia era adicionada, para evitar espaços de ar e garantir uma densidade aparente uniforme ($\rho=1,53 \text{ g/cm}^3$) e porosidade aproximada de 40%).

Tabela 4-1. Frações granulométricas da areia padronizada pela norma NBR 7214

Denominação	Abertura nominal do material retido nas peneiras	Porcentagem retida, acumulada, em peso
grossa	2,4 mm e 1,2 mm	25 ± 5
média grossa	1,2 mm e 0,6mm	50 ± 5
média fina	0,6mm e 0,3mm	75 ± 5
fina	0,3mm 0,15 mm	97 ± 3

As colunas foram posicionadas verticalmente com direção de fluxo descendente e a aplicação dos reagentes foi feita desde o topo da coluna utilizando-se uma bomba peristáltica *Masterflex L/S* modelo 7519-20 com fluxo uniforme de 24 mL/h (equivalente a 100% o volume dos poros). Antes de começar os ensaios foi injetado um volume de água da torneira para verificação e calibração do fluxo. Todos os experimentos foram conduzidos na temperatura ambiente ($20\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)

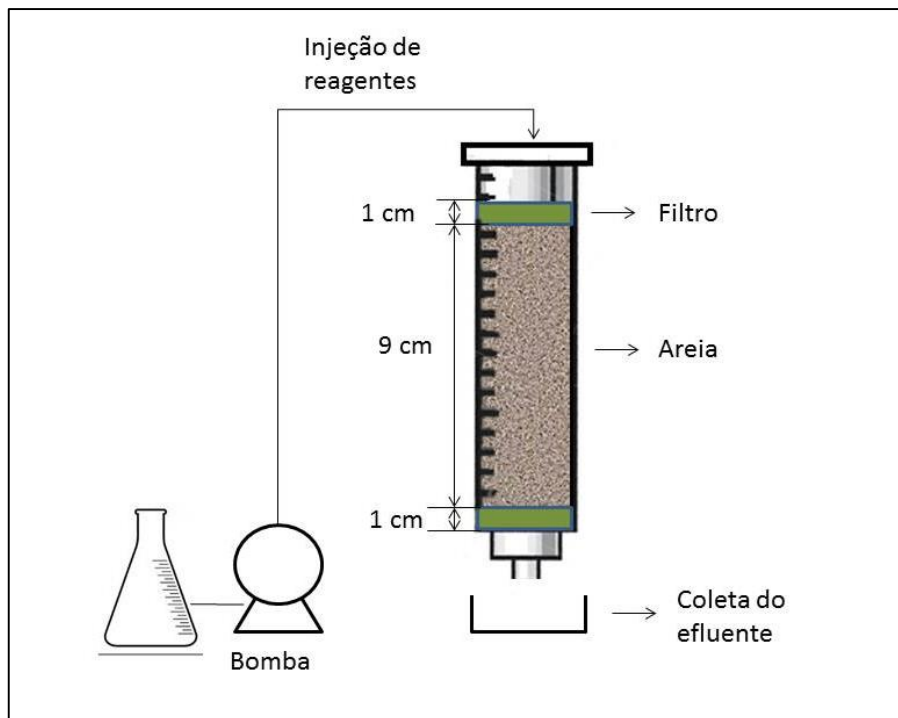


Figura 4-1. Esquema de montagem do experimento

4.2.3 Tratamentos

Para determinar as concentrações ideais de solução bacteriana, solução de fixação e solução cimentante no processo de MICP foram estabelecidas seis colunas de areia (tratamento) variando esses parâmetros. Em cada coluna foi injetada inicialmente uma suspensão bacteriana, seguida de uma solução de fixação (50 mM CaCl_2) e imediatamente depois uma solução cimentante (concentração equimolar de CaCl_2 e Ureia) seguindo a metodologia proposta por Harkes et al. (2010) e Whiffin et al. (2007).

Depois da primeira injeção das soluções deixou-se reagir por 2 horas. Após esse período, uma segunda dose de solução cimentante foi aplicada com um tempo de reação de 24 h. Transcorrido esse tempo, uma terceira dose de solução cimentante foi aplicada (WHIFFIN; VAN PAASSEN; HARKES, 2007). Os tratamentos são descritos na Tabela 2.

Tabela 4-2. Tratamentos aplicados nas colunas de areia

Tratamento Coluna	Suspensão Bacteriana (mL)	Solução de Fixação* (50 mM CaCl ₂ em mL)	Solução Cimentante ** (mL)
1 (WHIFFIN; VAN PAASSEN; HARKES, 2007)	36 * solução diluída 10 vezes em solução salina - 9 g/L NaCl	36	24 (1 equimolar de CaCl ₂ e ureia) 3 aplicações
2	4,8***	36	24 (1 equimolar de CaCl ₂ e ureia) 3 aplicações
3	3,0 ****	36	24 (1 equimolar de CaCl ₂ e ureia) 3 aplicações
4	4,8 ***	Sem Fluido de Fixação	24 (1 equimolar de CaCl ₂ e ureia) 3 aplicações
5	4,8***	36	24 (0,5 M equimolar de CaCl ₂ e ureia) 3 aplicações
6	4,8 ***	36 mL	24 (1 equimolar de CaCl ₂ e ureia) 2 aplicações

* Quantidade equivalente a 150% do volume total dos poros; ** Quantidade equivalente a 100% do volume total dos poros; *** Quantidade equivalente a 20% do volume total dos poros; **** Quantidade equivalente a 12,5% do volume total dos poros.

4.2.4 Obtenção de amostras

Durante o curso dos experimentos foram coletadas amostras contínuas do efluente de aproximadamente 6 mL até terminar a aplicação das soluções. De cada amostra coletada foi utilizado 1 mL para determinação da densidade óptica, 2 mL para atividade ureolítica e 1 mL para análise da concentração de amônio.

4.2.5 Densidade óptica

A densidade óptica (DO) foi determinada usando um espectrofotômetro *Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis* a um comprimento de onda de 600 nm. As amostras foram diluídas para um valor entre 0 e 0,3 (onde a relação entre a absorvência e a concentração de partículas é linear) e os valores obtidos foram multiplicados pelo fator de diluição para se obter o valor não diluído.

4.2.6 Atividade ureolítica

A atividade ureolítica foi determinada em função da condutividade elétrica, seguindo a metodologia proposta por Whiffin; Van Paassen; Harkes (2007). As amostras foram coletadas durante o transcurso do experimento e estocadas a 8 °C até o momento da determinação. A atividade ureolítica foi calculada pela relação de 1U=11 mM ureia hidrolisada/min (WHIFFIN; VAN PAASSEN; HARKES, 2007).

A atividade ureolítica inicial da suspensão bacteriana também foi determinada para se obter, por subtração, a atividade retida nas colunas de areia.

4.2.7 Concentração de amônio

Amostras coletadas do efluente durante o transcurso do experimento foram centrifugadas a 11.000 RCF durante 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para um microtubo e posteriormente armazenado a -10°C até o momento de se fazer as análises.

A concentração de amônio foi determinada pelo método do salicilato modificado (KEMPERS; ZWEERS, 1986). É um método colorimétrico baseado na formação da cor azul-esmeralda gerada quando as soluções da reação reagem na presença de amônio.

Uma curva padrão foi realizada com soluções de amônio na faixa de 0,2 a 1,2 mg/L de N-NH₄⁺ (Anexo 3). As análises de concentração de amônio nas amostras foram realizadas em tubos de ensaio, adicionando-se 2 mL da amostra e 2 mL de KCl (a diluição foi necessária pelo pequeno volume das amostras) seguidos de 0,9 mL de solução reagente de trabalho (contendo duas partes de solução de salicilato de sódio + nitroprussiato de sódio com uma parte de solução tampão) e 0,1 mL de solução de hipoclorito de sódio (2,5%). A mistura foi deixada em descanso por 2 horas e após este tempo foi medida a absorvência em espectrofotômetro, ajustando-o para comprimento de onda de 646 nm. Para concentrações altas de amônio foram feitas diluições com KCl 1 mol/L até completar o volume requerido (4 mL).

4.2.8 Permeabilidade

O efeito da MICP na permeabilidade foi determinado pela comparação entre amostras de solo tratadas biologicamente e amostras não tratadas (testemunha). As amostras de solo tratadas foram preparadas de igual maneira que as colunas de areia do experimento anterior, porém em maiores dimensões.

As colunas foram instaladas em moldes de polietileno com 30 cm de comprimento e 6,5 cm de diâmetro. No fundo da coluna foi colocado um filtro, seguido por uma camada de brita (3 cm de altura) para evitar entupimento, posteriormente preenchendo-se com areia (13 cm de altura). No topo da coluna, novamente foi colocada uma camada de brita e filtro. As colunas foram preenchidas por imersão em água dando leves batidas no molde na medida em que a areia era adicionada, para evitar espaços de ar e garantir uma densidade aparente uniforme ($\rho=1,56 \text{ g/cm}^3$).

As colunas foram posicionadas verticalmente e os reagentes foram injetados desde o topo. As concentrações das soluções foram determinadas pelo tratamento mais eficiente na retenção de atividade definido no primeiro experimento (teste de colunas). Uma vez aplicados os reagentes seguindo a metodologia proposta, os corpos de prova permaneceram por cinco dias em cura, para realizar os testes de permeabilidade.

Os testes de permeabilidade foram realizados para dois tipos de amostra. A primeira foi o solo natural (testemunha) e a segunda foram os solos tratados biologicamente. As amostras não tratadas foram preparadas diretamente no molde do permeâmetro (dimensões de 12 cm de altura e 10 cm de diâmetro), adicionando a areia conservando a mesma densidade aparente das colunas de solo tratadas.

A permeabilidade foi determinada usando o equipamento de percolação em coluna desenvolvido por Caneschi (2012). Três repetições foram realizadas para cada amostra.

Para verificar a presença de carbonato de cálcio no solo, amostras foram analisadas por espectrometria de absorção atômica para determinação do conteúdo de cálcio presente.

4.3. RESULTADOS

O efeito das concentrações de suspensão bacteriana, da solução de cimentação e da solução de fixação na precipitação de carbonato de cálcio usando *Serratia ureilytica* foi avaliado em função da densidade óptica, da atividade ureolítica e da concentração de amônio. A retenção da atividade ureolítica nas colunas de areia foi considerada para se definir a eficiência dos tratamentos aplicados. Os resultados obtidos são resumidos na Tabela 3.

Tabela 4-3. Resumo dos tratamentos aplicados nas colunas de areia e dos resultados obtidos

Coluna	Solução bacteriana injetada (mL)	Solução de Fixação-solução de cimentação (concentração)	D.O e atividade ureolítica inicial média	D.O** retida na coluna (%)	Atividade ureolítica retida na coluna (%)	Conc. Acum. de amônio (mg/L de NH ₄ ⁺)
1	36,0 *	50mM -1 M	2,8-29,5	67	54	52,8
2	4,8	50mM -1 M	2,8-29,5	91	55	26,4
3	3,0	50mM -1 M	2,8-29,5	95	68	87,6
4	4,8	Sem Fix.-1 M	2,7-29,8	93	83	3,4
5	4,8	50mM -0.5 M	2,7-29,8	90	64	606
6	4,8	50mM -1 M	2,7-29,8	90	61	245,8

*Solução diluída (x10); **Densidade óptica

4.3.1 Efeito da concentração de células

O efeito da concentração de células nas colunas de solo foi avaliado pela variação do volume de solução bacteriana aplicada (colunas 1, 2 e 3), seguido pela aplicação de uma solução de fixação (36 mL) e uma solução cimentante. Os resultados de densidade óptica mostraram uma alta porcentagem de bactérias retidas na coluna quando a suspensão bacteriana não é diluída. 33% da concentração de células é lavada durante a aplicação dos reagentes quando é injetada a suspensão bacteriana diluída (Figura 2a). Resultados similares também foram reportados por Harkes *et al.*, (2010) obtendo porcentagens de retenção ainda menores (17%) aos determinados neste estudo.

A coluna 3, com menor volume de suspensão bacteriana (12,5% de volume dos poros) teve mais retenção de célula no solo, sendo 4% superior à obtida na coluna 2 (20% dos poros). Isso pode ser atribuído a um rápido efeito da solução de fixação, que proporciona alta salinidade, e também ao baixo volume da suspensão bacteriana.

O efeito da concentração de células foi verificado nas colunas 4, 5 e 6 (Figura 2b), que apresentaram porcentagens de retenção de células similares, sendo que o volume de suspensão bacteriana foi igual e apenas as concentrações da suspensão e da solução de fixação variaram.

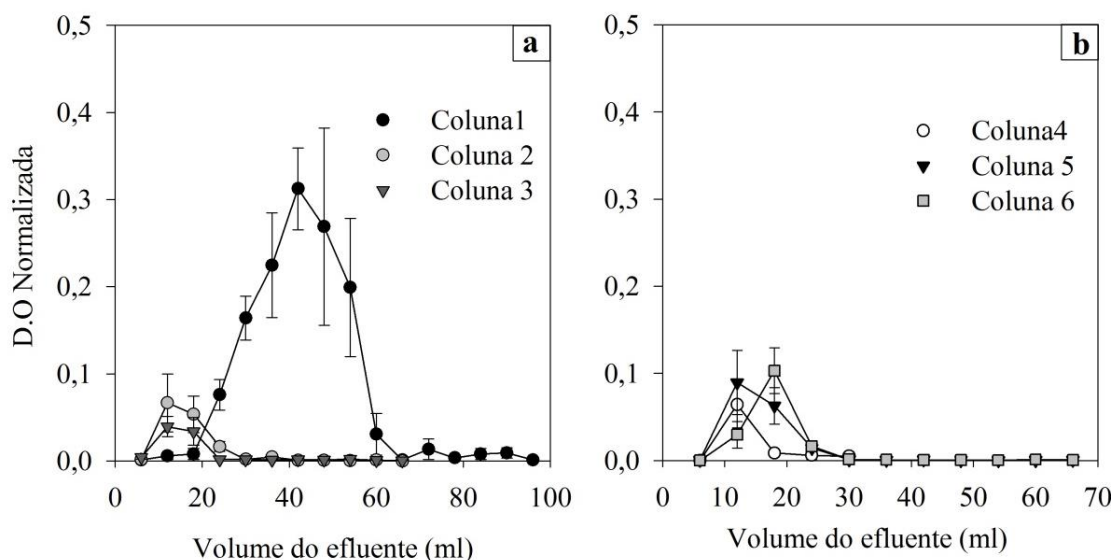


Figura 4-2. Medidas de densidade óptica do efluente. a) Colunas 1, 2, 3 com diferentes volumes de solução bacteriana; b) colunas 4, 5 e 6 com igual volume de solução bacteriana.

O efeito da concentração de células também foi verificado pela atividade ureolítica presente no efluente (Figura 3a). Maior atividade ureolítica no efluente foi determinada na coluna 1, da qual 46% da atividade foram eliminados no efluente.

A coluna 3, que apresentou maior retenção celular da coluna, resultou em menor atividade ureolítica lavada no efluente (32%). Já a coluna 2 teve 45% da atividade no efluente.

As concentrações de amônio determinadas no efluente estão correlacionadas com os resultados obtidos de atividade ureolítica e densidade óptica (Figura 3b). Maiores concentrações foram obtidas na coluna 3, aproximadamente o dobro da concentração obtida na coluna 2. A coluna 1 também mostrou uma alta concentração de amônio no efluente. Isso pode estar relacionado ao efeito da liberação da enzima urease dada pela diluição da solução bacteriana.

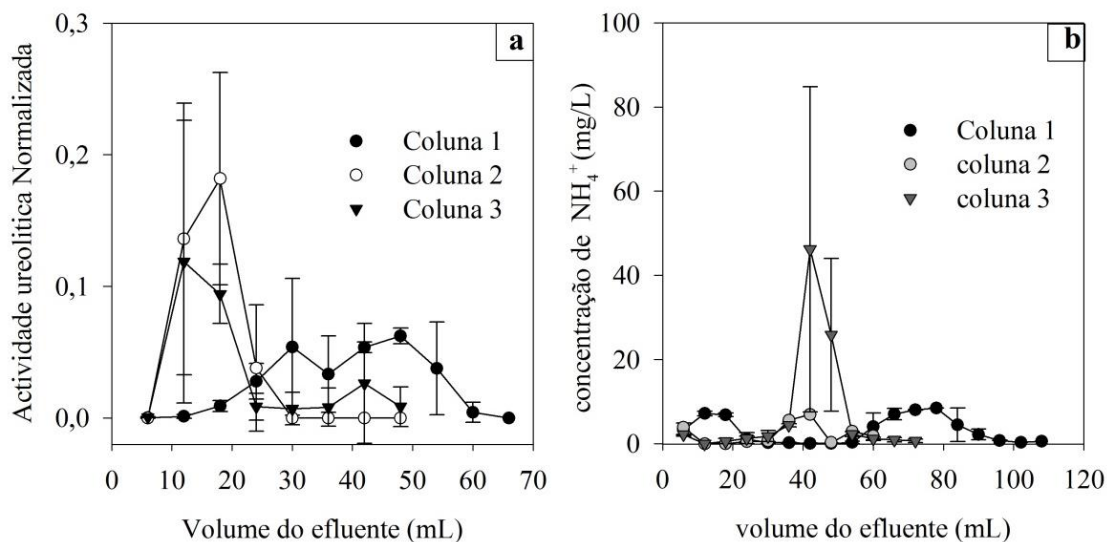


Figura 4-3. Medições do efluente das colunas 1,2 e 3. a) Atividade ureolítica, b) Concentração de amônio

4.3.2 Efeito da solução de Fixação

O efeito da solução de fixação foi avaliado nas colunas 4 (sem solução de fixação) e 6 (com fixação). Maior retenção de bactérias foi obtida no tratamento sem fixação, assim como maior retenção de atividade ureolítica (Figura 4a). Cerca de 40% da atividade foram lavados no efluente quando se utilizou uma solução de fixação. No tratamento sem fixação, a lavagem atingida foi de apenas de 17%. Os resultados não verificaram que há maior retenção bacteriana quando foi utilizado um fluido de fixação. No entanto, isso pode ser explicado pela injeção imediata da solução de cimentação altamente alcalina, gerando uma rápida retenção das bactérias antes dessas atingirem a saída.

Por outro lado, foi observado durante o transcurso dos experimentos que o tratamento sem fixação produzia uma precipitação quase que imediata de carbonato de cálcio que, por sua vez, era lavado no efluente, mostrando-se por tanto ineficiente para o processo da MICP.

Os resultados de concentração de amônio na coluna 6 (com fixação) foram 82 vezes maiores que os obtidos na coluna 4 (Figura 4b). No entanto, uma alta variação entre as repetições foi observada, afetando a interpretação destes resultados.

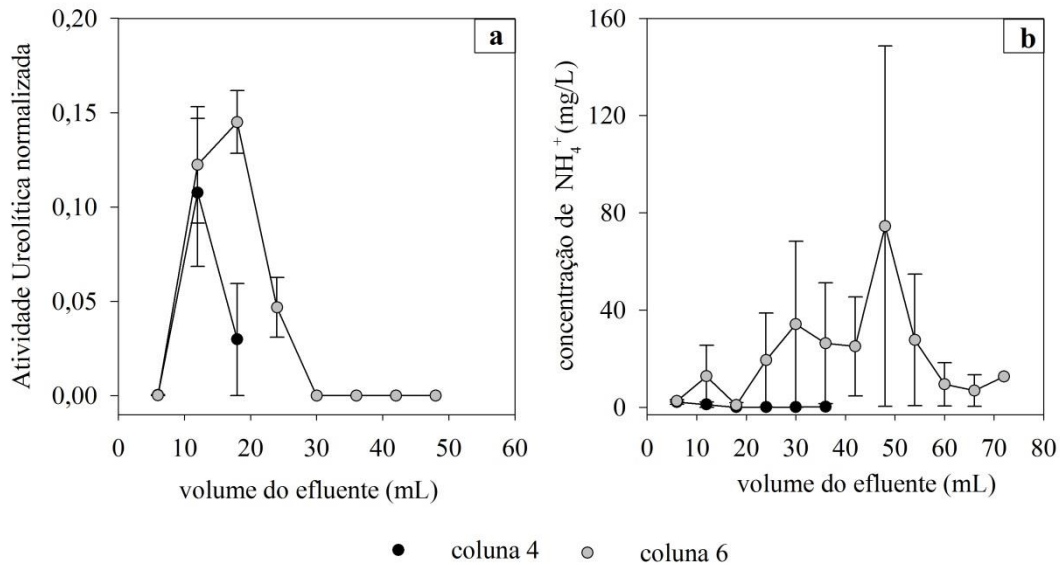


Figura 4-4. Avaliação do efeito da injeção da solução de fixação. a) Efeito na atividade ureolítica, b) Efeito na concentração de amônio.

4.3.3 Efeito da concentração da solução cimentante

As colunas 5 e 6 foram avaliadas com concentrações de cálcio diferentes (0,5 e 1M equimolar de CaCl_2 +ureia respectivamente), para se determinar o efeito no processo da MICP. Os resultados mostraram um efeito nas concentrações de solução cimentante, mas a diferença na retenção de atividade ureolítica foi pouca e os dois tratamentos foram eficientes no processo, pois só 10% das células bacterianas foram lavadas no efluente em ambos tratamentos. Por outra lado, houve pouca diferença na retenção de atividade ureolítica. O solo tratado com menor concentração (coluna 5) reteve 3% a mais que a coluna tratada com maior concentração (coluna 6).

Os resultados de concentração de amônio no efluente da coluna 5 foram 2,5 vezes maiores que os obtidos na coluna 6. No entanto, uma alta variação entre as repetições observada afetou a interpretação desses resultados.

4.3.4 Efeito na Permeabilidade do solo

Para determinar o efeito da precipitação de carbonato de cálcio na permeabilidade do solo, três colunas de areia foram preparadas e tratadas biologicamente usando as concentrações ótimas de reagentes determinadas neste estudo (Tratamento 3). Uma redução na permeabilidade de aproximadamente 53 % foi observada nas amostras tratadas (Figura 5). De igual maneira, foram feitos análises de

absorção atômica nas amostras tratadas para verificar a presença de carbonato de cálcio, que resultaram em uma concentração de cálcio de 5.532,8 mg/kg.

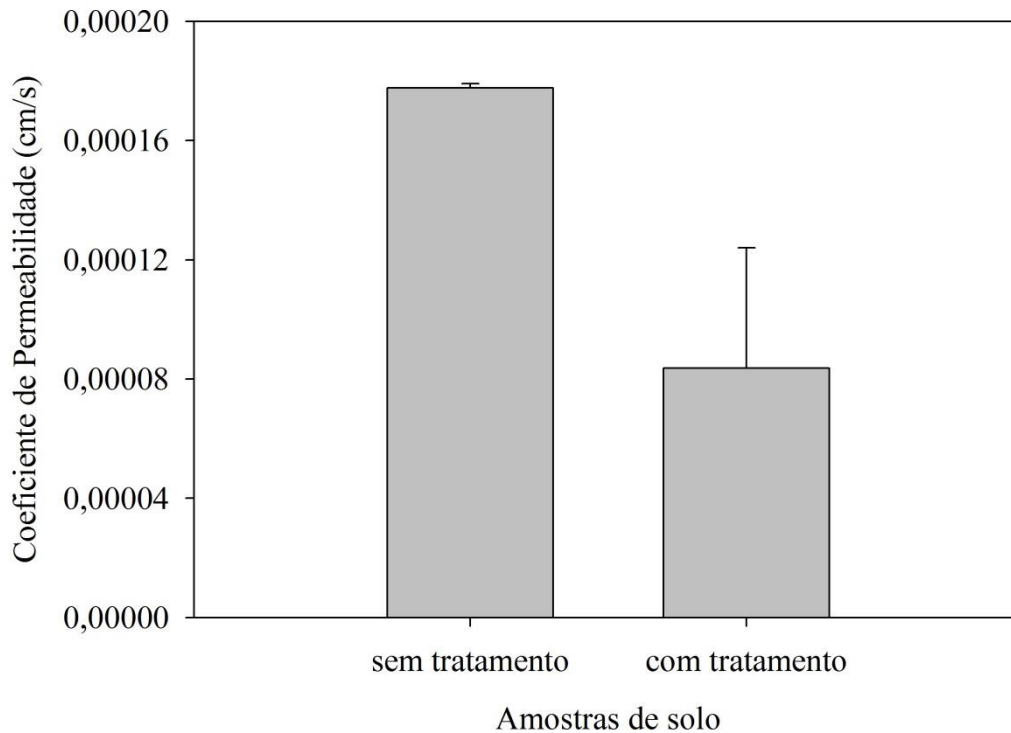


Figura 4-5. Efeito da precipitação de carbonato de cálcio na permeabilidade de um solo arenoso

O precipitado de carbonato gerado microbialmente é responsável por obstruir os espaços dos poros do solo, restringindo assim o fluxo de água e diminuindo a permeabilidade do solo. Essa redução da permeabilidade em solos tratados microbiologicamente é amplamente reportada, indicando reduções entre 50 e 90% (SOON *et al.*, 2013; WHIFFIN; VAN PAASSEN; HARKES, 2007). Estudos realizados por Soon *et al.* (2013) também revelaram a eficácia da precipitação de carbonato de cálcio induzida por microrganismos na melhoria da resistência ao cisalhamento de 96% e da redução da permeabilidade do solo.

4.4. DISCUSSÃO

A precipitação de carbonato de cálcio induzida por microrganismos ureolíticos para melhorar as propriedades mecânicas dos solos é um processo complexo, pois é necessário proporcionar condições ótimas para o desenvolvimento microbiano, aplicar concentrações ideais para que as reações bioquímicas do processo ocorram eficientemente, proporcionar um sistema de injeção adequado e considerar as propriedades físico-químicas do solo que podem interferir nos resultados esperados.

Os resultados deste estudo permitiram identificar que a concentração de células é um fator importante na precipitação de carbonato de cálcio e que baixas concentrações (inferior a 20% do volume dos poros) podem ser mais eficientes no processo. Okwadha; Li, (2010) indicaram que altas concentrações de célula incrementam a quantidade de calcita precipitada, uma vez que há um incremento da uréase. No entanto, isto ocorre se as bactérias são completamente retidas no solo, mas solos arenosos tem uma alta permeabilidade, o que dificulta esta retenção. Isto também foi observado por Harkes et al. (2010), que determinaram uma retenção completa de células no solo com a aplicação de aproximadamente 14% do volume dos poros.

Além da concentração de células, foi observado que a aplicação de uma solução de fixação (com alta salinidade) é necessária, pois a aplicação direta da solução de cimentação (sem solução de fixação), faz com que a precipitação de carbonato de cálcio aconteça imediatamente, afetando a distribuição uniforme dos cristais de carbonato de cálcio. Mais avaliações da solução de fixação devem ser realizadas, pois é observado que seu efeito está relacionado com a concentração de células e também com o método de injeção. Em estudo realizado por Cheng et al. (2013), a injeção da solução de fixação não foi eficiente quando utilizado o método de aplicação por percolação.

4.5. CONCLUSÕES

Concentrações baixas de suspensão bacteriana proporcionam uma alta retenção de células no solo e conseqüentemente maior atividade ureolítica para que ocorra a precipitação de carbonato de cálcio. Aplicações de 12,5% do volume dos poros, seguida pela aplicação de uma solução de fixação de 50 mM CaCl₂ e posteriormente a

aplicação de uma solução cimentante proporcionam uma precipitação eficiente de carbonato de cálcio.

A formação de cristais de carbonato nos poros do solo gera uma diminuição da porosidade e conseqüentemente a diminuição da permeabilidade, sendo um aspecto importante para tratamento de solos de estradas não pavimentadas.

4.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHAL, V.; PAN, X. Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation. *Current Microbiology*, v. 62, n. 3, p. 894–902, 2011.

AL-THAWADI, S. M. Consolidation of Sand Particles by Aggregates of Calcite Nanoparticles Synthesized by Ureolytic Bacteria under Non-Sterile Conditions. *Journal of Chemical Science and Technology*, v. 2, n. 3, p. 141–146, 2013.

ANBU, P. *et al.* Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *SpringerPlus*, v. 5, n. 1, 2016.

B. C. MARTINEZ, T. H. BARKOUKI, J. D. D. AND T. R. G. Upscaling of Microbial Induced Calcite Precipitation in 0.5m Columns: Experimental and Modeling Results. *Geo-Frontiers*, n. August 2016, p. 4049–4059, 2011.

BHADRA, B.; ROY, P.; CHAKRABORTY, R. *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea-utilizing species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, n. 5, p. 2155–2158, 2005.

BHARTI, R. K.; SRIVASTAVA, S.; THAKUR, I. S. Journal of Environmental Chemical Engineering Isolation , purification , characterization and mass spectroscopic analysis of carbonic anhydrase from *Serratia* sp . for sequestration of carbon dioxide and formation of calcite. *Biochemical Pharmacology*, v. 2, n. 1, p. 31–39, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2013.11.018>>.

BOQUET, E.; BORONAT, A.; RAMOS-CORMENZANA, A. Production of Calcite (Calcium Carbonate) Crystals by Soil Bacteria is a General Phenomenon. *Nature*, v. 246, p. 527–529, 1973.

CANESCHI, F. P. Estudos geoambientais em solos modificados quimicamente. 2012.

CAO, L.; ZHANG, K.; ZHANG, W. Detachment of road surface soil by flowing water. *Catena*, v. 76, n. 2, p. 155–162, jan. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0341816208001616>>. Acesso em: 26

mar. 2014.

CHENG, L. Innovative Ground Enhancement by Improved Microbially Induced CaCO₃ Precipitation Technology. n. March, p. 251, 2012.

CHENG, L.; CORD-RUWISCH, R.; SHAHIN, M. A. Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation. *Canadian Geotechnical Journal*, v. 50, n. 1, p. 81–90, 2013a.

CHENG, L.; CORD-RUWISCH, R.; SHAHIN, M. A. Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation. v. 90, n. January 2012, p. 81–90, 2013b.

CHU, J. *et al.* Optimization of calcium-based bioclogging and biocementation of sand. *Acta Geotechnica*, v. 9, n. 2, p. 277–285, 2014.

CHU, J.; STABNIKOV, V.; IVANOV, V. Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation on Surface or in the Bulk of Soil. *Geomicrobiology Journal*, v. 29, n. 6, p. 544–549, 2012a. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490451.2011.592929>>.

CHU, J.; STABNIKOV, V.; IVANOV, V. Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation on Surface or in the Bulk of Soil. *Geomicrobiology Journal*, v. 29, n. 6, p. 544–549, 2012b.

DASKALAKIS, M. I. *et al.* Vaterite bio-precipitation induced by *Bacillus pumilus* isolated from a solutional cave in Paiania, Athens, Greece. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 99, p. 73–84, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830514003643>>.

FU, B.; NEWHAM, L. T. H.; RAMOS-SCHARRÓN, C. E. A review of surface erosion and sediment delivery models for unsealed roads. *Environmental Modelling & Software*, v. 25, n. 1, p. 1–14, jan. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364815209001832>>. Acesso em: 3 abr. 2014.

GOROSPE, C. M. *et al.* Effects of different calcium salts on calcium carbonate crystal formation by *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 18, n. 5, p. 903–908, 2013.

HARKES, M. P. *et al.* Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement. *Ecological Engineering*, v. 36, n. 2, p. 112–117, 2010.

IVANOV, V.; CHU, J. Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. *Reviews in*

Environmental Science and Biotechnology, v. 7, n. 2, p. 139–153, 2008.

KEMPERS, A. J.; ZWEERS, A. Ammonium determination in soil extracts by the salicylate method. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 17, n. 7, p. 715–723, 1986.

KIM, G.; YOUN, H. Microbially induced calcite precipitation employing environmental isolates. *Materials*, v. 9, n. 6, 2016.

MALEKI, M. *et al.* Performance of microbial-induced carbonate precipitation on wind erosion control of sandy soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 13, n. 3, p. 937–944, 2016.

MARTINEZ, B. C. *et al.* Experimental Optimization of Microbial-Induced Carbonate Precipitation for Soil Improvement. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, v. 139, n. 4, p. 587–598, 2013. Disponível em: <[http://ascelibrary.org/doi/10.1061/\(ASCE\)GT.1943-5606.0000787](http://ascelibrary.org/doi/10.1061/(ASCE)GT.1943-5606.0000787)>.

MUJAH, D.; SHAHIN, M. A.; CHENG, L. State-of-the-art review of biocementation by microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. *Geomicrobiology Journal*, v. 451, n. September, p. 01–52, 2016a. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01490451.2016.1225866>>.

MUJAH, D.; SHAHIN, M. A.; CHENG, L. State-of-the-Art Review of Biocementation by Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP) for Soil Stabilization. *Geomicrobiology Journal*, v. 451, n. September, p. 1–14, 2016b. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01490451.2016.1225866>>.

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

NEUPANE, D. *et al.* Distribution of mineralized carbonate and its quantification method in enzyme mediated calcite precipitation technique. *Soils and Foundations*, v. 55, n. 2, p. 447–457, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sandf.2015.02.018>>.

NG, W.; LEE, M.; HUI, S. An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, v. 62, n. 2, p. 723–729, 2012. Disponível em: <<http://waset.org/journals/waset/v62/v62-131.pdf>>.

OKWADHA, G. D. O.; LI, J. Optimum conditions for microbial carbonate

precipitation. *Chemosphere*, v. 81, n. 9, p. 1143–1148, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.066>>.

RAMMELT, C. F.; LEUNG, M. W. H. Tracing the Causal Loops Through Local Perceptions of Rural Road Impacts in Ethiopia. *World Development*, v. 95, p. 1–14, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.worlddev.2017.02.024>>.

SAFARI, A. *et al.* Impact of different parts of skid trails on runoff and soil erosion in the Hyrcanian forest (northern Iran). *Geoderma*, v. 263, p. 161–167, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.09.010>>.

SHAHRONKHI-SHAHRAKI, R. *et al.* Improving sand with microbial-induced carbonate precipitation. p. 1–14, 2014.

SHARMA, A.; R., R. Study on effect of Microbial Induced Calcite Precipitates on strength of fine grained soils. *Perspectives in Science*, v. 8, p. 198–202, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213020916300477>>.

SOON, N. W. *et al.* Improvements in engineering properties of soils through microbial-induced calcite precipitation. *KSCE Journal of Civil Engineering*, v. 17, n. 4, p. 718–728, 2013.

STOCKS-FISCHER, S.; GALINAT, J. K.; BANG, S. S. Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 31, n. 11, p. 1563–1571, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071799000826>>. Acesso em: 3 abr. 2015.

THOMAZ, E. L.; PERETTO, G. T. Science of the Total Environment Hydrogeomorphic connectivity on roads crossing in rural headwaters and its effect on stream dynamics. *Science of the Total Environment, The*, v. 550, p. 547–555, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.100>>.

UMAR, M.; KASSIM, K. A.; PING CHIET, K. T. Biological process of soil improvement in civil engineering: A review. *Journal of Rock Mechanics and Geotechnical Engineering*, v. 8, n. 5, p. 767–774, 2016.

WANG, Z. *et al.* Review of Ground Improvement Using Microbial Induced Carbonate Precipitation (MICP). *Marine Georesources & Geotechnology*, v. 618, n. March, p. 1064119X.2017.1297877, 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1064119X.2017.1297877>>.

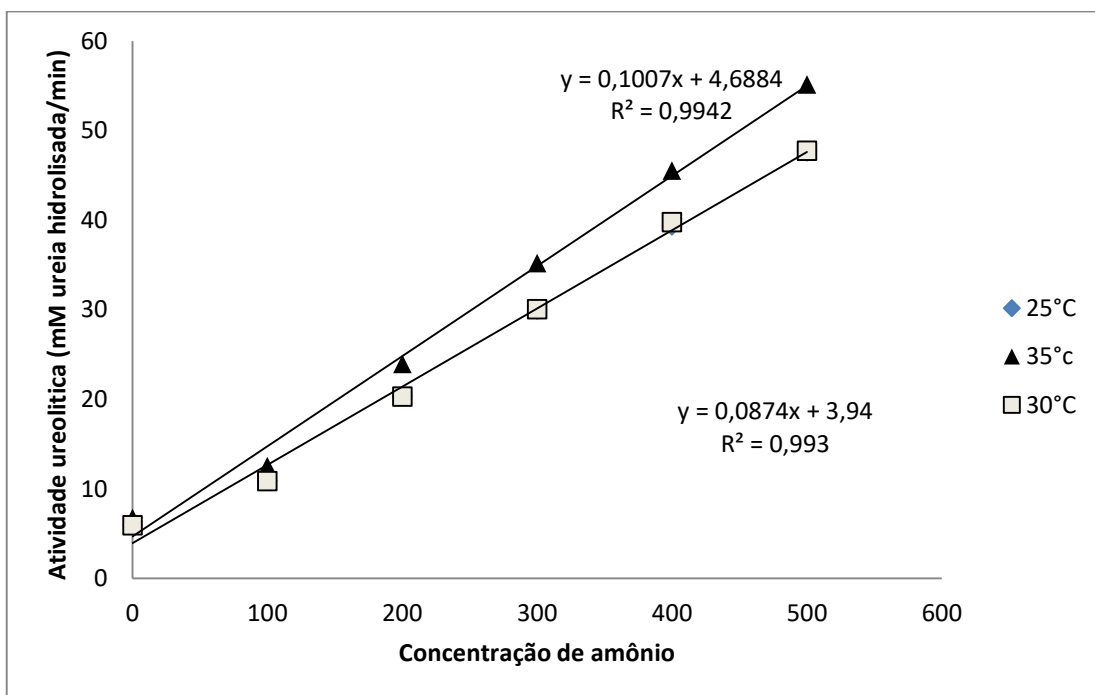
WHIFFIN, V. S. Microbial CaCO₃ Precipitation for the Production of Biocement. *Phd Thesis*, n. September, p. 1–162, 2004.

WHIFFIN, V. S.; VAN PAASSEN, L. A.; HARKES, M. P. Microbial Carbonate Precipitation as a Soil Improvement Technique. *Geomicrobiology Journal*, v. 24, n. 5, p. 417–423, 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490450701436505>>.

5. ANEXOS

ANEXO A. Curva de ajuste da temperatura

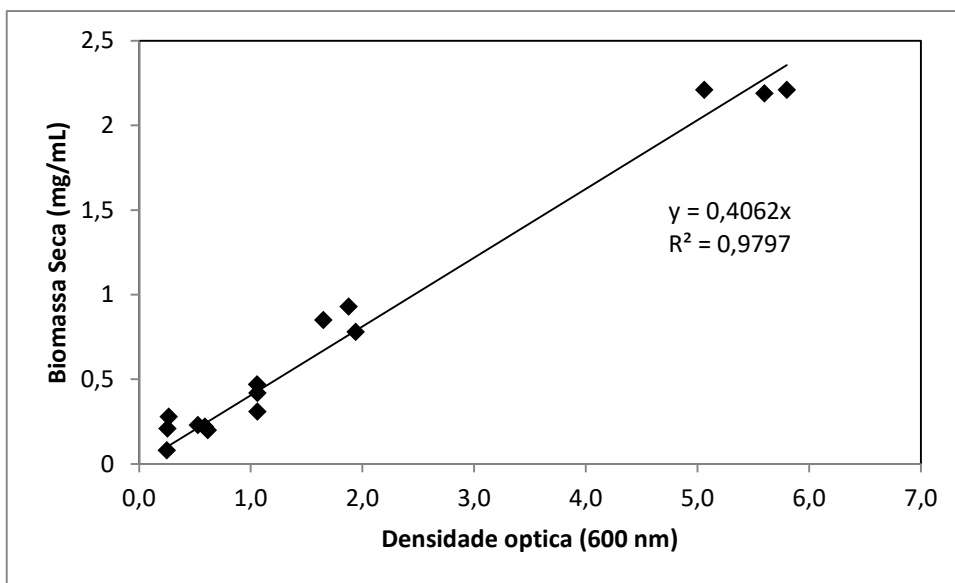
A atividade ureolítica é determinada para condições padrao a 25 °C como descrito no capítulo 2. Uma curva de ajuste foi necessária para determinações da atividade a 35°C.



ANEXO B. Regressão de ajuste para biomassa seca

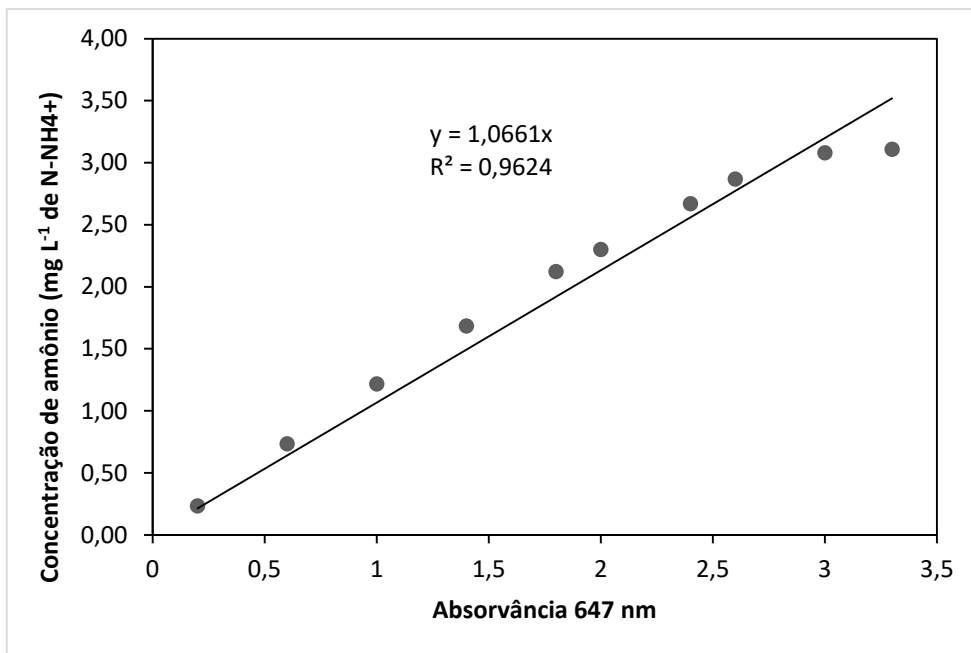
Uma relação linear existe entre a biomassa seca e a densidade óptica. A biomassa seca foi determinada pela expressão:

$$\text{Biomassa seca (mg/mL)} = 0,4062 * \text{Densidade óptica}$$



ANEXO B. Determinação de Amônio pelo método do salicilato

Uma curva padrão foi realizada para se determinar a concentração de amônio em mg/L de N-NH₄⁺. A absorbância foi determinada para diferentes concentrações amônio.



6. CONCLUSÃO GERAL

Foi identificada uma nova espécie microbiana com potencial para aplicação no processo de precipitação de carbonato de cálcio microbiologicamente induzida que produz altas taxas de atividade ureolítica.

Uma nova metodologia para a obtenção de altas atividades ureolítica usando *Serratia ureilytica* foi proposta. As condições ótimas de meio de cultura, pH, e temperatura foram determinadas.

Foram determinadas concentrações eficientes dos reagentes para precipitar carbonato de cálcio em areias. No entanto outros testes devem ser realizados para determinar as condições ótimas do processo e outros fatores devem ser avaliados.

A existência de diferentes mecanismos possíveis em relação ao papel dos microorganismos na precipitação de carbonato descreve a complexidade do processo de biomineralização e a necessidade de explorar mais no processo