

**Comparação de técnicas de tratamento de solos arenosos por biocimentação considerando a homogeneidade e seus efeitos na resistência à compressão simples**

**Francisco Ventura Centeno Dias**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Civil

**Mestrado Integrado em Engenharia Civil**

Orientadora: Professora Doutora Maria Rafaela Pinheiro Cardoso

**Júri**

Presidente: Professora Doutora Teresa Maria Bodas Freitas

Orientadora: Professora Doutora Maria Rafaela Pinheiro Cardoso

Vogal: Professor Doutor Jaime Alberto dos Santos

**Novembro 2019**

*(página deixada em branco intencionalmente)*

## Declaração

Declaro que o presente documento é um trabalho original da minha autoria e que cumpre todos os requisitos do Código de Conduta e Boas Práticas da Universidade de Lisboa.

*(página deixada em branco intencionalmente)*

## Agradecimentos

Agradeço à FCT (*Fundação para a Ciência e Tecnologia*) pelos fundos atribuídos no âmbito do projeto entre o IST e o INESC com a referência PTDC/ECI-EGC/32590/2017 (BIOSOIL).

À investigadora Sofia Duarte e ao professor Gabriel Monteiro pela paciência prestada no laboratório de Bioengenharia do IST a um estudante grosseiro e inexperiente de engenharia Civil.

Ao Gabriel, Miguel, Guilherme e restantes amigos do curso que me acompanharam no meu percurso pelo IST, pelas noitadas no Taguspark nas intermináveis fases de exame e cujas memórias e amizades permanecerão em mim.

Ao Miguel e à Inês por me empurrarem para a especialidade de Geotecnia e por me abrirem as portas deste mundo dos solos, aborrecido para muitos estudantes, mas apaixonante e inestimável para as pessoas certas. Um especial carinho para a Inês pela amizade que se construiu neste último ano de mestrado.

O mesmo pode ser dito para todos os professores desta especialidade no IST que nunca deixaram de transmitir a sua fascinação pelas variadas vertentes da Geotecnia. Um agradecimento para a Prof. Teresa de quem nunca me esquecerei pela ajuda que me prestou numa certa aula de Engenharia Civil e do Ambiente, era eu ainda caloiro.

À Patrícia, à Rita, ao Filipe e aos meus pais, pela pessoa que me tornei, para bem ou mal, agora que termino o período mais longo da minha vida.

Finalmente, o maior agradecimento vai para a energética Prof. Rafaela Cardoso, minha orientadora, cuja dedicação, paciência e orientação ajudou-me a compreender o papel primordial da investigação na convergência das experiências dos mais diversos países em nome do desenvolvimento do conhecimento humano.

*(Página deixada em branco intencionalmente)*

## Resumo

Pretendeu-se definir um método eficiente para aplicação de tratamento de solos arenosos por biocimentação. Desenvolveu-se um dispositivo experimental capaz de tratar provetes de areia com 7,2 cm de diâmetro e 12 cm de altura, usando enzima e bactéria. Foram testadas duas técnicas distintas de preparação dos provetes: i) pré-mistura de solo com bactéria, seguindo-se de injeção da solução de alimento, ii) injeção de bactéria seguido da solução de alimento. Em ambos os casos, as condições de injeção variaram: i) injeção pelo topo (coluna de infiltração) e ii) injeção com recurso a um tubo perfurado no interior do provete.

A homogeneidade do tratamento foi estudada através da avaliação de amostras retiradas de várias zonas dos provetes, do conteúdo em  $\text{CaCO}_3$  através de ensaios de lixiviação, com testes de porosimetria por intrusão de mercúrio, MIP e com a determinação das concentrações em iões amónio  $\text{NH}_4^+$  com reagente de Nessler. Imagens recolhidas em microscópio eletrónico de varrimento SEM e análises de difração de raios-X confirmaram a presença do mineral calcite.

Os resultados mostraram a redução do diâmetro médio dos macroporos e um teor médio de  $\text{CaCO}_3$  variando entre os 1,8% e 4,6%, distribuído de forma heterogénea entre o topo e base e segundo a direção radial. Os provetes pré-misturados com bactéria foram os que mostraram maiores teores de biocimento. O estudo da homogeneidade revelou teores em  $\text{CaCO}_3$  mais reduzidos nas secções inferiores dos provetes injetados com bactéria (mais longe do *inlet*).

Finalmente, foram realizados ensaios de compressão simples UCS para avaliar os ganhos de resistência e rigidez nos provetes tratados. Na comparação entre os valores medidos nos provetes de controlo e nos provetes tratados com bactéria verificou-se um incremento dos 18 kPa para os 150 kPa, demonstrando que o tratamento funcionou independentemente do método utilizado.

**Palavras-chave:** biocimentação, carbonato de cálcio, homogeneidade, MIP, UCS

*(Página deixada em branco intencionalmente)*



## **Abstract:**

The purpose of this work was to define an efficient method for sandy soil treatment using biocementation. An experimental device was developed to treat cylindrical soil samples with 7.2 cm diameter and 12 cm height using both enzyme and bacteria. Two sample preparation techniques were tested: (i) pre-mixing the soil with bacteria, then inject the feeding solution; (ii) inject bacteria followed by the feeding solution. In both, the injection conditions varied in two distinct ways: (i) injecting from the top, like a "shower" and (ii) injecting through a central pipe perforated along its length.

The homogeneity of the treatment was evaluated in several samples extracted from different zones of the specimens using X-Ray diffractometry and scanning electron microscope SEM images. Porosimetry tests (MIP), CaCO<sub>3</sub> dissolution using HCl acid and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations through Nessler reagent were also performed.

The results showed the reduction of average macropore diameter and CaCO<sub>3</sub> content varying 1.8% to 4.6%, unevenly distributed between the top and bottom sections, as well as along radial direction. Homogeneity studies showed larger concentration near the bottom sections (far from the inlet). The most homogeneous and cemented samples were found when mixing the bacteria with soil before injecting the feeding solution.

Finally, unconfined compression tests (UCS) were performed to evaluate the strength and stiffness earned with the treatment. In the comparison between the values measured in the control and in the specimens treated with bacteria a marked strength increment from 18 kPa to 150 kPa was observed, showing that treatment worked independently from the procedure adopted for its application.

**Keywords:** biocementation, calcium carbonate, homogeneity, MIP, UCS

*(Página deixada em branco intencionalmente)*

# Índice

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Objetivos.....	1
1.2	Estrutura do documento .....	2
<b>2</b>	<b>ESTADO DE ARTE</b> .....	<b>3</b>
2.1	Definição do processo de biocimentação.....	3
2.2	Enquadramento histórico.....	4
2.3	Parâmetros que influenciam a produção de biocimento .....	5
2.3.1	Concentração de bactérias e enzimas .....	5
2.3.2	Concentração de reagentes e produtos .....	6
2.3.3	Compatibilidade geométrica .....	7
2.3.4	Temperatura .....	7
2.3.5	pH .....	8
2.3.6	Adsorção das bactérias ao solo .....	9
2.4	Consequências físicas do tratamento .....	10
2.4.1	Colmatação e biocolmatação ( <i>Clogging e bioclogging</i> ).....	10
2.4.2	Heterogeneidade do CaCO <sub>3</sub> pelas amostras de solo .....	11
2.5	Efeitos do tratamento no comportamento hidromecânico.....	13
2.5.1	Ganho de resistência e rigidez .....	13
2.5.2	Redução da permeabilidade.....	14
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
3.1	Caracterização e preparação das amostras de solo.....	15
3.1.1	Caracterização do solo.....	15
3.1.2	Montagem de provetes.....	17
3.2	Preparação das bactérias e enzimas em pó .....	19
3.2.1	Crescimento bactérias e preparação solução com enzimas.....	19
3.2.2	Procedimento experimental.....	22
3.2.3	Preparação solução de enzimas em pó .....	23
3.2.4	Injeção enzimas e bactérias .....	23
3.3	Preparação e injeção da solução de alimento .....	24
3.3.1	Solução de alimento .....	24

3.3.2	Injeção de alimento .....	24
3.4	Monitorização imediata do tratamento e sua homogeneidade .....	26
3.4.1	Monitorização imediata.....	26
3.4.2	Determinação das concentração em iões $\text{NH}_4^+$ pelo método do reagente de Nessler ....	28
3.5	Avaliação da capacidade resistente e da rigidez .....	30
3.6	Avaliação da presença de $\text{CaCO}_3$ e da homogeneidade do tratamento .....	32
3.6.1	Mineralogia e microscopia.....	33
3.6.2	Teor em carbonato de cálcio .....	33
3.6.3	Porosimetria por intrusão de mercúrio (MIP) .....	35
3.7	Quadros-resumo.....	35
<b>4</b>	<b>CÂMARA DE INOCULAÇÃO.....</b>	<b>37</b>
4.1	Montagem inicial.....	37
4.1.1	Descrição do equipamento e procedimento.....	37
4.1.2	Primeira fase dos ensaios .....	39
4.1.3	Análise visual e qualitativa dos provetes tratados.....	40
4.2	Montagem final .....	42
4.2.1	Descrição das modificações adotadas.....	42
4.2.2	Ensaio efetuados .....	42
4.3	Resumo final.....	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
5.1	Resultados SEM e XRD .....	45
5.1.1	Análise por difração de raios X, XRD.....	45
5.1.2	Imagens microscópio SEM.....	46
5.2	Resultados dos ensaios à compressão simples (UCS) .....	50
5.2.1	Figuras de rotura .....	50
5.2.2	Avaliação da resistência e rigidez .....	51
5.3	Resultados das técnicas de avaliação da homogeneidade do tratamento.....	53
5.3.1	Ensaio de lixiviação – determinação do teor em $\text{CaCO}_3$ .....	53
5.3.1.1.	Análise dos provetes injetados (bactéria) B2st e B2ct.....	54
5.3.1.2.	Análise dos provetes pré-misturados (bactéria) B3st e B3ct.....	56
5.3.1.3.	Conclusão.....	57

5.3.1.4.	Análise provetes tratados com enzimas e de controlo.....	58
5.3.2	Porosimetria por intrusão de mercúrio, MIP .....	59
5.3.2.1.	Análise do provete injetado sem tubo (B2st) .....	60
5.3.2.2.	Análise provete injetado com tubo (B2ct) .....	62
5.3.2.3.	Análise do efeito do tubo.....	64
5.3.2.4.	Comparação com resultados dos provetes tratados com enzimas E3t e E4ct ....	66
5.3.2.5.	Conclusão.....	67
5.3.3	Distribuição de iões NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> pelo método Nessler.....	67
5.3.3.1.	Evolução geral das concentrações .....	68
5.3.3.2.	Análise dos provetes sem tubo B2st (bactéria injetada) e B3st (bactéria pré-misturada) .....	68
5.3.3.3.	Análise provetes com tubo B2ct (injetados) e B3ct (pré-misturados).....	69
5.3.3.4.	Análise entre provetes segundo método de injeção e preparação.....	70
5.3.3.5.	Conclusão.....	71
5.4	Discussão sobre as formas de injeção e preparação do solo estudadas.....	72
5.4.1	Validação das técnicas de monitorização .....	72
5.4.2	Efeito da pré-mistura e utilização de tubo.....	73
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES E DESENVOLVIMENTOS FUTUROS .....</b>	<b>77</b>
6.1	Conclusões.....	77
6.2	Estudos futuros.....	78
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXOS:.....</b>	<b>83</b>
	Anexo 1: Imagens SEM e correspondentes análises EDS.....	83
	Anexo 2: Comportamento difractário e identificação dos minerais que compõe o provete B2ct .....	88

*(Página deixada em branco intencionalmente)*

## Figuras

Figura 2.1 - Resultados SEM de areia isolada e tratada (Yasuhara et al., 2012).....	5
Figura 2.2 - Provette após 3 dias de tratamento (Al Qabany et al., 2012).....	5
Figura 2.3 - Esquema ilustrando a produção de biocimento em redor das bactérias (adaptado de Hammes e Verstraete, 2002) .....	6
Figura 2.4 - Efeito de várias espécies de bactérias selecionadas ao longo do tratamento em:(a) Variação da produção de amónio (NH <sub>3</sub> - NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ); (b) pH; (c) Crescimento das bactérias selecionadas (DO) (adaptado de Whitaker et al., 2018) .....	8
Figura 2.5 - Imagens captadas pelo microscópio SEM a) areia não tratada e b) areia biocimentada (adaptado de De Jong et al, 2006).....	10
Figura 2.6 - Efeito de colmatação dos vazios em solo contendo apenas biomassa (■), biomassa e CaCO <sub>3</sub> bacteriano (■) e CaCO <sub>3</sub> enzimático (□) (Nemati et al., 2005).....	11
Figura 2.7 - Exposição do corpo de areia biocimentado, após lavagem de partículas desagregadas (Van Paassen et al., 2009).....	12
Figura 2.8 - Conteúdo em CaCO <sub>3</sub> ao longo de um corte longitudinal do corpo cimentado da figura acima (adaptado de Van Paassen et al., 2009).....	12
Figura 2.9 - Variação do conteúdo de CaCO <sub>3</sub> (x) e da resistência confinada à compressão (●) no tratamento de uma coluna com 5 metros de comprimento (Whiffin et al., 2007) .....	13
Figura 2.10 - Relação da calcite precipitada com resistência UCS de amostras tratadas com enzima (•) e bactéria (□) (Yasuhara 2012).....	13
Figura 2.11 – Diminuição da permeabilidade normalizada com conteúdo em CaCO <sub>3</sub> para três concentrações distintas de alimento (Al Qabany e Soga, 2013) .....	14
Figura 3.1 - Curva granulométrica da areia tratada .....	16
Figura 3.2 - Amostras após peneiração .....	16
Figura 3.3 - Teste do picnómetro .....	16
Figura 3.4 - Peça cilíndrica superior horizontal e corpo cilíndrico central da câmara experimental em conjunto com dreno e filtro da nova solução.....	17
Figura 3.5 - Preparação do provete de areia com mistura prévia de bactérias: 1.a – 1.c) pré-mistura das bactérias com o solo, 2.a e 2.b) Colocação da areia na câmara 3.a e 4.a) Colocação do dreno e 3.b e 4.b) Colocação do geotêxtil .....	19
Figura 3.6 - Diluição do meio de cultura para leitura da densidade ótica .....	20
Figura 3.7 - Incubadora digital.....	21
Figura 3.8 - Espectrofotómetro.....	21
Figura 3.9 - Equipamentos usados para crescimento das bactérias: a) Autoclave para esterilização do meio e utensílios; b) Câmara de fluxo laminar para ambiente estéril de trabalho .....	22
Figura 3.10 - Falcon contendo 5 ml de meio de cultura (esquerda) e Balões contendo 20 e 200 ml de meio de cultura por inocular (direita).....	22
Figura 3.11 - Dispositivo experimental para tratamento dos provetes com biocimentação .....	25

Figura 3.12 - Esquema do interior do dispositivo experimental e das técnicas de injeção da solução de alimento testadas .....	26
Figura 3.13 - Fitas colorimétricas de monitorização imediata de: a) iões amónio ( $NH_4^+$ ), b) iões cloreto ( $Cl^-$ ), c) dicloro ( $Cl_2$ ) e d) pH .....	27
Figura 3.14 - Procedimento experimental para teste do Reagente de Nessler .....	29
Figura 3.15 - Curva standard relacionando densidade ótica e concentração em iões $NH_4^+$ (mM) .....	30
Figura 3.16 - Gradiente colométrico devido ao acréscimo em concentração iões $NH_4^+$ (0 a 0,5 mM) .....	30
Figura 3.17 - Câmara triaxial e prensa utilizada nos ensaios UCS.....	31
Figura 3.18 - Relação tensão-deformação típica de solos arenosos e ilustração dos parâmetros avaliados durante os ensaios UCS (adaptado de Van Paassen et al., (2010)).....	31
Figura 3.19 - Ilustração do seccionamento dos provetes para a extração de amostras para ensaios de caracterização da homogeneidade com exemplos das posições de onde se retiraram amostras .....	32
Figura 3.20 - Procedimento experimental para o ensaio de lixiviação com a) pesagem seca das amostras e papel filtro, b) e c) dissolução do $CaCO_3$ com ácido HCl, d) lavagem das amostras com água destilada, e) secagem a 100 °C e f) pesagem final do conjunto filtro mais solo.....	34
Figura 4.1 - Duas metades do corpo central.....	38
Figura 4.2 - - Base (esquerda) e topo (direita) da câmara (vista do interior).....	38
Figura 4.3 - Câmara de inoculação (vista do exterior).....	38
Figura 4.4 - Saída lateral da base obstruída por finos.....	40
Figura 4.5 - Provetes testados E2st (esquerda) e E3ct (direita).....	41
Figura 4.6 - Esquerda: Proвете E3ct após destacamento de partículas com pincel e Direita: Desenvolvimento de organismos biológicos na base do provete E3ct.....	41
Figura 4.7 - Saída central sem obstrução de finos após tratamento .....	42
Figura 4.8 - Presença de precipitado no interior dos tubos injetores a) provete B2ct e b) provete B3ct .....	43
Figura 5.1 - Comparação imagens SEM entre amostra não tratada (esquerda) e tratada (direita) .....	47
Figura 5.2 - Diferentes arranjos cristalinos do precipitado: forma amorfa (flechas laranjas), rosetas (amarelas) e formas cubicas (azuis) .....	47
Figura 5.3 - Mineral de calcite tipo roseta intacta e fragmentada (flecha amarela).....	48
Figura 5.4 - Partícula arenosa cimentada anteriormente a uma partícula plana.....	48
Figura 5.5 – Partículas arenosas agregadas pelo biocimento.....	48
Figura 5.6 - Contraste da quantidade de precipitado entre uma partícula lisa e um agregado irregular .....	49
Figura 5.7 - Figuras de rotura dos provetes de: Controlo a) C1; Injetadas b) B2st, c) B2ct e Pré-misturadas d) B3st, e) B3ct .....	50
Figura 5.8 - Diagramas tensão deformação obtidos dos ensaios UCS aos provetes de: a) controlo, b) injetados, c) pré-misturados .....	51
Figura 5.9 - Curvas tensão-deformação dos provetes biocimentados .....	53
Figura 5.10 – Conteúdo em $CaCO_3$ segundo as posições longitudinais e radiais dos provetes injetados B2st (esquerda) e B2ct (direita) .....	54



Figura 5.11 - Conteúdo em CaCO <sub>3</sub> segundo as posições longitudinais e radiais dos provetes pré-misturados sem tubo B3st (esquerda) e com tubo B3ct (direita) .....	56
Figura 5.12 - Conteúdo em CaCO <sub>3</sub> de diferentes posições das amostras tratadas com enzimas E4t (esquerda) e E3t (direita).....	58
Figura 5.13 - Curva de distribuição dos vazios segundo a posição radial do provete B2st nas posições topo (a) e meio (b) .....	60
Figura 5.14 - Curva de distribuição dos vazios no provete B2st segundo eixo longitudinal a) central e b) lateral .....	61
Figura 5.15 - Curva de distribuição dos vazios segundo a posição radial dos provetes B2st nas posições topo (a) e meio (b), e da B2ct na posição do meio (c) .....	63
Figura 5.16 - Curva de distribuição dos vazios no provete B2ct segundo eixo longitudinal a) central e b) lateral .....	64
Figura 5.17 - Curva de distribuição dos vazios entre provete B2ct (verde) e B2st (cor amarelada) (segundo eixo longitudinal a) central e b) lateral .....	65
Figura 5.18 - Comparação das curvas de distribuição dos vazios entre provetes biocimentados com bactéria no topo na posição central (a) e lateral (b) e com enzimas .....	66
Figura 5.19 - Amostra da base (esquerda) e da secção do meio (direita).....	67
Figura 5.20 - Distribuição das concentrações em iões NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> com volume efluente saído dos provetes sem tubo .....	69
Figura 5.21 - Distribuição das concentrações em iões NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> com volume efluente saído dos provetes com tubo .....	70
Figura 5.22 – Distribuição dos teores de carbonato de cálcio dos provetes injetados e pré-misturados segundo o eixo central (esquerda) e lateral (direita).....	73
Figura 5.23 - Distribuição dos tamanhos dos vazios dominantes (nm) determinados nas porosimetrias MIP ao longo da altura dos provetes injetados .....	73
Figura 5.24 - Distribuição da calcite em coluna tratada com tubo (esquerda) Neupane et al (2013), e da porosidade em provete injetado como coluna de infiltração direção ascendente (direita) Yasuhara et al (2012).....	74
Figura 5.25 - Distribuição das concentrações em iões NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> com volume efluente saído dos provetes injetados .....	75
Figura 5.26 - Distribuição das concentrações em iões NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> com volume efluente saído dos provetes pré-misturados.....	75
Figura 5.27 - Esquema do regime de escoamento esperado nos provetes com tubo (esquerda) e colune da infiltração (direita) .....	76

*(Página deixada em branco intencionalmente)*

## Quadros:

Quadro 3.1 - Formas de tratamento dos provetes biocimentados.....	18
Quadro 3.2 - Reagentes e quantidades para preparação de 1 L de meio de cultura.....	20
Quadro 3.3 - Períodos de incubação e densidades óticas finais de cada fase de crescimento das culturas bacterianas aplicadas (X – crescimento falhado).....	21
Quadro 3.4 - Substâncias e quantidades para produção de 1 L de solução de alimento .....	24
Quadro 3.5 - Formas de injeção do alimento e agentes catalisadores testadas em cada ensaio .....	36
Quadro 3.6 - Correspondência dos testes de análise realizados aos ensaios.....	36
Quadro 4.1 - Quadro-resumo dos ensaios realizados .....	44
Quadro 5.1 - Minerais identificados em cada provete.....	46
Quadro 5.2 - Propriedades mecânicas das provetes ensaiados .....	51

*(Página deixada em branco intencionalmente)*

# 1 Introdução

São correntes as situações em que os terrenos existentes em locais de construção não cumprem os requisitos da engenharia, tendo-se que recorrer ao seu tratamento. Embora as soluções técnicas existentes no mercado para melhoramento ou tratamento de solos sejam variadas, impõe-se a necessidade constante da procura por soluções inovadoras para fazer face às exigências crescentes na segurança e qualidade das estruturas da engenharia (Neupane *et al.*, 2013). Para além disso, há uma necessidade crescente de encontrar soluções ambientalmente sustentáveis. A biocimentação é uma destas técnicas que tem vindo a ganhar notoriedade pelo uso peculiar de agentes biológicos e pela diversidade de aplicações *in-situ* passando pelo reforço mecânico de solos à impermeabilização de fundações (Al Qabany *et al.*, 2012).

Este processo biológico consistindo na formação de biocimento graças à hidrólise de ureia com a ação da enzima urease, modifica o comportamento mecânico-hidráulico dos solos tratados. Estas modificações manifestam-se sob a forma de precipitado de carbonato de cálcio capaz de preencher e colmatar o meio poroso, criando ligações e cimentando o solo (Zhong e Islam, 1995; Whiffin, 2004).

## 1.1 Objetivos

Este trabalho foi desenvolvido no seguimento de um projeto em curso entre o IST e o INESC-MN financiado pela FCT e com a referência PTDC/ECI-EGC/32590/2017 (BIOSOIL).

Se esta técnica se revela mais sustentável em relação a alternativas como o recurso a calda de cimento (DeJong *et al.*, 2006), também é verdade que a imprevisibilidade dos resultados em profundidade justificam a necessidade de uma monitorização constante e de uma avaliação alargada dos seus resultados (Whiffin *et al.*, 2007). Esta incerteza está predominantemente associada à distribuição do precipitado pelo solo, responsável pelos ganhos mecânicos e hidráulicos, diferindo segundo as condições locais e as propriedades do tratamento aplicado.

Deste modo, e focando-se no estudo da homogeneidade do tratamento e seus efeitos no comportamento de areias tratadas, foi desenvolvido um equipamento permitindo a aplicação do tratamento em provetes de areia segundo diferentes métodos: (1) Injeção de bactérias ou enzimas e da solução de alimento, com recurso a um tubo perfurado colocado no interior da amostra; (2) Percolação de bactérias ou enzimas e da solução de alimento através da amostra, num ensaio semelhante a uma coluna de infiltração. Foram também feitas variações, sendo uma delas a mistura prévia do solo com bactérias, na montagem, e então usando os métodos (1) ou (2), adicionar a solução de alimento.

Procurou-se identificar o método de preparação mais eficiente na obtenção de uma distribuição homogênea de precipitado de carbonato de cálcio no solo tratado. Para tal, os provetes preparados e tratados com os diversos métodos foram analisados com técnicas de monitorização, entre os quais ensaios de lixiviação, testes de porosimetria por intrusão de mercúrio MIP, determinação das concentrações em íões amónio pelo método de Nessler, imagens de microscópio eletrónico de varrimento SEM e análise mineralógica por difração de raios X. Estas análises foram efetuadas em amostras retiradas dos provetes de modo a ser possível fazer uma discretização do estado de cimentação ao longo do seu comprimento e radialmente.

Finalmente, após conseguir-se um tratamento eficaz dos provetes foram realizados ensaios de compressão simples (UCS). Estes ensaios permitiram fazer a correspondência entre os ganhos mecânicos e os graus de cimentação obtidos nos provetes pelos diferentes métodos de tratamento.

## **1.2 Estrutura do documento**

O presente trabalho encontra-se organizado em seis capítulos incluindo este. Neste primeiro capítulo é feita uma breve introdução dos objetivos, de como foram atingidos e da organização do documento.

O capítulo 2 enquadra o estado do conhecimento científico quanto à técnica de biocimentação, enumerando-se os diferentes parâmetros químicos e físicos considerados durante a fase de desenvolvimento da câmara de inoculação e, mais tarde, na avaliação do estado de cimentação dos provetes.

O capítulo 3 apresenta os materiais e as condições experimentais utilizados durante a aplicação do tratamento nos provetes arenosos. Neste capítulo são também apresentadas as técnicas de monitorização e caracterização usadas para o estudo da homogeneidade e para os ensaios mecânicos.

O capítulo 4 descreve o processo de aprendizagem em que se procedeu à aplicação do tratamento de biocimentação e das modificações pontuais na câmara de inoculação, antes de se alcançar a montagem final utilizada para os provetes de areia homogêneas.

No capítulo 5 é realizada a discussão e comparação dos resultados obtidos das técnicas de monitorização e caracterização nos provetes tratados.

Finalmente, no capítulo 6 apresentam-se as conclusões deste trabalho e alguns temas relacionados com o que foi feito neste estudo que podem ser desenvolvidos e investigados no futuro.

## 2 Estado de Arte

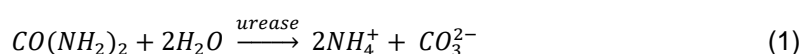
Este capítulo enquadra o estado do conhecimento científico no que toca, por um lado, o controlo e monitorização do processo que envolve a biocimentação em solos e, por outro, os seus efeitos no comportamento do solo tratado.

Será abordada, simultaneamente, como se aplica a técnica de biocimentação com recurso a bactérias ou a enzimas, procurando-se identificar as condições ambientais e químicas ótimas para a produção de carbonato de cálcio. A abordagem será feita também de forma a identificar potenciais métodos de avaliação da distribuição do biocimento, e as consequências deste último no comportamento do solo uma vez que homogeneidade tem um grande impacto na eficiência do tratamento.

### 2.1 Definição do processo de biocimentação

O processo de biocimentação baseia-se na produção de carbonato de cálcio por micro-organismos presentes no meio. A forma como se processa a precipitação e a função do micro-organismo toma vários caminhos, dependendo fortemente das condições do local (reagentes presentes, alcalinidade e salinidade do meio), e da própria família do micro-organismo (Castanier *et al.*, 1999; Hammes e Verstraete, 2002). O mais usual é recorrer a bactérias urolíticas, que por hidrólise de ureia (fonte de nitrogénio (Whitaker *et al.*, 2018)) conseguem precipitar carbonato de cálcio quando na presença de uma fonte de cálcio.

Assim, o processo de biocimentação traduz-se na formação de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), por meio da degradação de ureia ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) em iões carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (Eq 1), quando presente em soluções ricas em iões cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Eq 2). Da degradação da ureia formam-se também iões de amónio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Eq 1) que induzem um aumento da alcalinidade do meio para valores de pH básicos (Stocks-Fischer *et al.*, 1999; Yasuhara *et al.*, 2012).



A fonte habitual de cálcio, em trabalhos de investigação, existe frequentemente sob a forma de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), pela sua fácil obtenção e facilidade de dissolução (Eq 3) (Whiffin, 2004).



A hidrólise da ureia é catalisada com recurso à enzima urease, que se encontra presente em um grande número de bactérias, sendo a estirpe *Sporosarcina Pasteurii*, conhecida formalmente por *Bacillus Pasteurii*, a mais comum (Wei-Soon *et al.*, 2012). Destacam-se sobretudo pela sua elevada atividade enzimática e forte adaptabilidade a meios adversos (Hammes e Verstraete, 2002; Whiffin, 2004).

A enzima urease também se encontra disponível sob forma de resíduo seco (pó), extraída normalmente da planta *Canavalia Ensiformis* (*Jack Bean* ou feijão). Esta solução é essencialmente empregue por se evitar a fase demorada de crescimento das bactérias (Carmona *et al.*, 2016).

A esta técnica confere-se habitualmente o nome de *Microbial Induced Calcite Precipitation* (MICP), sendo o mineral calcite a forma mais desejada do carbonato de cálcio por ser mais durável dada a sua baixa dissolução em meios neutros (Wei *et al.*, 2015),

## 2.2 Enquadramento histórico

Os estudos mais relevantes da técnica de biocimentação com aplicação em Engenharia Civil aparentam ter iniciado nas décadas de 80-90. Foi neste período que surgiram estudos na área de Ambiente e Biologia que expuseram o efeito das condições locais, como a temperatura e níveis de alcalinidade, na atividade enzimática da urease presente em solos destinados para agricultura (Sahrawat e Patancheru, 1984; Pedrazzini *et al.*, 1987). Paralelamente assistiu-se, no domínio da Engenharia do Petróleo, à monitorização de fenómenos de biocimentação no tratamento de rochas altamente permeáveis (Gollapudi *et al.*, 1995), e o seu recurso enquanto técnica de tratamento seletivo em fendas de formações rochosas de reservatórios de óleo (Zhong e Islam, 1995)

O potencial da biocimentação na redução da permeabilidade de meios porosos foi igualmente reconhecido em solos arenosos ainda na década de 90 no artigo de Gollapudi *et al.* (1995), que demonstrou a relação direta entre a produção de biocimento por micro-organismos presentes no meio e a redução da permeabilidade do solo através da colmatação dos vazios.

Contudo, é só no princípio do século XXI que se dá início ao estudo da biocimentação enquanto técnica capaz de melhorar os solos mecanicamente, encontrando-se nos artigos de Whiffin (2004) e DeJong *et al.* (2006) os primeiros ensaios mecânicos mais relevantes, registados em amostras de solos tratados por micro-organismos.

As aplicações em larga escala vieram-se a concretizar poucos anos mais tarde com sucesso (Van Paassen *et al.*, 2009; Gomez *et al.*, 2015), vindo-se a confirmar o *biogrout* como nova técnica de melhoria de solos através da bio mineralização de  $\text{CaCO}_3$  (carbonato de cálcio).

O objetivo desta técnica passa pela criação de ligações de calcite entre as partículas de solo (Figura 2.1), ditas ligações ativas, resultando em amostras de solo coesas como se observa na figura 2.2, e quimicamente estáveis. Considerada como uma técnica mais amigável para o ambiente (DeJong *et al.*, 2006), espera-se que possa vir a substituir outros métodos atuais, mais agressivos para o ambiente, como a utilização de calda de cimento.



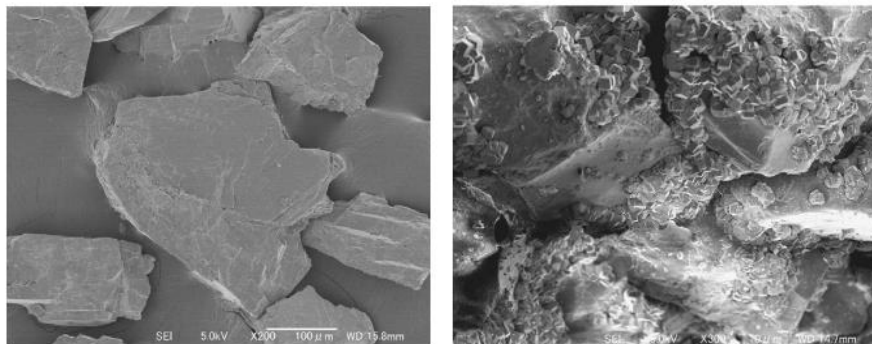


Figura 2.1 - Resultados SEM de areia isolada e tratada (Yasuhara *et al.*, 2012)



Figura 2.2 - Provete após 3 dias de tratamento (Al Qabany *et al.*, 2012)

## 2.3 Parâmetros que influenciam a produção de biocimento

### 2.3.1 Concentração de bactérias e enzimas

Para a biocimentação de solos é usual usar bactérias urolíticas, sendo também possível utilizar enzimas (urease) em sua substituição (Carmona *et al.*, 2016).

A concentração de bactérias tem impacto, por um lado, na quantidade de enzimas que é libertada para o exterior com o intuito de hidrolisar a ureia presente ao seu redor e, por outro, na proliferação de locais de precipitação de cristais de calcite (Wei-Soon *et al.*, 2012). De facto, para além da função de agente catalisador, a proximidade do processo de hidrólise da ureia às membranas da bactéria permite a criação de condições que promovem o crescimento de cristais de calcite em seu redor (ver Figura 2.3) (Hammes e Verstraete, 2002). Do mesmo modo, uma maior concentração de bactérias diminui o risco de corte do acesso ao alimento por excesso de precipitação (asfixia e *clogging*) ao multiplicar os locais de nucleação e promover a distribuição do precipitado pelos vazios do solo (Stocks-Fischer *et al.*, 1999).

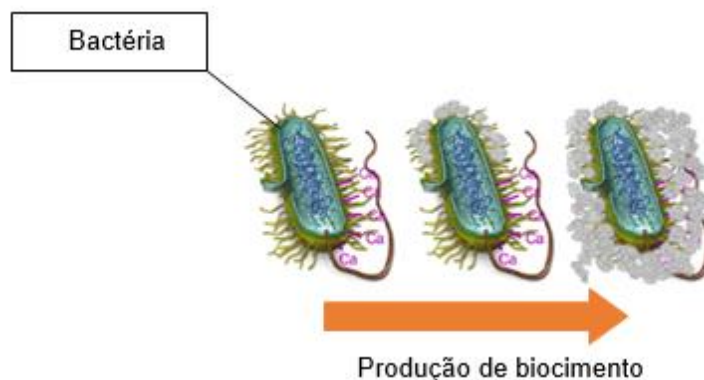


Figura 2.3 - Esquema ilustrando a produção de biocimento em redor das bactérias (adaptado de Hammes e Verstraete, 2002)

Contudo, a importância da concentração de bactérias define-se principalmente pela necessidade de as dispersar homogeneamente pelo solo, e menos pela sua capacidade em gerar precipitado, uma vez que a quantidade de urease libertada para o meio varia consoante a ureia disponível (Hammes e Verstraete, 2002).

Pelo contrário, a quantidade de precipitado gerado a partir da utilização de enzimas em pó, depende fortemente das suas concentrações existentes no meio de reação (Yasuhara *et al.*, 2012; Carmona *et al.*, 2016) uma vez que a quantidade de enzimas é finita. Em ensaios realizados em meio aquoso, Neupane (2013) concluiu que quantidades finais de 3 g/l seriam suficientes para se converter até 95% dos reagentes (concentração 0,5 M ou 0,5 mol/l) em carbonato de cálcio.

Porém, é comum encontrar na literatura quantidades em urease 20 vezes inferiores, mas com percentagens de sucesso semelhantes (Neupane *et al.*, 2013; Carmona *et al.*, 2016). Este facto pode ser justificado pela especificidade de cada variedade de enzima em pó disponível no mercado e que difere de estudo para estudo.

### 2.3.2 Concentração de reagentes e produtos

A solução de reagentes, apelidada igualmente de solução de alimento, é composta essencialmente por uma fonte de carbonato (ureia), e de cálcio (cloreto de cálcio). Estequiometricamente (Eq. 2), a solução equimolar de ambos os reagentes permite uma conversão eficiente em carbonato de cálcio, uma vez que é necessário 1 mol de ureia e 1 mol de cloreto de cálcio para formar 1 mol de carbonato de cálcio.

É através desta relação que muitos autores se baseiam no estudo da aplicabilidade de certas concentrações equimolares de reagentes, ao investigarem a eficiência química de conversão pela dissolução de  $\text{CaCO}_3$  com ácido e posterior pesagem seca das amostras tratadas (Al Qabany *et al.*, 2012; Neupane *et al.*, 2013). Assim, Al Qabany *et al.* (2012) indicou que para concentrações até 0,5 M (ou 0,5 mol/l) de alimento injetado, a quantidade de precipitado obtido pelo micro-organismo *Bacillus Pasteurii* atingia valores de eficiência química de 90% (ou 90% de reagentes convertidos em  $\text{CaCO}_3$ ). Estes valores são corroborados por Whiffin (2004) que confirmou o mesmo fenómeno até 1,5 M.

Contudo, para concentrações superiores, registam-se quebras na atividade enzimática da urease e, por consequência, na produção de calcite (Oliveira *et al.*, 2013). Este fenómeno é vinculado às elevadas concentrações de cálcio que inibem o bom funcionamento das células (Whiffin, 2004).

A frequência com que a injeção de alimentos é efetuada tem também efeito sobre a eficiência química de conversão, já que o tempo para as reações de biocimentação ocorrerem tem que ser tido em conta. Assim, Al Qabany (2012) mostrou que ao variar a frequência e dosagem dos reagentes injetados, esta eficiência atingia um máximo para um *input* de 0,042 mol/L/h, diminuindo até aos 50%, para *input* maiores, até 0,082 mol/L/h.

### 2.3.3 Compatibilidade geométrica

As bactérias são o micro-organismo mais comum no solo, o seu diâmetro podendo rondar entre os 0,5 e os 3,0  $\mu\text{m}$  (Mitchell e Santamarina, 2005). A compatibilidade da geometria dos produtores de urease com o tamanho dos vazios do solo é crítica quando o transporte e distribuição das bactérias pelo solo são necessários para o sucesso do tratamento. Acrescenta-se a necessidade de espaço para colonização e crescimento da bactéria para o seu bom funcionamento e circulação dos reagentes pelos vazios do solo.

A excessiva presença de argilas e siltes num solo são, conseqüentemente, prejudiciais ao movimento das bactérias pelo solo. Segundo Mitchell e Santamarina (2005), um solo apto, geometricamente, para receber bio modificações, deverá deter uma fração em partículas tamanho argila inferior a 12%, encontrando-se na literatura sobretudo amostras de areias tratadas (Van Paassen *et al.*, 2009; Al Qabany *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013).

### 2.3.4 Temperatura

Em ensaios realizados com urease em pó, destacou-se que a atividade enzimática é sensível à temperatura do meio em que se encontra, a taxa de hidrólise atingindo o seu pico por volta dos 60°C e inibindo-se drasticamente para temperaturas mais elevadas (Sahrawat e Patancheru, 1984). Salienta-se, no entanto, a impraticabilidade destas temperaturas em ambientes fora do laboratório.

No caso das bactérias, num estudo comparativo com a opção de enzimas de 2005, Nemati observou que um aumento da temperatura do meio dos 20°C para os 30°C levava a um acréscimo da taxa de decomposição da ureia, enquanto que a mesma taxa dos 30°C para os 40°C mantinha-se constante. Embora tal fenómeno possa ser associado ao tipo de bactéria utilizada no estudo, diferente da usual *B. Pasteurii*, não se pode deixar de observar que este tipo de micro-organismo vive sobretudo em solos cuja temperatura varia entre os 20°C e os 35°C ao longo do ano, pelo menos em solos tropicais (Sahrawat e Patancheru, 1984).

Todavia, tanto no caso das bactérias como da enzima em pó, não obstante a alteração da taxa de hidrólise de ambas com a temperatura, a completa decomposição da ureia é sempre alcançada desde que haja tempo suficiente para ocorrer reação (Nemati e Voordouw, 2003).

### 2.3.5 pH

Durante o processo de biocimentação, a hidrólise da ureia leva à formação de íões amónio ( $\text{NH}_4^+$ ) que elevam os níveis de alcalinidade do meio, este estabilizando-se à volta do pH 8,5 a 9,5 (Stocks-Fischer *et al.*, 1999; Whitaker *et al.*, 2018). Este aumento sinaliza o bom início do desenrolar da hidrólise da ureia e está indiretamente correlacionado com o crescimento da bactéria catalisadora (relacionado com valores de densidade ótica) pois indica a transformação da ureia em fonte de nitrogénio.

Pode observar-se esta evolução na figura 2.4 para diferentes tipos de bactérias urolíticas e não urolíticas, quando expostas ao mesmo tipo de alimento, entre as quais a *Sporosarcina Pasteurii*. Contudo, esta evolução não define as taxas de degradação da ureia nem indica a existência de precipitação de carbonato de cálcio (Yasuhara *et al.*, 2012).

A criação de condições alcalinas traz múltiplas vantagens para a reação química de biocimentação. Em primeiro, é neste intervalo de pH que se observa o pico na atividade enzimática (Stocks-Fischer *et al.*, 1999). Depois, a proximidade das enzimas às membranas das bactérias cria condições alcalinas locais propícias à dissolução e fixação local dos sais cálcio. Em conjunto com a proximidade dos íões carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) criados da hidrólise da ureia há uma sucessiva precipitação de  $\text{CaCO}_3$  (Hammes e Verstraete, 2002).

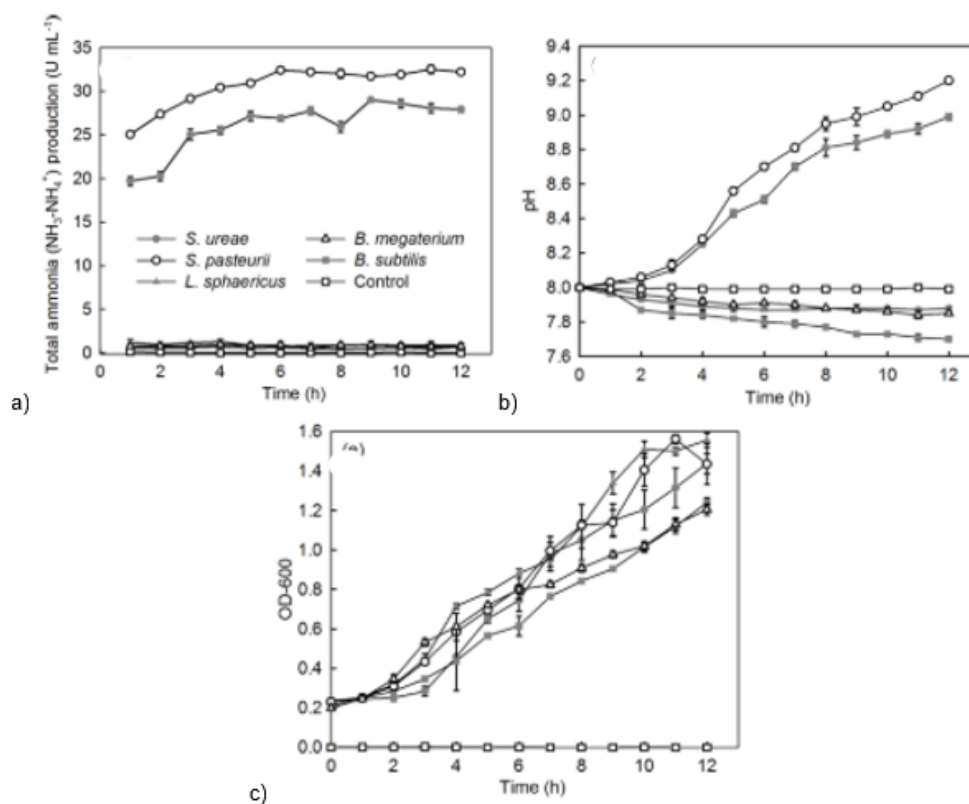


Figura 2.4 - Efeito de várias espécies de bactérias selecionadas ao longo do tratamento em:(a) Variação da produção de amónio ( $\text{NH}_3 - \text{NH}_4^+$ ); (b) pH; (c) Crescimento das bactérias selecionadas (DO) (adaptado de Whitaker *et al.*, 2018)

### 2.3.6 Adsorção das bactérias ao solo

Num meio em que o contínuo fornecimento de reagentes é necessário para a distribuição e crescimento de cristais de  $\text{CaCO}_3$ , o risco de lavagem e arraste das bactérias para fora do local destinado a receber o tratamento tem que ser considerado.

Para tal, o estudo da capacidade de aderência destes micro-organismos às partículas de solo é um dos fatores mais importantes para o sucesso do tratamento, geralmente executado através da relação da densidade ótica (DO) do efluente com a lavagem, ou retenção de atividade bacteriana na amostra (Gannon *et al.*, 1991; Harkes *et al.*, 2010). Pode injetar-se fluidos antes de se injetar as bactérias. Estes fluidos são denominados de fixação e devido à sua elevada salinidade, promovem a adsorção e concentração das bactérias, levando ao desenvolvimento de cristais de calcite com maiores dimensões.

Contrário a esta tendência, podem também injetar-se fluidos com baixa salinidade tais como a água destilada. Neste caso servem para promover o transporte e possível remobilização de bactérias já fixas. Esta propriedade permite, por um lado, uma homogeneização da distribuição de bactérias pela amostra e, por outro, o aumento da distância de alcance do tratamento (Gannon *et al.*, 1991; Harkes *et al.*, 2010)

## 2.4 Consequências físicas do tratamento

### 2.4.1 Colmatação e biocolmatação (*Clogging e bioclogging*)

A precipitação de calcite em grandes quantidades resulta na obstrução dos interstícios de um solo (ver figura 2.5) e dificulta a passagem da água, sendo uma solução duradoura devido à baixa dissolução deste mineral em meios neutros (Whitaker *et al.*, 2018). A permeabilidade de uma areia (valores típicos  $10^{-5}$  m/s, Maranha das Neves, 2007) reduz-se com o aumento do número de inoculações de reagentes feitas, chegando à ordem dos  $10^{-7}$  m/s (Chou *et al.*, 2011).

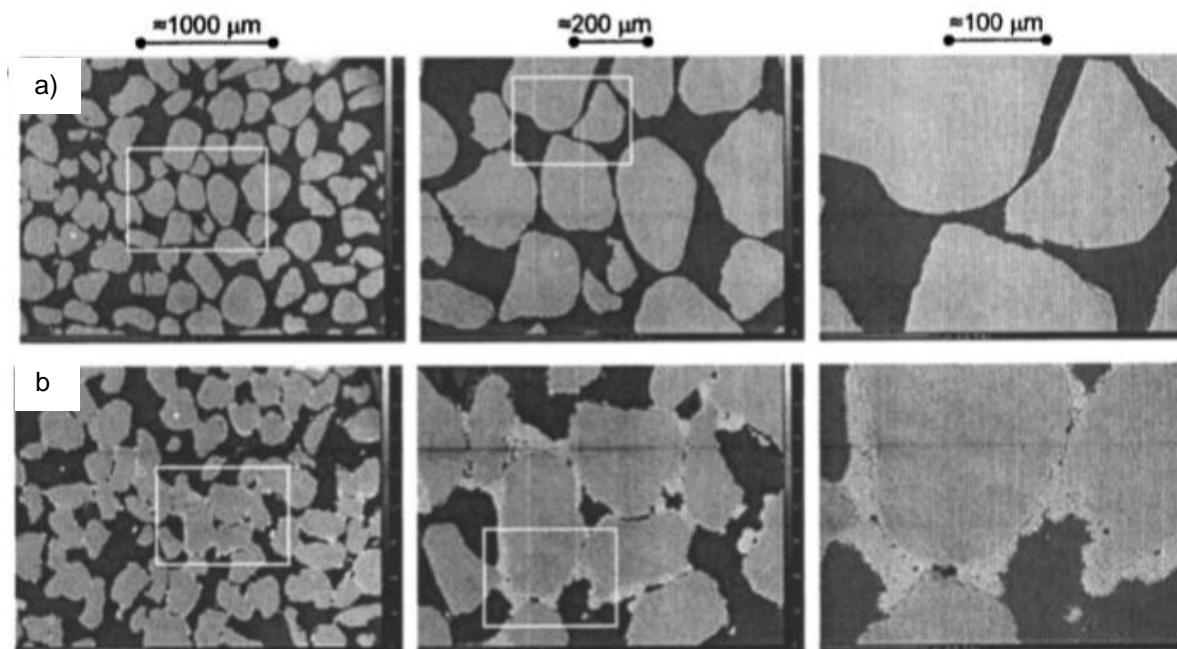


Figura 2.5 - Imagens captadas pelo microscópio SEM a) areia não tratada e b) areia biocimentada (adaptado de De Jong *et al.*, 2006)

Não obstante, a redução de caudal num solo tratado deve-se igualmente a outros mecanismos que incluem a produção de gases pouco solúveis, que são produtos finais da reação de biocimentação, agregação de células e a acumulação de biomassa extracelular vitais para a sobrevivência e expansão dos micro-organismos (Bavaye e Vandevivere, 1992).

Num estudo comparativo de 2005, Nemati observou que o maior contributo à obstrução dos interstícios para a opção bacteriana (neste caso *Proteus Vulgaris*), provinha da produção de biomassa extracelular, sendo reduzido o contributo da calcite (figura 2.6). Embora a dominação da biomassa em relação à calcite possa ser explicada pela falta de eficiência da bactéria empregue no estudo na produção de  $\text{CaCO}_3$ , a degradação da matéria orgânica e subsequente impacto na permeabilidade do solo deve ser equacionada a longo prazo.

Já quando se usa apenas enzima, há somente o efeito de colmatação dos vazios devido à presença de  $\text{CaCO}_3$ . Neste caso a permeabilidade atinge níveis semelhantes ao tratamento com recurso a

bactérias para uma só inoculação (redução em mais de 50%). Com a repetição de inoculações, porém, o ganho em redução de caudal é mais vantajosa para a enzima chegando aos 95% (figura 2.6). Tal deve-se em parte à melhor eficiência da enzima em pó comparada à da bactéria empregue no estudo na hidrólise de ureia, e pela paragem de crescimento da biomassa após primeira injeção de alimento (Nemati *et al.*, 2005).

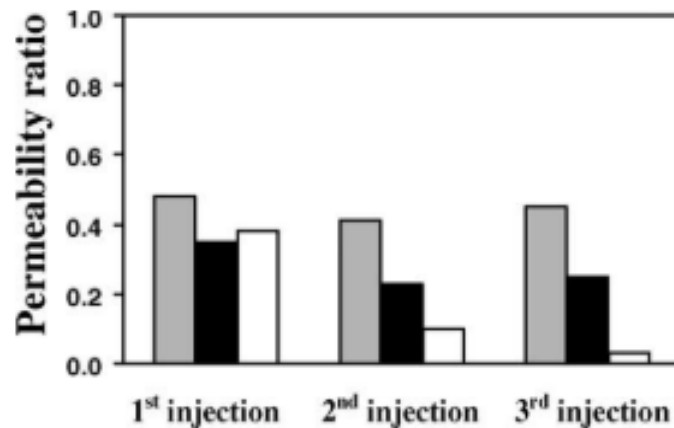


Figura 2.6 - Efeito de colmatção dos vazios em solo contendo apenas biomassa (□), biomassa e CaCO<sub>3</sub> bacteriano (■) e CaCO<sub>3</sub> enzimático (▒) (Nemati *et al.*, 2005)

#### 2.4.2 Heterogeneidade do CaCO<sub>3</sub> pelas amostras de solo

Como se observa pela figura 2.7, as amostras de solo após tratamento apresentam um corpo cimentado, surgindo com a lavagem da areia solta. É claro, pela figura, que as dimensões e forma deste corpo estão confinados pelas linhas de escoamento da solução de alimento e expõem a variabilidade da distribuição da calcite pelo corpo da amostra de solo (ver figura 2.8).

Esta heterogeneidade é explicada, em parte, pelas condições de tratamento e pelas propriedades dos micro-organismos catalisadores. Em primeiro, a formação de CaCO<sub>3</sub> numa específica localização depende da presença da bactéria, e do seu acesso ao alimento ao longo do tratamento. Durante a fase de injeção das bactérias, a distância percorrida pela mesma está sujeita às condições de tratamento impostas que promovem, consoante o desejado, a adsorção ou transporte destas, sendo necessário promover uma distribuição homogênea pelo solo a tratar (Harkes *et al.*, 2010).

Por outro lado, o acesso ao alimento pode ser limitado pela asfixia autoinduzida da bactéria, com o excesso de formação de cristais de calcite junto às suas membranas ou pelo impedimento da entrada local de alimento em certos vazios devido ao efeito *clogging* (obstrução de vazios pela formação de calcite) (Van Paassen *et al.*, 2009).

Mais, as condições de injeção como a velocidade de injeção do alimento (Whiffin *et al.*, 2007), a aparição de caminhos preferenciais de escoamento, ou condições químicas locais adversas, podem igualmente favorecer a formação de calcite em certas zonas em detrimento de outras.



A fixação de um procedimento de injeção é, desde logo, essencial, no intuito de minimizar esta heterogeneidade e obter um modelo de distribuição previsível e replicável em solos padrão.



Figura 2.7 - Exposição do corpo de areia biocimentado, após lavagem de partículas desagregadas (Van Paassen et al., 2009)

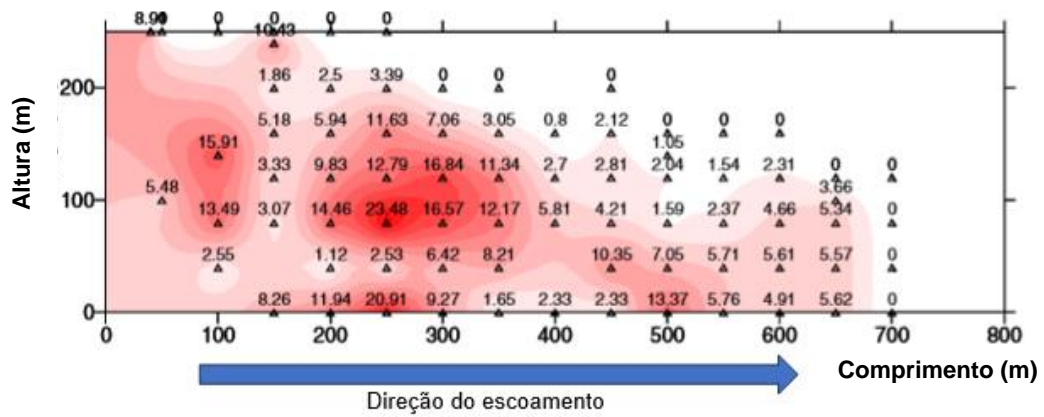


Figura 2.8 - Conteúdo em CaCO<sub>3</sub> ao longo de um corte longitudinal do corpo cimentado da figura acima (adaptado de Van Paassen et al., 2009)



## 2.5 Efeitos do tratamento no comportamento hidromecânico

### 2.5.1 Ganho de resistência e rigidez

A utilização da biocimentação tanto com recurso à enzima em pó ou à bactéria traz potenciais proveitos em ganhos mecânicos para o solo. Num estudo comparativo de 2013 entre o tratamento com recurso a enzimas e a bactérias, Yasuhara (2012) demonstrou a existência de uma estreita correlação entre a quantidade de  $\text{CaCO}_3$  precipitado e o melhoramento das propriedades mecânicas de dois solos distintos (figura 2.10). A mesma demonstração foi feita por Al Qabany (2013) ao relacionar a resistência à compressão simples ao  $\text{CaCO}_3$  precipitado pelas suas amostras tratadas com diferentes frequências de injeção e doses de alimento. Estas resistências variavam entre os 150 e os 300 kPa para um teor entre 2,5 a 4% de precipitado em relação à massa de solo das amostras.

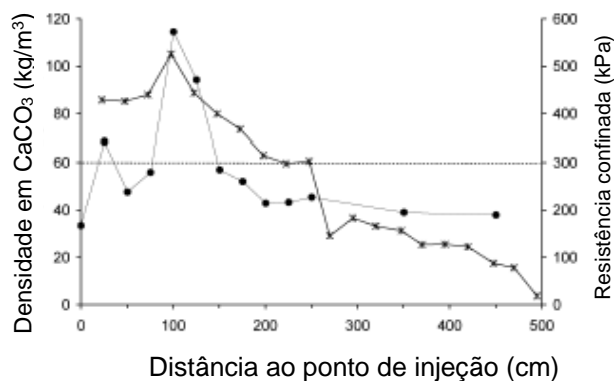


Figura 2.9 - Variação do conteúdo de  $\text{CaCO}_3$  (x) e da resistência confinada à compressão (●) no tratamento de uma coluna com 5 metros de comprimento (Whiffin et al., 2007)

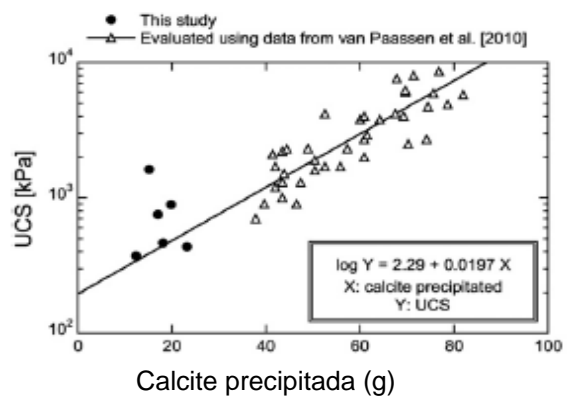


Figura 2.10 - Relação da calcite precipitada com resistência UCS de amostras tratadas com enzima (●) e bactéria (□) (Yasuhara 2012)

Whiffin et al. em 2007, por seu lado, concluiu que na sua coluna preparada com 5 metros de comprimento, apenas os troços com teores de calcite acima dos 60  $\text{kg}/\text{m}^3$  registavam aumentos substanciais na sua resistência (figura 2.9), aludindo a um teor mínimo para o qual se registam ganhos mecânicos.

Em amostras retiradas do corpo cimentado da figura 2.7, Van Paassen et al., (2010) registou valores de UCS entre os 0,7 e os 12,4 MPa e módulos de Young para 50% da resistência de pico ( $E_{50}$ ) que variavam entre os 100 e os 8,500 MPa. A mesma imprevisibilidade de valores surge no ensaio da figura 2.9. em que a resistência à compressão simples do solo variou ao longo do comprimento do provete.

Se estes valores demonstram a utilidade da técnica de biocimentação neste campo, da mesma forma revelam como o fenómeno da heterogeneidade é essencial de ser controlado e minimizado evitando assim a imprevisibilidade nos valores resistentes a obter no final do tratamento.

## 2.5.2 Redução da permeabilidade

Depreende-se naturalmente que o efeito de colmatção dos vazios pelo precipitado vai ter como consequência a diminuição da permeabilidade. Esta diminuição vai depender da quantidade de precipitado formado e da geometria dos vazios, pois interessa considerar a relação entre o volume ocupado pelo biocimento no volume de vazios disponível. Esta relação é, logo, aparente, ao ligar-se a redução da permeabilidade dos solos tratados ao teor mássico em  $\text{CaCO}_3$  precipitado, podendo esta redução ser superior a 90% para teores acima dos 6,5% segundo Al Qabany (2013) (figura 2.11).

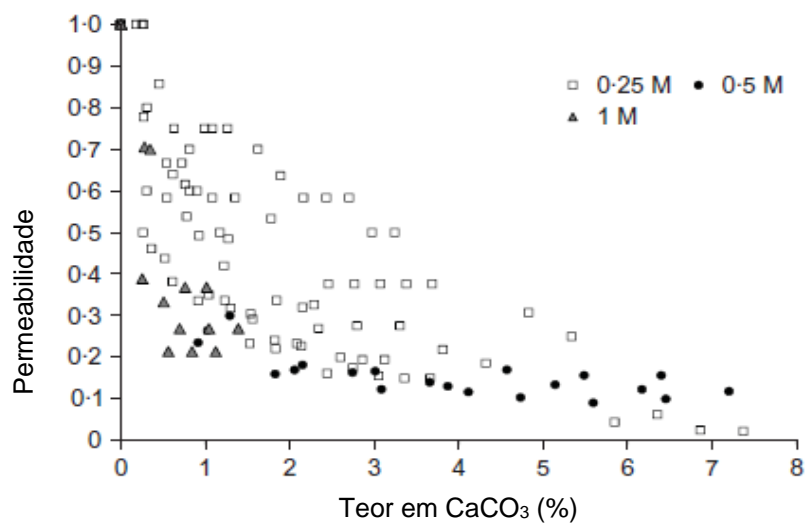


Figura 2.11 – Diminuição da permeabilidade normalizada com conteúdo em  $\text{CaCO}_3$  para três concentrações distintas de alimento (Al Qabany e Soga, 2013)

### **3 Materiais e Métodos**

Neste trabalho, focado no estudo da homogeneidade do tratamento e seus efeitos no comportamento de areias tratadas por biocimentação, desenvolveu-se um equipamento que permitisse aplicar o tratamento em amostras de areia segundo os seguintes métodos: (1) Injeção de bactérias ou enzimas e da solução de alimento, com recurso a um tubo colocado no interior da amostra; (2) Percolação de bactérias ou enzimas e da solução de alimento através da amostra, num ensaio semelhante a uma coluna de infiltração. O método (1) permitiu simular condições de campo, enquanto que o (2) é mais comum nos estudos laboratoriais descritos na bibliografia. Foram também feitas variações, sendo uma delas a mistura prévia do solo com bactérias, na montagem, e então usando os métodos (1) ou (2) para adicionar a solução de alimento. As amostras preparadas e tratadas com os diversos métodos foram depois analisadas com técnicas de monitorização de modo a ver qual seria o método de preparação mais eficiente do ponto de vista de conseguir uma distribuição homogénea de precipitado de carbonato de cálcio no volume de solo tratado.

O presente capítulo encontra-se organizado em cinco secções. As secções 3.1, 3.2 e 3.3 descrevem o material solo, bactérias e enzimas e solução de alimento usado e o modo de preparação das amostras usando as técnicas (1) e (2). Na secção 3.4 apresenta-se as técnicas de monitorização e caracterização usadas nos provetes de solo biocimentados. Na secção 3.5 fornece-se a listagem das técnicas de injeção e preparação dos provetes biocimentados, e os ensaios realizados para análise em tabelas resumo.

#### **3.1 Caracterização e preparação das amostras de solo**

##### **3.1.1 Caracterização do solo**

O solo utilizado neste estudo é uma areia de rio comercial usada para fabrico de argamassa. Do ponto de vista granulométrico (curva na figura 3.1) tem  $D_{10} = 0,25$  mm, com fração muito reduzida de finos (3,8%) e restante fração de material areia (96,2%), de acordo com a Classificação Unificada de Solos. Os coeficientes de uniformidade e curvatura tomam como valor 6,25 e 1,00 respetivamente, caracterizando o solo, segundo a Classificação Unificada de Solos, como uma areia bem graduada (SW). Na figura 3.2 observa-se esta mesma distribuição continua das partículas do solo.

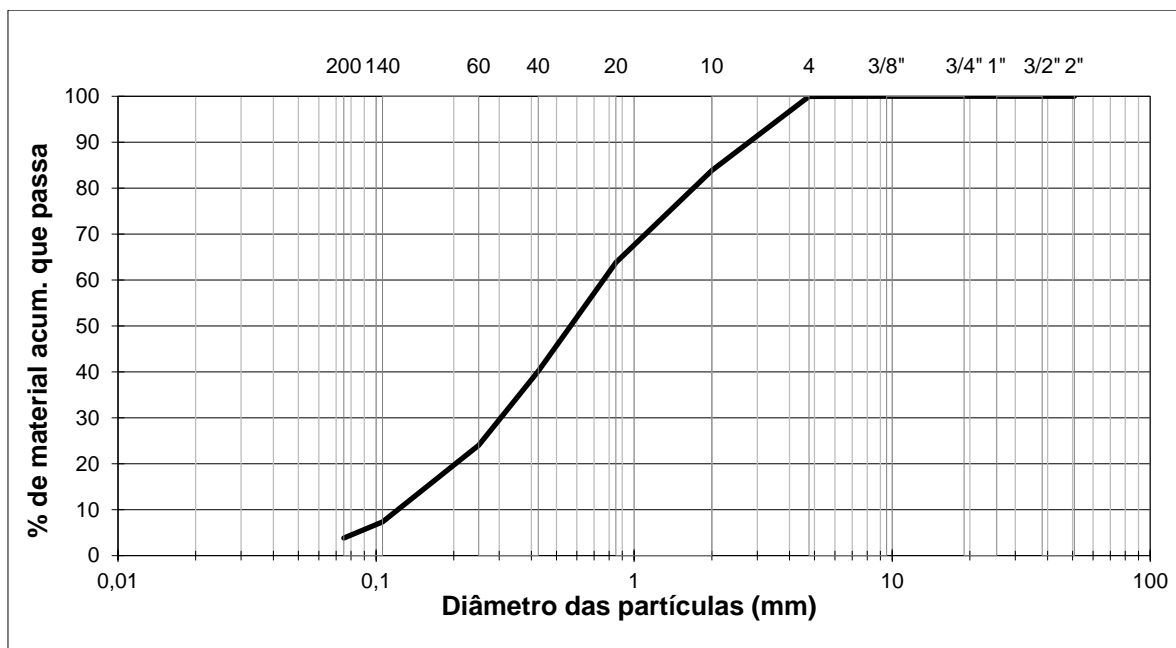


Figura 3.1 - Curva granulométrica da areia tratada

A densidade das partículas foi definida pelo método do picnômetro (medição do volume de água deslocado por uma massa conhecida de partículas de areia), tomando 2,65 como valor (figura 3.3). O ensaio foi repetido três vezes para verificação da reprodutibilidade do resultado.



Figura 3.2 - Amostras após peneiração



Figura 3.3 - Teste do picnômetro

O coeficiente de permeabilidade do solo foi determinado por ensaio de carga constante usando o permeâmetro disponível no laboratório de Geotecnia, sendo o seu valor de  $3,14 \times 10^{-5}$  m/s. Este valor encontra-se dentro dos valores padrões da permeabilidade de uma areia (Maranha das Neves, 2007).

A composição mineralógica do solo foi determinada por ensaios de difração por raios-X (*X-Ray diffraction tests*, XRD), A constituição da areia é predominantemente siliciosa (Quartzo, Microcline e Muscovite) e apresenta alguma argila (Caulinite).

### 3.1.2 Montagem de provetes

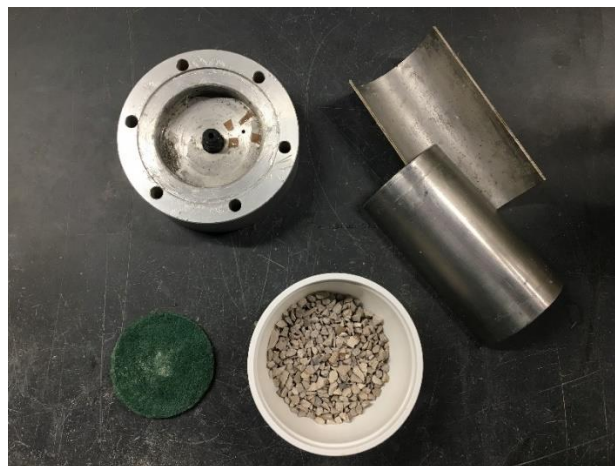
O solo foi colocado no interior de uma câmara de aço de modo a ter um índice de vazios no intervalo entre 0,55 e 0,60 (35 a 37,5% porosidade), semelhante às porosidades obtidas por alguns autores (Yasuhara 2013, Harkes 2008, Al Quabany 2012). O peso volúmico aparente seco para este índice de vazios ronda entre 16,6 e os 17,1 kN/m<sup>3</sup>.

Inicialmente, a altura de 14,0 cm e diâmetro interior de 7,2 cm do dispositivo experimental serviram como referência no cálculo do volume ocupado pela massa de areia e subsequente cálculo do índice de vazios e porosidade, mediante as equações (Eq 4) e (Eq 5):

$$\gamma_d = \frac{G_s}{1+e} \gamma_w \quad (4)$$

$$n = \frac{e}{1+e} \quad (5)$$

Independentemente do método de tratamento (métodos (1) ou (2)), foi necessária a introdução de uma nova solução que incluía um dreno constituído por uma camada de brita fina e filtro de geotêxtil (Scotch Brite) (Figura 3.4), tanto no topo como na base. Neste caso adotou-se uma altura de 12,0 cm no cálculo do volume de vazios. Mais tarde, com a descofragem das amostras tratadas, veio-se a verificar que as alturas dos provetes de solo variavam, na realidade, entre os 11,2 e os 12,0 cm.



*Figura 3.4 - Peça cilíndrica superior horizontal e corpo cilíndrico central da câmara experimental em conjunto com dreno e filtro da nova solução*

No total foram tratados 7 provetes no dispositivo experimental incluindo a solução com dreno e geotêxtil, sendo um deles tratado com enzima e outros dois de controlo. Como dito anteriormente, a forma de injeção do alimento e das bactérias divergiu segundo o quadro seguinte:

Quadro 3.1 - Formas de tratamento dos provetes biocimentados

Nome do provete	Forma de injeção das bactérias/enzimas	Forma de injeção do alimento
<b>E4ct</b>	Tubo	Tubo
<b>B2st</b>	Coluna de infiltração	Coluna de infiltração
<b>B2ct</b>	Tubo	Tubo
<b>B3st</b>	Pré-misturado	Coluna de infiltração
<b>B3ct</b>	Pré-misturado	Tubo
<b>C1 (controle)</b>	Meio de cultura sem bactéria	Coluna de infiltração
<b>C2 (controle)</b>	Meio de cultura sem bactéria	Tubo

Para a montagem dos provetes usou-se areia seca em estufa a 105°C pelo menos 48h para esterilização (figura 3.5 - 1.a), ou com a adição de bactérias de modo a ficar quase saturada. Para este caso procedeu-se à mistura prévia de 200 ml de meio de cultura inoculado com a bactéria *Sporosarcina pasteurii* (figura 3.5 - 1.b e 1.c), com uma massa conhecida de solo seco a tratar. Tanto no caso de montagem a seco como saturada, a areia era colocada por camadas e depois vibrada com a penetração repetida de uma espátula (figura 3.5 - 2.a, 2.b). Uma vez preenchida a câmara, a massa de areia era pesada numa balança e o índice de vazios verificado para estar dentro do intervalo desejado. Caso não se verificasse, parte da areia era retirada e recolocada.

Foram montadas ainda amostras de areia para ensaios de controlo sem bactérias (apenas meio de cultivo) e com injeção do alimento no tubo, pelo topo (C2), e coluna de infiltração (C1).

Conforme se referiu antes, foram testados dois métodos para injetar as bactérias e a solução de alimento. No método (1) procedeu-se à injeção com um tubo perfurado colocado no interior da amostra. A montagem dos provetes foi feita inicialmente com a colocação desse tubo de injeção na rosca interior da câmara (caso o ensaio necessitasse de tubo) seguido do encaixe do corpo central de aço na peça cilíndrica do topo. No caso do método (1) (coluna de infiltração) a preparação da câmara era feita sem tubo.

Para ambos os métodos, parte do provete de areia foi substituído com um dreno composto por partículas com dimensão de seixo (diâmetro médio 5mm) (inertes de calcário usados no fabrico de betão) e uma camada de geotêxtil (Scotch Brite, espessura de 4 mm) para filtração/separação (figura 3.4). Estes elementos foram colocados no topo e base da câmara junto aos pontos de entrada ("inlet"), visível na figura 3.5 – 3.a e 3.b) e saída ("outlet") (figura 3.5 – 4.a e 4.b), tendo o conjunto em média 1,0 cm de altura.

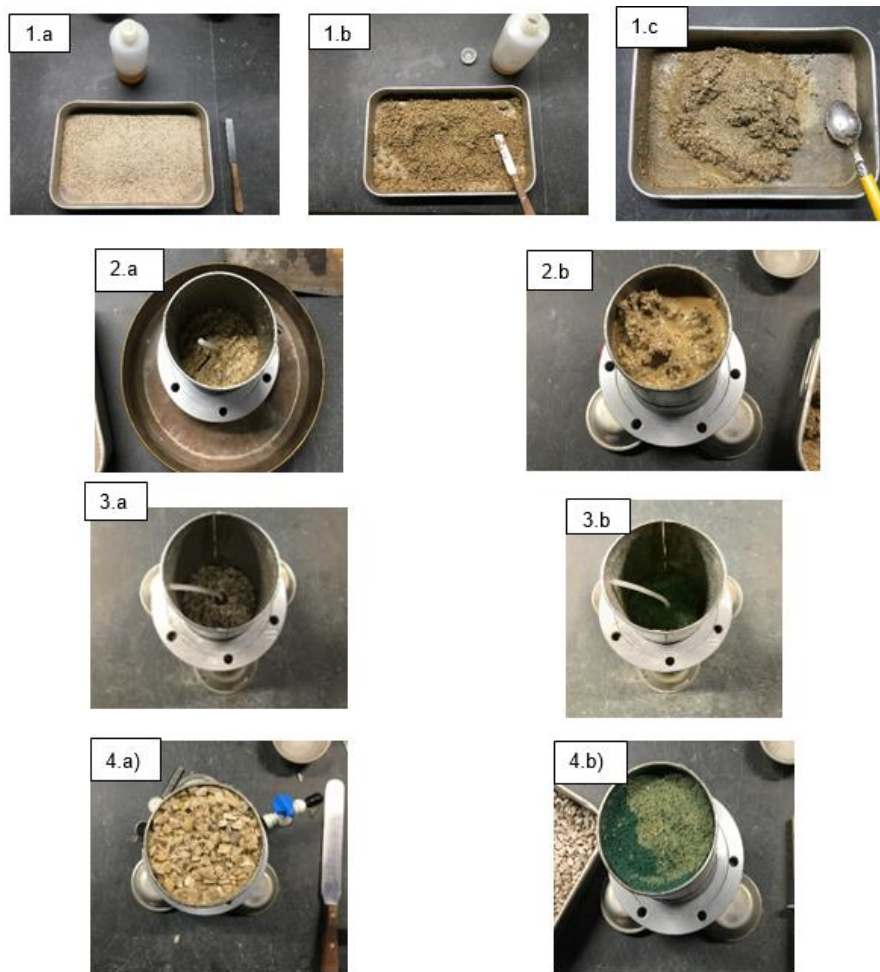


Figura 3.5 - Preparação do provete de areia com mistura prévia de bactérias: 1.a – 1.c) pré-mistura das bactérias com o solo, 2.a e 2.b) Colocação da areia na câmara 3.a e 4.a) Colocação do dreno e 3.b e 4.b) Colocação do geotêxtil

## 3.2 Preparação das bactérias e enzimas em pó

### 3.2.1 Crescimento bactérias e preparação solução com enzimas

As bactérias denominadas de *Sporosarcina Pasteurii*, foram fornecidas pela *American Type Culture Collection* (ATCC) sendo o seu crescimento realizado no Laboratório de Bioengenharia do IST para a sua posterior utilização nos solos. A espécie *Bacillus*, à qual pertence este tipo de bactéria, é conhecida pela sua elevada resistência a agentes químicos e físicos, o que, aliado à sua elevada atividade enzimática, adequa-se às reações de biocimentação (Phadnis e Santamarina, 2011)(Al Qabany *et al.*, 2012).

O processo de crescimento é demorado, sendo controlado através da medição regular da densidade ótica (DO) do meio de cultura inoculado, uma vez que existe uma relação linear entre a absorvância de luz com uma dada frequência e a concentração de células. Para tal, a cada leitura da DO, 100 µl de meio de cultura inoculado eram diluídos em 900 µl de água destilada (figura 3.6) e a densidade lida a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ), com recurso a um espectrofotómetro (figura 3.8)





Figura 3.6 - Diluição do meio de cultura para leitura da densidade ótica

A fase de crescimento da bactéria dava-se por terminada sempre que o meio de cultura atingia uma DO próxima de 1, equivalendo a uma concentração de  $10^8$  células por ml (Cardoso *et al.*, 2018), assegurando-se, para além da quantidade, a elevada atividade da enzima urease (Stocks-Fisher, 1999).

O crescimento das bactérias estendeu-se por três fases sucessivas de inoculações em volumes crescentes de meio. Esta necessidade justificava-se pela facto de a concentração de bactérias nunca poder ser inferior a 0,1 de DO no início da inoculação, arriscando-se, caso contrário, à não proliferação da bactéria no meio de cultura. Assim, a primeira inoculação ocorria num tubo *falcon* com 5 ml de meio, transitando-se mais tarde para 20 e 200 ml. Esta fase de crescimento estende-se usualmente por um período de 3 dias e meio.

Dois meios de cultura de bactérias eram crescidos simultaneamente em recipientes diferentes, para se continuar o processo de crescimento com um mínimo de interrupção caso uma das culturas falhasse. Ao final, cada meio de cultura bacteriana era então correspondida a um provete de areia para tratamento.

Por litro de meio de cultura, foram necessários os seguintes substratos e concentrações (Cardoso *et al.*, 2018):

Quadro 3.2 - Reagentes e quantidades para preparação de 1 L de meio de cultura

Substrato	Concentrações	Observações
<b>Extrato de levedura (Yeast)</b>	20 g/l	Fonte de alimento para bactérias
<b>Sulfato de amónio</b>	10 g/l	Fonte de azoto. Essencial para desenvolvimento da bactéria
<b>Tris (pH ajustado a 9,0)</b>	0,13 M	Estabiliza o pH do meio para valores preferidos pela bactéria

Após inoculação do meio com a bactéria, os *falcon* eram colocados numa incubadora digital (figura 3.7), a 250 rotações por minuto (rpm) e 30 °C, até uma DO de pelo menos 1 ser alcançada.





Figura 3.7 - Incubadora digital



Figura 3.8 - Espectrofotômetro

Observa-se um maior tempo de incubação nos *falcon* com menor volume, uma vez que as bactérias se multiplicam mais rapidamente quanto mais alimento disponível existir no seu meio. Acrescenta-se o facto de estas ainda se encontrarem em estado dormente logo após o descongelamento da arca a  $-80^{\circ}\text{C}$  onde se encontram armazenadas.

Os tempos de incubação para cada cultura e a DO final encontram-se disponíveis no quadro abaixo:

Quadro 3.3 - Períodos de incubação e densidades óticas finais de cada fase de crescimento das culturas bacterianas aplicadas (X – crescimento falhado)

Série	Nome do ensaio	Fase (ml)	Período de incubação	Tempo de incubação	DO final
1)*	B1t	5	12h00 – 10h00	22h00	1,13
		20	11h00 – 17h 30	6h30	1,27
		100	14h15 – 18h00	3h45	1,15
2)	B2.1	5	13h30 - 10h00	20h30	X
		20	10h30 - 16h40	6h10	1,48
		200	10h00 - 13h30	3h30	1,16
	B2.2	5	13h30 - 10h00	20h30	1,26
		20	10h30 - 16h20	5h50	1,44
		200	10h00 - 13h30	3h30	1,04
3)	B3.1	5	15h00 - 10h00	19h00	1,45
		20	10h30 - 16h30	6h00	1,22
		200	13h00 - 17h40	4h40	1,05
	B3.2	5	15h00 - 10h00	19h00	1,42
		20	10h30 - 16h30	6h00	1,33
		200	13h00 - 17h40	4h40	1,14

\*Visualizam-se os períodos de incubação e DO finais somente do meio de cultura que se utilizou no tratamento

Para se evitar a contaminação dos meios de cultura por demais organismos, todos os recipientes de armazenamento (*falcon* e balões), assim como reagentes para preparação do meio de cultura eram previamente selados e esterilizados separadamente. Esta esterilização era realizada numa autoclave (figura 3.9 – a) sob pressão, a 121°C, ao longo de 25 minutos.

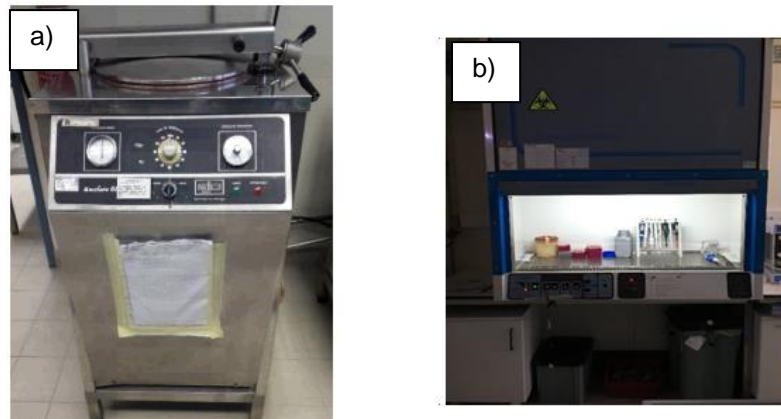


Figura 3.9 - Equipamentos usados para crescimento das bactérias: a) Autoclave para esterilização do meio e utensílios; b) Câmara de fluxo laminar para ambiente estéril de trabalho

Do mesmo modo, após a fase de autoclave, qualquer abertura de *falcon* e manuseio de utensílios era realizada em ambiente estéril, no interior de uma câmara de fluxo laminar (figura 3.9 – b))

### 3.2.2 Procedimento experimental

- **Primeiro dia de crescimento:**

No primeiro dia de crescimento, todos os meios de cultura eram preparados nos tubos *falcon* de 15 ml com 5 ml de meio e nos balões de 100 e 500 ml com 20 e 200 ml de meio respectivamente (Figura 3.10), sendo estes dois últimos volumes conservados a -18°C para posterior inoculação. Os dois *falcon* eram mais tarde inoculados cada um com 50 µl de bactérias recentemente retiradas da arca a -80°C, com recurso a uma pipeta de 100 µl de capacidade.



Figura 3.10 - Falcon contendo 5 ml de meio de cultura (esquerda) e Balões contendo 20 e 200 ml de meio de cultura por inocular (direita)

De seguida, os *falcon* eram colocados na incubadora digital até deterem uma densidade ótica de pelo menos 1, ocorrendo normalmente após 20 horas.

- **Segundo dia:**

Após verificação da DO dos *falcon* de 15 ml, cada balão de 100 ml era inoculado com o correspondente volume do meio de 5 ml segundo a Equação 6 por forma a obter uma DO final de 0,1:

$$DO_i \times V_i = DO_j \times V_j \quad (6)$$

Seguia-se então a incubação dos dois balões, selados com uma tampa de tecidos, permitindo a troca de gases com o exterior e ao mesmo tempo dificultando a passagem de micro-organismos para o interior.

Visto que o crescimento das bactérias se efetuava com maior rapidez nesta fase, a DO era revista a cada hora. Uma vez atingida a concentração de células desejada, os balões eram armazenados no frigorífico a -18°C até ao dia seguinte, conservando-se a concentração de células bacterianas.

- **Terceiro dia:**

Ao terceiro dia, o procedimento experimental mantinha-se inalterado, sendo necessário inocular os novos volumes de 200 ml segundo a Equação 6 e verificar a DO a cada hora.

### **3.2.3 Preparação solução de enzimas em pó**

A enzima urease empregue no estudo designa-se por *Canavalia ensiformis* (Jack Bean), detendo uma atividade enzimática de 1 kU/g (1U = 1,0 µmol/min).

Para cada provete de solo foram preparados 200 ml de água destilada com 1 g de enzima em pó para uma concentração final na solução de 5,0 g/l. Esta solução com enzimas seria injetado por volumes de 50 ml em cada dia de injeção. Estimou-se que com a injeção de 50 ml desta solução em conjunto com a mistura de 1 volume de vazios (200 ml) de solução de alimento, a concentração final de enzimas em todo o solo se registasse nos 1,0 g/l, assumindo que a enzima não reagisse imediatamente e que a sua distribuição pelo solo fosse homogénea.

### **3.2.4 Injeção enzimas e bactérias**

Como referido antes, testaram-se três métodos de injeção dos agentes catalisadores: i) pelo tubo central para uma melhor distribuição ao longo do corpo de areia, ii) pelo topo, como numa coluna de infiltração, possível graças à introdução do dreno de brita fina e iii) bactéria pré-misturada com o solo para uma distribuição realisticamente homogénea.

Nos testes realizados com bactérias (B2st e B2ct), em cada provete foi inserido o volume de bactérias (200 ml) igual ao seu volume de vazios, tendo-se deixado 2 horas de tempo antes da fase de injeção de alimento, para adsorção destas às partículas de areia. No caso dos ensaios pré-misturados, devido à necessidade de selagem da câmara com silicone e o seu endurecimento, a fase de injeção de alimento ocorreu somente no dia seguinte ao da montagem.

A inserção destes agentes no interior do solo realizou-se manualmente com recurso a uma seringa de 20 ml.

### 3.3 Preparação e injeção da solução de alimento

#### 3.3.1 Solução de alimento

A solução de alimento, de nutrientes ou de cimentação é composta essencialmente por ureia e cloreto de cálcio com concentração equimolar de 0,5 M e por meio de cultura diluído no rácio 1:10 como fonte adicional de alimento. A esta solução foram adicionadas outras substâncias, como o cloreto de amónio e bicarbonato de sódio, com o intuito de limitar a alcalinidade do meio para um pH inferior 10,0 devido à produção contínua de iões amónio ( $NH_4^+$ ) da reação de hidrólise da ureia.

As substâncias que compõem a solução de alimento foram aproveitadas de estudos anteriores (Cardoso et al., 2018) para replicação e comparação de resultados. A concentração de 0,5 M utilizada é de modo igual justificada pela alta atividade enzimática citada por autores (Whiffin, 2004; Al Qabany et al., 2012).

Apresentam-se no Quadro 3.4 as substâncias manuseadas neste trabalho e respetivas quantidades, na produção de 1 L de alimento (Cardoso et al., 2018):

Quadro 3.4 - Substâncias e quantidades para produção de 1 L de solução de alimento

Reagente	Fórmula química	Quantidade	Observações
Ureia	$CO(NH_2)_2$	30,03 g	Concentração 0,5 M. Fonte de carbonato para a precipitação de $CaCO_3$
Cloreto de cálcio dihidratado	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	73,51 g	Concentração 0,5 M. Fonte de cálcio para a precipitação de $CaCO_3$
Extrato de levedura (Yeast)	-	2,00 g	Alimento para bactéria
Sulfato de amónio	$(NH_4)_2SO_4$	1,00 g	Fonte de azoto altamente solúvel. Reduz o pH da solução
Bicarbonato de sódio	$NaHCO_3$	2,12 g	Impedir que o meio se torne demasiado alcalino
Cloreto de amónio	$NH_4Cl$	10,00 g	Impedir que o meio se torne demasiado alcalino

#### 3.3.2 Injeção de alimento

A injeção da solução de alimento foi executada sob pressão (até 60 kPa), com recurso a um controlador GDS de pressão. A este controlador ligava-se uma interface formada por uma câmara, onde era colocada a solução de alimento, e no seu interior um balão para onde era bombeada água pelo controlador. Assim, o volume que era injetado pelo controlador transformava-se em volume ganho pelo balão e conseqüentemente em solução de alimento deslocado para a câmara experimental. Na figura 3.11 é possível ver o dispositivo experimental utilizado:

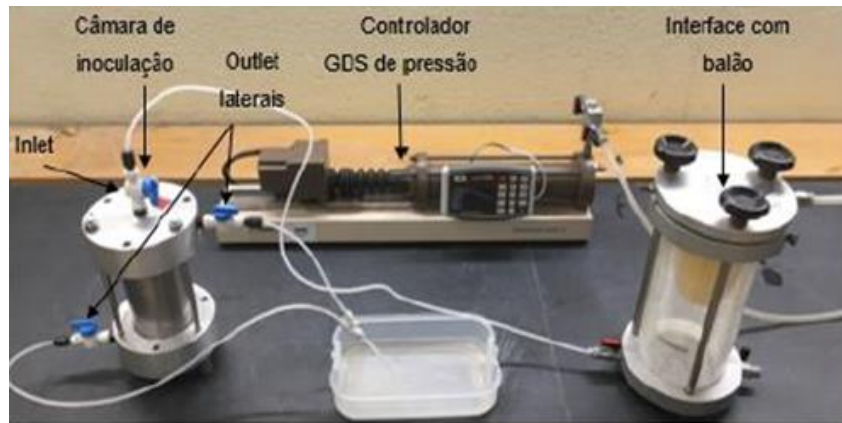


Figura 3.11 - Dispositivo experimental para tratamento dos provetes com biocimentação

Fixou-se um caudal de  $100 \text{ mm}^3/\text{s}$  ou  $360 \text{ ml/h}$ , semelhante ao utilizado por Yasuhara (2012) relativo ao volume em ml, como ao volume em vazios ( $1,7 \text{ Vv/h}$ ). Esperava-se com este caudal evitar, por um lado, a precipitação e sucessiva obstrução dos pontos de entrada, e por outro lado, o início das reações de biocimentação antes que a fase de injeção de solução de alimento terminasse, como em Whiffin (2007).

As injeções de alimento foram realizadas com 24 horas de intervalo ao longo de quatro dias, sendo injetados  $200 \text{ cm}^3$  ou 1 volume de vazios a cada dia. Esperava-se a renovação total do fluido de alimento no interior da câmara, injetado no dia anterior e já reagido. No final de cada dia, a câmara de inoculação repousava a  $35 \pm 3^\circ\text{C}$  numa estufa artificial para melhor atividade enzimática (Sahrawat e Patancheru, 1984; Nemati *et al.*, 2005).

A fiabilidade dos volumes apresentados pelo GDS foi verificada durante os ensaios de controlo, com a medição dos volumes saídos mantendo a pressão adotada. Esses volumes foram medidos com uma proveta graduada de 25 ml.

Além da forma de injeção das enzimas e bactérias para o interior do solo, testaram-se igualmente dois métodos distintos de alimentação dos provetes de solo que tinham sido referidos anteriormente:

- 1) Injeção através de um tubo colocado no interior da amostra, central (diâmetro interior 1,5 mm), perfurado ao longo do seu comprimento (furos com espaçamento de 2,0 cm), para uma alimentação mais local e repartida (Figura 3.12 - 1).
- 2) Injeção pelo topo da câmara, tipo chuveiro, como numa coluna de infiltração devido à presença do dreno nas faces superiores e inferiores (figura 3.12 - 2).

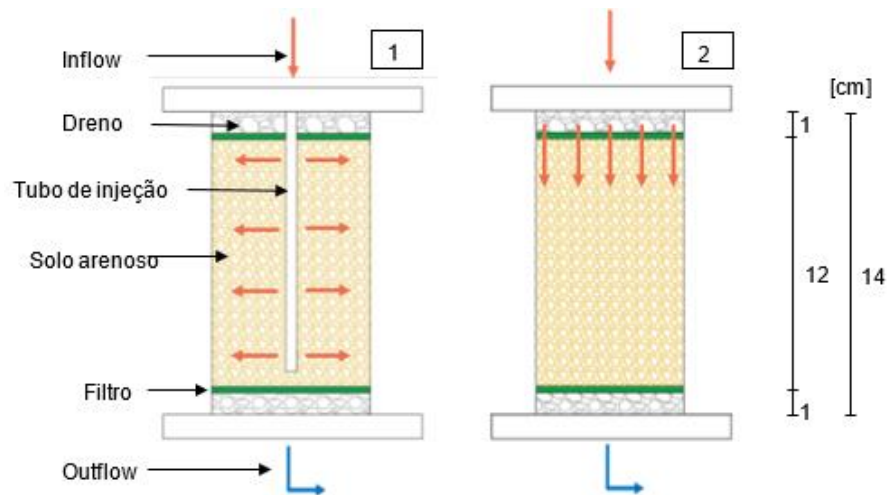


Figura 3.12 - Esquema do interior do dispositivo experimental e das técnicas de injeção da solução de alimento testadas

### 3.4 Monitorização imediata do tratamento e sua homogeneidade

#### 3.4.1 Monitorização imediata

No decorrer dos ensaios, e tal como em situação de obra, a falta de visibilidade e acesso ao solo no interior da câmara de inoculação, obrigou a que o controlo e verificação do bom desenrolar do tratamento tivesse que ser realizado mediante medições no fluido efluente. Este fluido é o existente no interior da câmara, proveniente do alimento ou meio de cultura injetado no dia anterior, expelido durante a injeção do dia seguinte.

A presença dos produtos da reação de biocimentação no efluente, nomeadamente iões  $NH_4^+$  e  $Cl^-$  dão informações importantes sobre o estado dos processos de hidrólise da ureia e dissolução do sal cloreto de cálcio. Da mesma forma, o aumento do pH com a formação de amónio é expectável e desejado.

Assim, a monitorização da variação das substâncias químicas foi efetuada através de fitas colorimétricas de reconhecimento de concentrações mássicas (Figura 3.13). Para tal, o efluente era diluído, tendo em conta as concentrações mássicas máximas teóricas dos reagentes injetados e o intervalo para o qual as fitas eram sensíveis.

Das substâncias monitorizadas encontram-se o dicloro ( $Cl_2$ ) e iões cloreto ( $Cl^-$ ) (figuras 3.13 – b) e c)) provenientes da dissolução da fonte cálcica do alimento ( $CaCl_2$ ) cujas leituras se efetuaram a meio do efluente saído (100 ml) do segundo dia de injeção (correspondendo ao alimento injetado no primeiro dia). Esta única leitura deveu-se à boa capacidade de dissolução dos sais cálcio, que mais tarde veio-se a verificar ocorria ainda na solução de alimento. As leituras destas substâncias foi efetuada somente nos últimos provetes tratados (pré-misturados e de controlo) já que a sua utilização só foi possível numa fase tardia das experiências.

A monitorização da hidrólise da ureia através de fitas de amónio (figura 3.13 – a)) foi efetuada de forma a se discretizar as suas concentrações, e, por conseguinte, a atividade enzimática ao longo do comprimento dos provetes tratados. As leituras ocorreram 5 vezes a cada dia de injeção, iniciando aos 20 ml de efluente saído e terminando nos 180 ml, evitando-se assim a leitura do alimento no dreno superior e inferior. Esta monitorização foi elaborada mais tarde com recurso ao reagente de Nessler e à determinação das concentrações molares com recurso a espectrofotómetro que se aborda no capítulo 3.4.2.

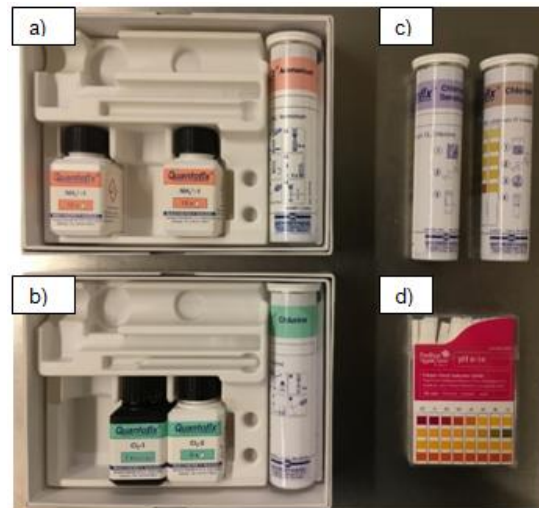


Figura 3.13 - Fitas colorimétricas de monitorização imediata de: a) iões amónio ( $\text{NH}_4^+$ ), b) iões cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), c) dicloro ( $\text{Cl}_2$ ) e d) pH

Quanto à mudança da alcalinidade do meio, recorreu-se a fitas colorimétricas (papel de pH, figura 3.13 – d)) em todos os provetes tratados (enzimas e bactérias) a meio de cada injeção (100 ml de alimento injetado ou efluente saído), Recorreu-se igualmente a um aparelho medidor de pH com maior precisão ( $\pm 0,01$  unidades), disponibilizado no laboratório de Bioengenharia para leitura da alcalinidade da solução de alimento (por conveniência uma vez que a solução era preparada em Bioengenharia).

A pressão de injeção foi outro parâmetro monitorizado através da sua visualização, em tempo real, no controlador de volume/pressão GDS. Esta pressão variava consoante a necessidade do controlador em manter o caudal no valor requisitado ao início da injeção ( $100 \text{ mm}^3/\text{s}$ ). À medida que as injeções se efetuavam, a colmatção dos vazios, devido à precipitação e obstrução do tubo injetor e das saídas, levaram a que a pressão de injeção aumentasse.

As pressões aplicadas automaticamente pelo controlador variaram ao longo das experiências, tendo-se permitido aos testes iniciais o alcance de pressões mais altas (200 a 300 kPa). Contrariamente, para os tratamentos finais (após introdução do dreno), um maior cuidado com o controlo das fugas de alimento pelas ranhuras da câmara e da interface, obrigaram a uma fixação das pressões (60 kPa). Esta limitação da pressão de injeção levou a que alguns dos ensaios, nomeadamente B2ct e B3ct, terminassem mais cedo pois constatou-se um caudal demasiado baixo para haver circulação real de alimento.



### 3.4.2 Determinação das concentração em iões $\text{NH}_4^+$ pelo método do reagente de Nessler

A presença de iões amónio no efluente indica que está a ocorrer hidrólise da ureia e, por conseguinte, se há formação de biocimento. Assim, a distribuição da atividade enzimática durante o tratamento ao longo do provete pode ser estimada indiretamente através da medição periódica das concentrações de amónio do efluente.

Para tal tem que se admitir um regime de escoamento laminar no interior do provete, com pequenas dispersões, em que o primeiro volume do fluido saído sai da base do provete (*outlet*), sendo o fluido de alimento injetado no dia anterior contendo os produtos da reação. Porque o volume injetado é igual ao volume de vazios antes do tratamento, e, portanto, igual ao fluido que está no interior do provete, ao fracionar esse volume é possível referenciar a parte do provete onde ocorreram as reações de precipitação.

O perfil de amónio foi obtido com recurso ao reagente de Nessler que, após contacto com iões amónio, forma um precipitado amarelo-acastanhado (figura 3.14 – 3.b). A intensidade deste precipitado é então examinado no espectrofotómetro a 425 nm, e a densidade ótica relacionada com as concentrações de amónio.

Estas leituras foram realizadas nos provetes pré-misturados e injetados com bactérias somente no efluente saído no segundo dia de injeção (correspondente ao alimento injetado no primeiro dia), uma vez que não se esperava uma variação das concentrações entre cada dia de injeção dado a manutenção das condições de injeção e assumindo a renovação do alimento no interior da câmara.

Para a medição do amónio, foram retiradas amostras do efluente a cada 25 ml de volume injetado, sendo prontamente congeladas a  $-18^\circ\text{C}$  para análise posterior. As amostras foram então centrifugadas numa centrifugadora (figura 3.14 – 1.a) no laboratório de Biologia a 6000g, a  $20^\circ\text{C}$  durante 3 min para separação das fases líquidas e sólidas (figura 3.14 – 1.b).

Transferiu-se então 25  $\mu\text{l}$  do sobrenadante para 50 ml de água destilada em *falcon* (figura 3.15 - 2)), diluindo-se para o intervalo de 0-0.5 mM  $\text{NH}_4^+$  onde o método de Nessler é considerado mais eficaz, segundo o fabricante.

Por último, a 2 ml da amostra diluída foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  do reagente de Nessler, numa câmara de fluxo devido aos vapores tóxicos (figura 3.14 – 3.a), deixando-se reagir por 1 min antes da leitura da absorbância no espectrofotómetro a 425nm (figura 3.14 - 4). Este procedimento foi repetido 3 vezes para cada amostra de efluente, tendo-se depois obtido a concentração de amónio através da curva standard da figura 3.15.



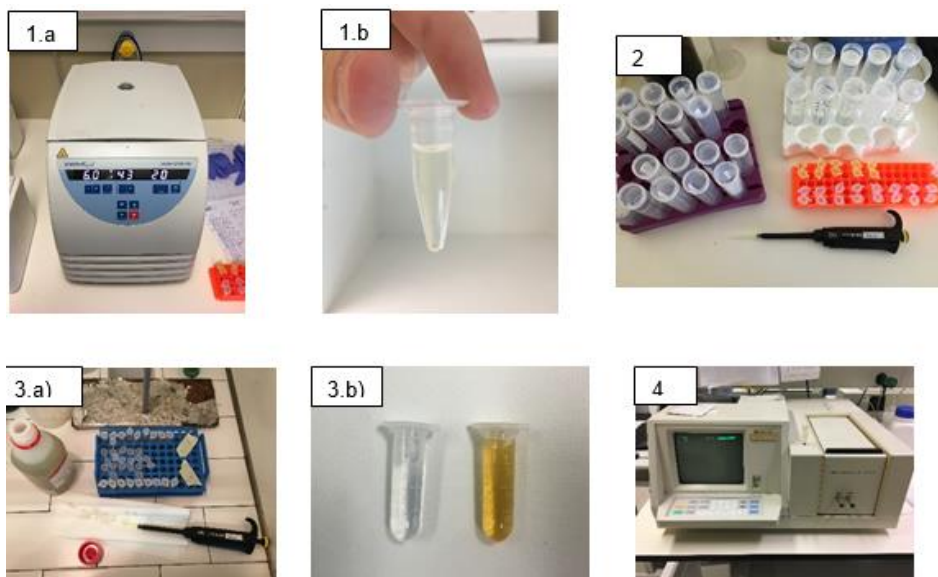


Figura 3.14 - Procedimento experimental para teste do Reagente de Nessler

A curva standard, ou curva de calibração, foi obtida relacionando a leitura das absorvâncias no espectrofotômetro obtida para amostras do efluente dos provetes de controlo, contendo cloreto de amónio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), que facilmente se desassocia em iões amónio, em concentrações conhecidas e variando no intervalo 0-0.5 mM (ver figura 3.15). O propósito da utilização do efluente de um dos provetes de controlo enquanto branco passou pela correspondência das interferências dos compostos químicos coloridos presentes nas amostras estudadas (como a levedura), durante o uso do espectrofotômetro, às leituras nas amostras da curva de calibração.

Deste modo, a concentração 0 mM observada na curva de calibração não corresponde, na realidade, à ausência total de iões amónio, mas é relativo à concentração já presente no efluente dos provetes de controlo devido às reações químicas naturais de formação de iões amónio, ocorridas aquando da preparação da solução de alimento. Não obstante o desconhecimento destas concentrações absolutas, a análise relativa entre provetes continua sendo válida.

Estas amostras foram preparadas e medidas nas mesmas condições que as amostras de efluente estudadas. O gradiente da cor do precipitado, devido à reação do reagente de Nessler com as crescentes concentrações em iões amónio das amostras padrão  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , é visível na figura 3.16.

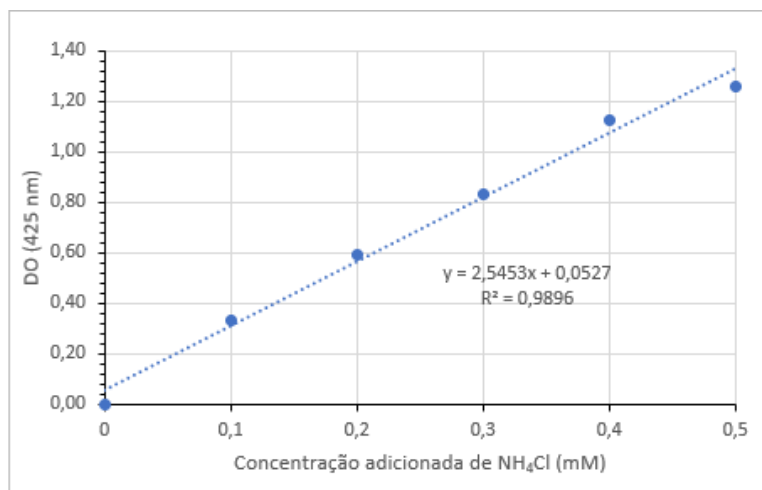


Figura 3.15 - Curva standard relacionando densidade ótica e concentração em iões NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mM)

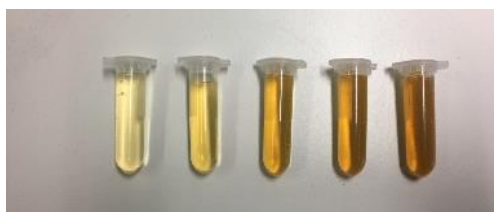


Figura 3.16 - Gradiente colométrico devido ao acréscimo em concentração iões NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (0 a 0,5 mM)

### 3.5 Avaliação da capacidade resistente e da rigidez

Os provetes foram envolvidos por uma membrana de latex após sua extração do equipamento para facilitar o seu manuseamento e recolher os troços do provete após rotura para análise posterior. O efeito de confinamento introduzido pela membrana foi considerado desprezável.

Realizaram-se ensaios de compressão simples não confinada (UCS) nas amostras de controlo e tratadas com bactérias. Utilizou-se uma câmara triaxial e a prensa do laboratório de Geotecnia cuja fotografia se apresenta na figura 3.17. A câmara continha apenas ar e as torneiras estavam abertas para haver ventilação, e assim manter ausência de confinamento lateral quanto possível. O carregamento axial foi aplicado à velocidade de 0,5 mm/min e adotou-se como o critério de rotura quando se atingisse um pico.

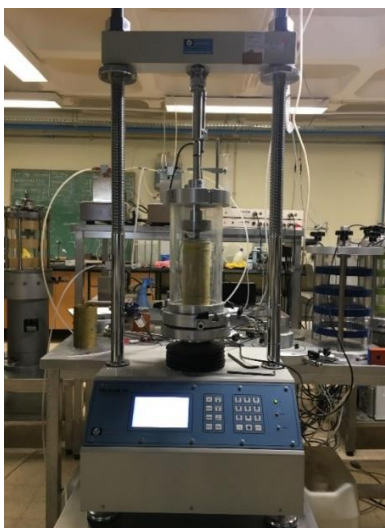


Figura 3.17 - Câmara triaxial e prensa utilizada nos ensaios UCS

Aplicou-se como critério de paragem quando se atingisse o valor de pico ou uma dada extensão axial. Procurou-se, assim, manter a integridade do corpo de areia para mais tarde facilitar a localização radial e longitudinal das amostras para análises posteriores.

A relação entre a extensão axial e a tensão aplicada foi estabelecida, tendo sido registados as resistências de pico ( $q_u$ ) a extensão axial correspondente e o módulo de Elasticidade tangente para 50% do valor de pico da resistência ( $E_{50}$ ) pois esta foi também a metodologia proposta por outros autores como Van Paassen et al., (2010), e Oliveira et al., (2013) (figura 3.18). Os valores obtidos possibilitaram a comparação com os existentes na literatura.

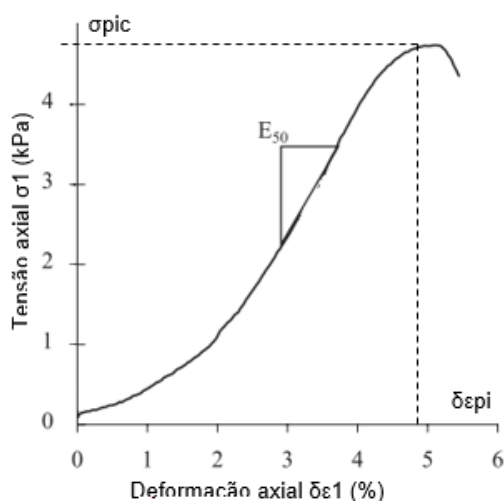


Figura 3.18 - Relação tensão-deformação típica de solos arenosos e ilustração dos parâmetros avaliados durante os ensaios UCS (adaptado de Van Paassen et al., (2010))

Esperou-se que devido à formação de ligações ativas entre as partículas de solo que conferem coesão, os diferentes resultados entre provetes pudessem demonstrar os efeitos das formas de tratamento aplicadas no trabalho na formação de diferentes padrões de biocimento e assim de comportamento mecânico.

### 3.6 Avaliação da presença de $\text{CaCO}_3$ e da homogeneidade do tratamento

A presença de  $\text{CaCO}_3$  dos provetes tratados foi confirmado com recurso a técnicas de análise por raios X e visualização microscópica (SEM), tendo-se igualmente procurado aferir o estado de cimentação entre amostras.

A homogeneidade de distribuição do precipitado foi estudado segundo os seguintes métodos: 1) Análise dos conteúdos de  $\text{CaCO}_3$  e colmatações segundo os eixos longitudinais dos provetes (base, meio e topo), dita análise vertical e 2) Análise segundo cada posição radial de cada secção dos provetes (central e lateral) dita análise horizontal (ver figura 3.19). A revelação destes parâmetros permitiu então a comparação direta entre os provetes biocimentados e os diferentes efeitos que cada forma de tratamento impactou na distribuição de  $\text{CaCO}_3$  pelo solo.

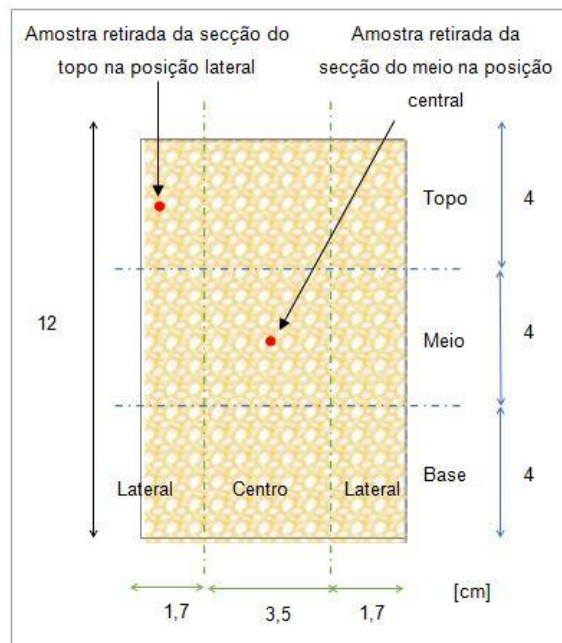


Figura 3.19 - Ilustração do sectionamento dos provetes para a extração de amostras para ensaios de caracterização da homogeneidade com exemplos das posições de onde se retiraram amostras

Para este efeito, a avaliação foi realizada de três formas: i) variação das dimensões de vazios através de testes de porosimetria por intrusão de mercúrio (MIP), ii) determinação indireta, mediante variação das concentrações de iões  $\text{NH}_4^+$ , pelo método do reagente de Nessler e iii) variação do teor em  $\text{CaCO}_3$  por dissolução com ácido clorídrico (HCl).

As duas primeiras técnicas constituíram formas tanto qualitativas como semi-quantitativas (dado a incerteza ao associar uma secção longitudinal a um volume do efluente saído no método de Nessler) de avaliação da distribuição de precipitado. Já os ensaios de lixiviação permitiram determinações precisas do teor de  $\text{CaCO}_3$  nos métodos 1) e 2).

### 3.6.1 Mineralogia e microscopia

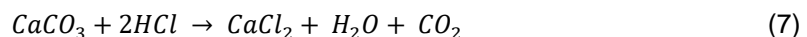
A presença e identificação dos diferentes minerais de carbonato de cálcio foi realizada por testes de difração de raios X no Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT). Testaram-se amostras de areia não tratada (controlo), tratadas com enzimas e bactérias.

A visualização dos cristais de  $\text{CaCO}_3$  e as suas formas foi efetuada por imagens recolhidas pelo microscópio eletrónico de varrimento (SEM). Das formas possíveis de se encontrar distinguem-se os minerais aragonite, vaterite e calcite, sendo este último mineral o mais desejado devido à sua alta durabilidade a agentes químicos e baixa dissolução em água (Wei *et al.*, 2015). Procurou-se observar os arranjos dos cristais de carbonato de cálcio, comparando-se a suas formas e tamanhos entre diferentes posições radiais e longitudinais dos provetes de areia tratada. Procurou-se igualmente a existência de ligações entre partículas de solo (ligações ativas) que conferem coesão ao solo, e comparar as formas dos cristais entre as amostras tratadas com enzimas e bactérias.

A composição química das partículas e arranjos de cristais visualizados no decorrer das sessões de SEM eram confirmados a partir da Espectroscopia de raios X por dispersão (EDS), permitindo distinguir as partículas de carbonato de cálcio das partículas do solo.

### 3.6.2 Teor em carbonato de cálcio

A determinação do teor em  $\text{CaCO}_3$  foi realizada em ensaios de lixiviação no laboratório de Geotecnia do IST com recurso a ácido clorídrico (HCl). A decomposição do carbonato produz então moléculas de água, dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) sob a forma de gás, e sais de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), facilmente dissolvidos em água (Eq 7). É alias através da libertação de gás, ou a sua falta, que se depreende da existência ou não de precipitado nas amostras de solo tratado.



Os ensaios de lixiviação podem servir para diferenciar, em peso seco, o conteúdo pontual de carbonato de cálcio em diferentes posições nos provetes tratados, longitudinal e radialmente. De facto, possibilitam detetar eventuais padrões de distribuição de  $\text{CaCO}_3$  induzidos pelos diferentes métodos de tratamento, tanto nos provetes tratados com bactérias como nos tratados com enzima.

Para tal, iniciou-se pela medição do peso seco de cada amostra, após secagem em estufa para remoção de vestígios de água (figura 3.20 - a)). Procedeu-se então à dissolução de precipitado com quantidade suficiente de ácido, concentração 0,5 M (figura 3.20 - c)), até que as amostras não demonstrassem mais libertação de gás. Na figura 3.20 -b) pode ser observada a libertação de gás sob a forma de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) da reação de dissolução numa das amostras e a pipeta 10 ml de capacidade usada.

De seguida, com o solo depositado em papel filtro, procedeu-se à sua lavagem com água destilada, para remoção dos sais cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (figura 3.20 – d)). Finalmente, o conjunto foi seco em estufa a uma temperatura de  $100^\circ\text{C}$  durante 24 horas, para a pesagem pós-tratamento (Figuras 3.20 e) e f)).

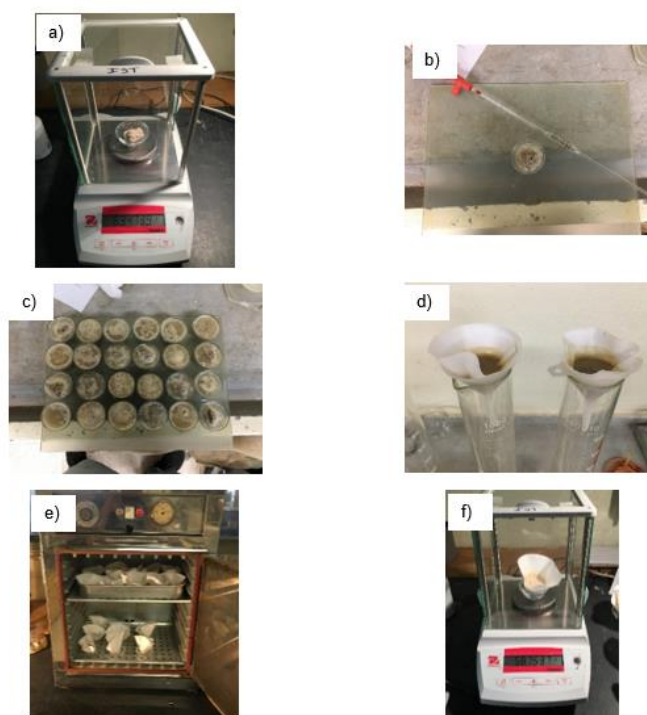


Figura 3.20 - Procedimento experimental para o ensaio de lixiviação com a) pesagem seca das amostras e papel filtro, b) e c) dissolução do  $\text{CaCO}_3$  com ácido  $\text{HCl}$ , d) lavagem das amostras com água destilada, e) secagem a  $100^\circ\text{C}$  e f) pesagem final do conjunto filtro mais solo

As massas dos papéis filtro, utilizados durante a fase de lavagem do solo, foram estabelecidas tendo em conta a média de massas de três papéis controlo distintos, após a fase de secagem na estufa. Assim, a massa correspondente ao conjunto amostra de solo e papel filtro ( $m_{\text{antes}}$ ) foi determinada antes da dissolução.

Verificou-se a conclusão das reações de dissolução através da cessação da observação de libertação de gás. Desta maneira, o ácido utilizado a cada dissolução era renovado até ao momento em que a libertação de gás cessava. Para amostras mais cimentadas, como as de enzimas, recorreu-se maiores quantidades de ácido (70 ml para a dissolução de 1,5g de  $\text{CaCO}_3$ ).

Mais tarde veio-se a verificar que as variações de massas observadas, correspondendo às massas de precipitado dissolvidas, coincidiram com os volumes de ácido empregues. Esta correspondência foi estabelecida sabendo que a cada 20 ml de 0,5 M de ácido (0,01 mol de  $\text{HCl}$ ), a máxima dissolução possível de  $\text{CaCO}_3$  é de 0,5 g ou 0,005 mol justificado pela estequiometria da reação (Eq 7) e a massa molar do carbonato de cálcio (100 g/mol).

Mais, em amostras de areia não tratadas testadas, constatou-se que as taxas de variação em massa registaram-se abaixo dos 0,15%, podendo-se dever à diferença entre a massa média utilizada para o papel filtro e a sua massa real, confirmando a aparente viabilidade do método utilizado.

O teor em carbonato de cálcio foi definido como sendo:

$$\%CaCO_3 = \frac{m_{antes} - m_{após}}{m_{areia}} \quad (8)$$

Sendo i)  $m_{antes}$ , a massa anterior ao tratamento, ii)  $m_{após}$ , a massa ao final do tratamento e iii)  $m_{areia}$ , a massa da amostra contendo somente partículas de areia, sendo igual à massa ao final do tratamento ao qual se retirou a massa média do papel filtro.

### 3.6.3 Porosimetria por intrusão de mercúrio (MIP)

Os testes MIP, realizados no laboratório de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia, permitiram a estimativa das curvas de distribuição das dimensões dos vazios, de amostras cúbicas (1x1x1 cm<sup>3</sup>) retiradas dos provetes junto ao eixo axial e lateral, no topo, meio e base do provete. O objetivo passava por distinguir o preenchimento dos vazios pelo precipitado segundo a secção do provete de onde foi retirada a amostra cúbica. Estes testes foram realizados somente nos provetes B2ct e B2st pois à data estes constituíam os únicos provetes tratados com bactéria.

## 3.7 Quadros-resumo

Apresenta-se de seguida Quadros-resumo que sintetizam: i) as condições em que cada provete biocimentado foi realizado (Quadro 3.5) e ii) a correspondência das análises efetuadas a cada provete biocimentado (Quadro 3.6).

Como se pode ver no Quadro 3.5, após uma ronda de ensaios de teste para afinação do método de montagem das amostras e dos métodos de injeção, foi possível obter amostras de enzima, de bactéria e de controlo adotando condições semelhantes de montagem e injeção. Estas amostras permitiram assim obter dados para comparação, e concluir assim sobre a melhor forma, ou pelo menos a forma mais eficiente, de conseguir amostras homogéneas deste solo tratado por biocimentação.

A escolha dos provetes listados no Quadro 3.5 para a realização dos ensaios de caracterização foi condicionada pelo estado destes na desmontagem, nomeadamente na sua integridade física. Infelizmente, parte dos primeiros provetes criados com enzimas e bactérias (E1t, E2t, E4ct, B1t) foram destruídos durante ou após tratamento, daí não terem sido analisados. Em relação às amostras não destruídas, as técnicas usadas para a sua caracterização foram definidas tentando obter comparações entre métodos e minimizando custos.

Quadro 3.5 - Formas de injeção do alimento e agentes catalisadores testadas em cada ensaio

	Nome do ensaio	Enzima/bactéria	Injeção enz/bact	Injeção do alimento	Nº de injeções alimento
Montagem <u>sem</u> dreno*	Teste (t)	-	Tubo perfurado - água		1,0
	E1t	Enzima	Tubo perfurado		1,0
	E2t	Enzima	Coluna de infiltração		1,0
	E3t	Enzima	Tubo perfurado		1,5
Montagem <u>com</u> dreno	B1t	Bactéria	Tubo perfurado		3,0
	E4ct	Enzima	Tubo perfurado		4,0
	E4st	Enzima	Coluna de infiltração		4,0
	B2ct	Bactéria	Tubo perfurado		3,5 (pressão excessiva)
	B2st	Bactéria	Coluna de infiltração		4,0
	B3ct	Bactéria	Misturado	Tubo perfurado	3,5 (pressão excessiva)
	B3st	Bactéria	Misturado	Coluna de infiltração	4,0
	C1 (controle)	Meio de cultura sem bactéria	Tubo perfurado		4,0
	C2 (controle)	Meio de cultura sem bactéria	Coluna de infiltração		4,0

\* Camada de brita e geotêxtil

Quadro 3.6 - Correspondência dos testes de análise realizados aos ensaios

Nome do ensaio	Mineralogia e microscopia		Resistência e rigidez	Estudo da heterogeneidade		
	SEM	XRD	Teste UCS	Concentração iões NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	CaCO <sub>3</sub> (%)	MIP
E3t	✓	-	-	-	✓	✓
E4st	✓	✓	-	-	✓	✓
B2ct	✓	✓	✓	✓	✓	✓
B2st	✓	✓	✓	✓	✓	✓
B3ct	-	-	✓	✓	✓	✓
B3st	-	-	✓	✓	✓	✓
Controle (C1 e C2)	-	-	✓	-	✓	-
Areia não tratada	✓	✓	-	-	✓	-



## **4 Câmara de inoculação**

Como referido, um dos principais objetivos desta tese é estudar diferentes formas de tratamento do solo por biocimentação de modo a definir uma estratégia que permita que este se processe de forma homogénea e possibilitando a recolha de efluente para posterior análise química. Para tal desenvolveu-se uma câmara de inoculação para tratar provetes de solo com dimensões compatíveis com a câmara de ensaio triaxial do IST.

O desenvolvimento desta câmara passou por um processo de aprendizagem, em que se procedeu ao tratamento de uma série de provetes de teste fazendo variar os agentes biológicos e a forma de injeção e se realizaram modificações pontuais no dispositivo antes de se alcançar a montagem final. Esta montagem corresponde ao processo que permitiu o tratamento de provetes de areia da forma considerada o mais homogénea possível. Estas modificações foram realizadas com base nos resultados obtidos da monitorização dos processos de injeção, na avaliação do estado de cimentação dos provetes e na observação dos diversos componentes do dispositivo. Também se apresenta a nomenclatura adotada para cada caso, nomeadamente: provetes E ou B - usou-se enzima ou bactéria, respetivamente-, ao qual se acrescentou ct e st - usou-se ou não tubo perfurado no interior do provete para injeção do tratamento.

Neste capítulo descreve-se a câmara de inoculação e os passos seguidos de onde resultaram as várias modificações realizadas na sua montagem e que culminaram na solução final. Deste modo, na secção 4.1 descreve-se o modelo inicial de preparação das amostras e funcionamento planeado para o dispositivo experimental (câmara e procedimento de injeção), seguindo-se pela descrição dos passos tomados visando a sua melhoria. Na secção 4.2 segue-se de igual forma a linha de pensamento da secção anterior, referindo-se, no entanto, à montagem final da câmara utilizado neste estudo. Finalmente, na secção 4.3 apresenta-se a cronologia dos passos realizados numa tabela resumo e conclusão.

### **4.1 Montagem inicial**

#### **4.1.1 Descrição do equipamento e procedimento**

Tal como referido antes, o dispositivo experimental desenvolvido neste trabalho é uma câmara de inoculação, concebida para tratar provetes cilíndricos de areia, usando a técnica de biocimentação. Para controlo do tratamento, o equipamento tem também que permitir a recolha de efluente para posterior análise química, assim como a extração intacta dos provetes no final.

Para tal, conceberam-se duas câmaras de aço, cada uma composta por um tubo cilíndrico com as dimensões 7,2 cm de diâmetro e 14,0 cm de altura, dividido axialmente em duas metades iguais para facilitar a descofragem.

As duas metades do tubo metálico (figura 4.1) encaixam-se em duas peças cilíndricas horizontais, uma no topo e outra na base, confinando este tubo superior e inferiormente e selando-o parcialmente. A circulação de fluidos pela amostra a colocar no interior do tubo foi conseguida através de duas entradas em cada uma destas peças, sendo uma lateral e outra central (figura 4.2 e 4.3). Exteriormente, a roscagem das entradas permitiu a colocação de peças adaptadas como torneiras e tubos. Já interiormente, apenas a entrada central no topo superior da câmara se encontra roscada para permitir a montagem dos provetes de areia com a opção de colocar um tubo central interior perfurado ao longo do seu comprimento. Este tubo perfurado permite a injeção do tratamento pelo interior do provete. A técnica alternativa à injeção através do tubo, baseou-se na promoção da percolação do fluido, no interior do provete, semelhante a uma coluna de infiltração.



Figura 4.1 - Duas metades do corpo central

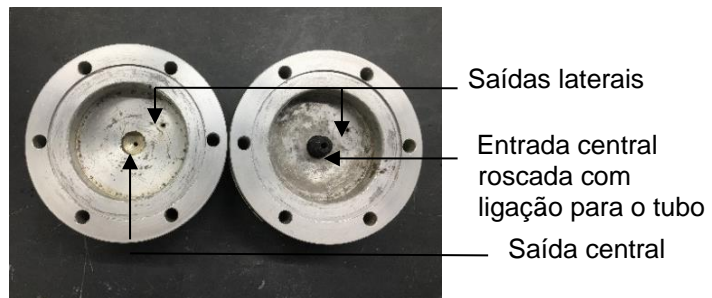


Figura 4.2 - - Base (esquerda) e topo (direita) da câmara (vista do interior)

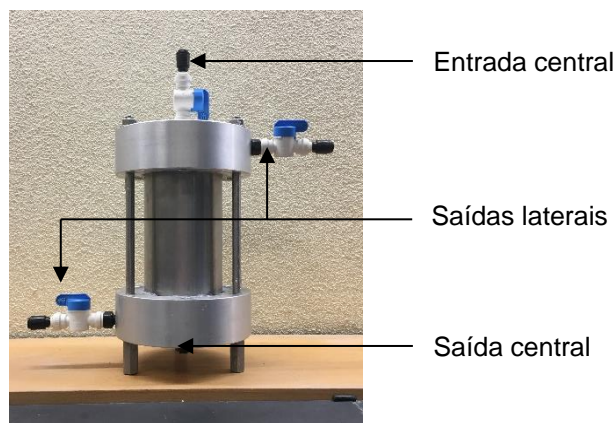


Figura 4.3 - Câmara de inoculação (vista do exterior)

As interfaces entre o tubo central e as peças horizontais de topo e base foram seladas com silicone. Na ranhura deixada pelas duas metades do corpo central aplicou-se fita-cola, por simplificação.

Finalmente, colocou-se papel filtro no interior da câmara em cada abertura, para evitar a lavagem de finos e contaminação do efluente com partículas de areia.

A injeção da solução de alimento foi efetuada com recurso a um controlador de volume/pressão GDS e a uma interface com um balão no seu interior como referido no capítulo 3.3.2. Já para a injeção de bactérias e enzimas recorreu-se a uma seringa com 25 ml de capacidade.

#### **4.1.2 Primeira fase dos ensaios**

Nesta primeira fase procedeu-se inicialmente à injeção de alimento pelas duas técnicas de injeção (tubo e coluna de infiltração) com recurso a enzimas, tendo-se ambas as saídas laterais de topo e base viradas para faces opostas e como pontos de saída para o efluente. Mais tarde na segunda fase, com a introdução da nova montagem com dreno, veio-se a testar ambos os métodos de injeção com enzimas e bactérias, mas tendo como *outlet* a saída central da base.

- **1º Ensaio: teste (t)**

Iniciou-se por testar o preenchimento da câmara com água destilada, procurando-se saturar o provete de areia para retirar a maior parte do ar dos vazios do solo e estudar a eficácia da selagem da câmara nas condições de injeção estabelecidas no capítulo 3.3.2.

Não se registaram fugas, tendo a pressão do fluido estabilizado entre os 50 e 60 kPa nos momentos finais da injeção, terminando-se com sucesso o ensaio.

- **2º Ensaio: E1ct**

Nestes seguintes tratamentos, recorreu-se a enzima em pó como agente hidrolisador, injetando-se 20 ml de solução com concentração 15 g/l, ao início e a meio de cada dia de injeção durante 3 dias. Esperava-se, com este espaçamento entre injeções de enzimas no mesmo dia, uma melhoria na distribuição destes agentes biológicos pelo solo, sendo as enzimas primeiro injetadas, empurradas pela solução de alimento, destinadas para o tratamento das zonas laterais dos provetes (mais afastadas do tubo) e as enzimas injetadas posteriormente para as zonas mais centrais

Observou-se, ao longo da injeção, uma subida progressiva da pressão para valores próximos dos 300 kPa, com contínuas fugas de alimento pelo silicone e fita-cola, não se tendo terminado a primeira injeção com sucesso.

Após inspeção do tubo de injeção, notou-se a colmatagem dos furos por aglomeração de sólidos, provenientes, do que se pensa constituir precipitado de reagentes mal dissolvidos da solução de alimento.

- **3º Ensaio: E2st**

O terceiro ensaio manteve as condições de injeção e de preparação da câmara adotadas no 2º ensaio, procedendo-se, no entanto, à injeção sem o tubo interior, ou seja, como se se tratasse de uma coluna de infiltração. Neste caso colocou-se papel filtro na saída da interface. Pretendia-se, deste modo, evitar-se a obstrução da entrada da câmara, ao impedir-se a circulação de matéria sólida para fora da interface.

Assistiu-se, mais uma vez, a uma subida da pressão para valores acima dos 200 kPa e fugas contínuas de alimento na câmara e interface. O tratamento foi finalizado, tendo-se recorrido a paragens momentâneas da injeção para dissipação de pressões.

- **4º Ensaio: E3ct**

No último tratamento usando esta montagem, voltou-se a recorrer à injeção com tubo no interior do provete de solo, diminuindo-se, no entanto, o espaçamento entre os furos deste tubo de 3,0 cm para 2,0 cm. Adicionalmente, substituiu-se a fita-cola que selava as duas metades do tubo por silicone, para obter uma selagem mais eficiente.

Paragens momentâneas nas injeções, além da nova selagem, permitiram finalizar um dia e meio de tratamento, estando-se mais uma vez dependente da capacidade do sistema de resistir a altas pressões (acima dos 250 kPa).

Após desmontagem do dispositivo, observou-se que o papel filtro e conseqüentemente as saídas laterais para o *outflow* se encontravam obstruídas devido ao arraste de finos (figura 4.4), impedindo a circulação do alimento para fora da câmara.



*Figura 4.4 - Saída lateral da base obstruída por finos*

Posteriormente, a examinação dos provetes de solo, após tratamento, permitiu deduzir outros possíveis motivos que levaram ao insucesso dos tratamentos nesta primeira montagem.

### **4.1.3 Análise visual e qualitativa dos provetes tratados**

De todos os provetes tratados nesta montagem inicial, somente o provete E3ct obteve resultados visíveis no que tocava à formação de biocimentação, uma vez que todos os restantes não

apresentavam qualquer tipo de resistência ao corte com um X-ato. Esta diferença é observável na figura 4.6 em que o provete E3ct apresenta um aspeto coeso e forte, em oposição ao E2st que foi facilmente separável em duas metades.

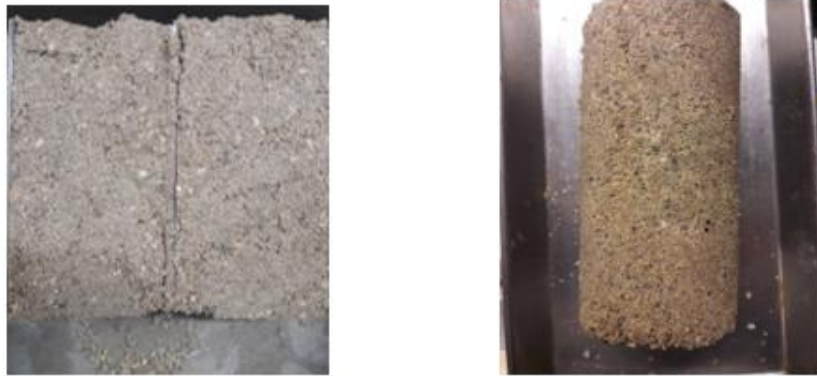


Figura 4.5 - Provete testados E2st (esquerda) e E3ct (direita)

Todavia, apesar do aspecto coeso do provete E3ct, apenas a secção inferior e na zona próxima do tubo é que se encontravam cimentados, tendo sido fácil o destacamento de partículas usando um pincel no topo e laterais após secagem em ambiente de laboratório (pelo menos 48h) e a fendilhação da camada exterior do provete com um X-ato.

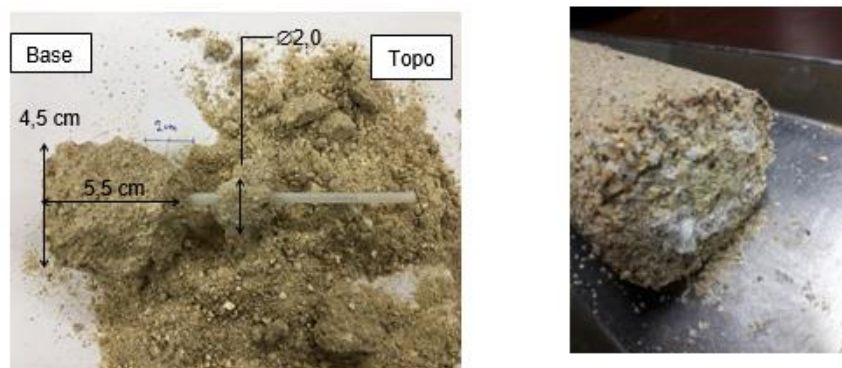


Figura 4.6 - Esquerda: Provete E3ct após destacamento de partículas com pincel e Direita: Desenvolvimento de organismos biológicos na base do provete E3ct

Observando a figura 4.6, são visíveis torrões de areia coesos que se soltaram da coluna E3ct, de dimensões variadas chegando a vários centímetros. Embora aparentemente coesos, estes torrões eram facilmente destruídos com os dedos. Em oposição, verificou-se a existência de uma secção muito coesa a meio da coluna junto a um dos furos do tubo, e uma porção com maiores dimensões junto à saída.

Supôs-se, na altura, que em conjunto com a obstrução das saídas pelo arraste de finos, a redução da permeabilidade do solo devido ao efeito de colmatação da biocimentação tivessem sido os maiores motivos levando à elevação das pressões de injeção.

Curiosamente, esta foi o único provete em que se veio a registar o desenvolvimento de fungos, tipo bolor (figura 4.6), eventualmente devido à presença de humidade e extrato de levedura (*yeast*) no provete. Não se associou o insucesso do tratamento a possíveis colmatações biológicas já que o aparecimento destes fungos aconteceu posteriormente à descofragem.

## 4.2 Montagem final

### 4.2.1 Descrição das modificações adotadas

Com o intuito de solucionar os problemas apresentados na secção anterior, uma nova montagem composta por um conjunto dreno e geotêxtil, contíguo às entradas e saídas do dispositivo, foi incluída na câmara.

Esta montagem, similar à já empregue por Harkes et al (2008), procurava melhorar a circulação dos fluidos injetados, criando na base e no topo zonas com elevados coeficientes de permeabilidade que facilitassem o escoamento para fora da câmara (tendo em conta a granulometria grossa do dreno). Por outro lado, o filtro geotêxtil (Scotch Brite) colocado teria como funções o retardamento do arraste de finos para junto da saída e a separação do solo arenoso da camada de brita.

Quanto ao *outflow*, este passou a ser realizado somente através da saída central da base (oposta à entrada central do topo), uma vez que se procurava uniformizar a rede de escoamento no interior da câmara, diminuindo as perturbações no escoamento e assim facilitar a renovação do alimento.

### 4.2.2 Ensaio efetuados

A nova montagem foi testada inicialmente com bactéria (provete B1t). O tratamento foi acompanhado por baixas pressões, terminando-se após as 3 injeções planeadas inicialmente, mas para pressões de injeção de 18 kPa, muito abaixo das pressões anteriores. Não se registaram fugas.

Verificou-se a inexistência de finos junto à saída (Figura 4.7) contrariamente ao observado na figura 4.4, justificando a utilização do geotêxtil enquanto filtro.



Figura 4.7 - Saída central sem obstrução de finos após tratamento

Devido às baixas pressões aplicadas nos restantes tratamentos, a montagem manteve-se idêntica no restante decorrer dos ensaios, sendo empregue com sucesso nos provetes de areia E4ct e injetados com bactéria.

Excetua-se, contudo, desta lista, os provetes tratados com bactéria com recurso a tubo (B2ct e B3ct) em que apenas foi possível aplicar 3 injeções e meia antes de se atingirem pressões elevadas (acima dos 100 kPa). Da observação dos provetes e da câmara, assim como do facto do aumento de pressão ter ocorrido repentinamente a meio do último dia de tratamento, deduziu-se que nem a colmatação por biocimento, nem o arraste de finos estariam na origem deste fenómeno. Foi ao examinar os tubos injetores que se voltou a constatar a presença de precipitado no interior destes ao nível dos furos (figura 4.8).



*Figura 4.8 - Presença de precipitado no interior dos tubos injetores a) provete B2ct e b) provete B3ct*

Conclui-se que a solução atual é adequada para o tratamento de provetes de areia com dimensões 7,2 x 12 cm, sendo os resultados melhores quando não se colocou o tubo. Sugere-se que os problemas de obstrução, identificados em injeções com tubo, possam ser resolvidos no futuro experimentando: i) O aumento do diâmetro do tubo e os seus furos ou ii) A injeção de um volume reduzido de água destilada, no final de cada injeção, para impedir a formação de precipitado no interior do tubo.



### 4.3 Resumo final

Apresenta-se de seguida uma tabela resumo, ilustrando os principais parâmetros e observações registados que conduziram à solução atual da câmara de inoculação.

Quadro 4.1 - Quadro-resumo dos ensaios realizados

	Nome do ensaio	Breve descrição	Pressão final (kPa) - fugas?	Fim ensaio? - inj. concl. / previstas	Observações
<b>Solução sem dreno e filtro</b>	teste	Saturação com água	60 - Não	Sim - 1/1	Não se registaram problemas ao longo da inoculação
	E1ct	enzimas intercaladas com alimento	285 - Sim (interface e câmara)	Não	Tubo obstruído por precipitado e reagentes mal dissolvidos, vindos da solução de alimento
	E2st	Injeção coluna de infiltração e colocação de papel filtro no interior da interface	210 - Sim (interface e câmara)	Sim - 1/1	Conclusão do tratamento devido a paragens momentâneas na injeção para dissipação de pressão
	E3ct	Injeção pelo tubo, maior número de furos e selagem somente com silicone	250 - Sim (interface e câmara)	Não - 1,5/2	Saídas obstruídas devido à lavagem de finos e clogging com precipitado CaCO <sub>3</sub>
<b>Solução com dreno e filtro</b>	B1st	Introdução de dreno e geotêxtil junto à entrada e saída da câmara	17 - Não	Sim - 3/3	Arraste de finos impedido, diminuição das pressões abaixo de 20 kPa
	E4ct		20 - Não	Sim - 4/4	Conclusão da biocimentação de coluna com recurso a tubo e enzima
	B2ct		100 - Sim (interface)	Não - 3,5/4	Tubo obstruído no seu interior com precipitado
	B3ct		100 - Sim (interface)	Não - 3,5/4	Tubo obstruído no seu interior com precipitado

A solução inicial, onde se preencheu a câmara de inoculação por completo com areia e recorreu-se às duas formas de injeção com enzimas, demonstrou problemas de circulação do alimento ao verificar-se obstrução das saídas da câmara e do tubo interior com biocimento, resultando em elevadas pressões de injeção e por consequência fugas de alimento. Com a nova montagem, onde se ensaiaram as mesmas formas de injeção na montagem anterior com enzimas e bactérias, observou-se a ausência de finos junto às saídas graças ao geotêxtil introduzido, para além da necessidade de menores pressões para a circulação de alimento. No entanto, os problemas de colmatção no interior do tubo injetor permaneceram, tendo impedido a finalização do tratamento dos provetes B2ct e B3ct.



## 5 Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados dos ensaios realizados nos diversos provetes tratados de acordo com o descrito no capítulo 3. Tratam-se de ensaios para caracterização da homogeneidade do tratamento, e para avaliação da resistência e rigidez. No primeiro caso foi feita a avaliação da presença de  $\text{CaCO}_3$  e da homogeneidade do tratamento através de ensaios de lixiviação, análise de imagens de microscópio de varrimento de elétrons (SEM) e caracterização química por espectroscopia de difração de raios-X (XRD) e porosimetrias por intrusão de mercúrio (MIP) em amostras recolhidas em vários pontos dos provetes. No segundo caso foram realizados ensaios de compressão simples (*unconfined compression tests*, UCS), mas apenas nas amostras tratadas com bactérias pois foram as únicas que não se desfizeram na desmontagem.

A análise dos resultados e a sua comparação é feita juntamente com discussão focada nos efeitos das formas de injeção de alimento e bactérias empregues neste estudo, na homogeneização e ganhos mecânicos dos provetes.

### 5.1 Resultados SEM e XRD

#### 5.1.1 Análise por difração de raios X, XRD

A análise de difração de raios X, XRD, permitiu determinar a composição mineralógica de amostras retiradas de areia não tratada, do provete E4t tratado com enzima e das secções do topo e da base dos provetes de solo injetados com bactéria, os provetes B2st e B2ct. O objetivo desta análise foi confirmar a presença de cristais de carbonato de cálcio e apurar a forma de mineral em que este se manifestou: calcite, vaterite ou aragonite.

Esta técnica interpreta o comportamento difractário dos elementos que compõem as amostras testadas, correspondendo uma intensidade do feixe difratado a cada ângulo de incidência do feixe de raios X. Obtém-se um *score* relativo à sobreposição dos picos característicos das amostras com os picos característicos dos minerais contidos em bases de dados referenciadas. Embora este *score* não reflète diretamente as concentrações de um determinado mineral, quanto maior for o seu valor, mais provável é a presença desse mineral.

Apresenta-se no Anexo 2 o comportamento difractário da amostra retirada da provete B2ct da secção do topo, a título de exemplo. Observam-se a presença de minerais silicatos que compõem a areia e carbonato de cálcio sob a forma de calcite, tendo-se realçado os picos característicos destes último.

Os minerais e os respetivos scores obtidos para os provetes analisados são apresentados no Quadro 5.1:

Quadro 5.1 - Minerais identificados em cada provete

Provete	Propriedades	Nome dos minerais (score)
Areia não tratada	Branco	Quartzo (53), Microcline (18), Muscovite (26), Caulinite (14)
E4ct	Amostra retirada da lateral (blocos destacados)	Quartzo (55), Microcline (25), Muscovite (20), Caulinite (16), <b>Albite e Calcian (12)</b>
B2ct	Amostra do topo	Quartzo (58), Microcline (26), Muscovite (21), Caulinite (26), <b>Calcite (27)</b>
B2ct	Amostra da base	Quartzo (61), Microcline (26), Muscovite (21), Caulinite (26), <b>Calcite (27)</b>
B2st	Amostra do topo	Quartzo (57), Microcline (16), Muscovite (15), Caulinite (17), Biotite (11), <b>Calcite (32)</b>
B2st	Amostra da base	Quartzo (52), Microcline (21), Muscovite (22), Caulinite (15), <b>Calcite (10)</b>

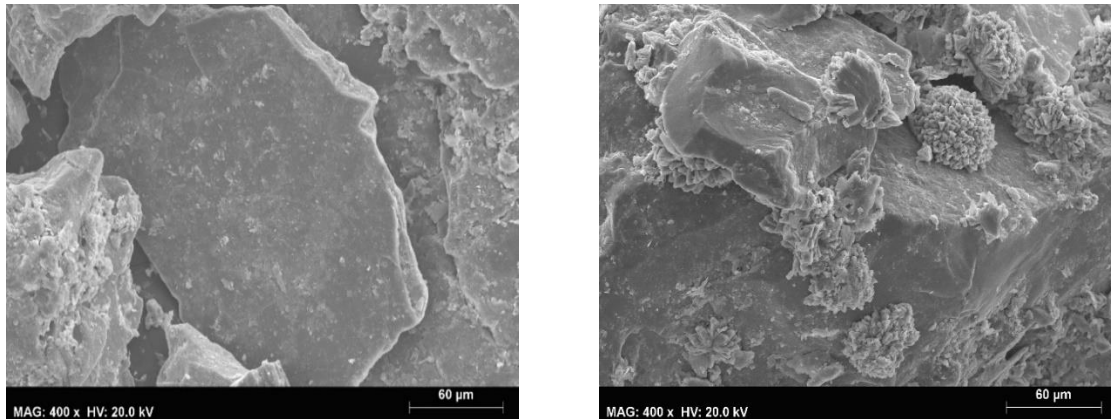
Os resultados obtidos demonstram que os minerais silicatos (Quartzo, Microcline e Muscovite) da areia são predominantes, e estranhamente registou-se a presença de alguma argila (Caulinite).

A calcite foi o único mineral de carbonato de cálcio identificado nas amostras tratadas com bactéria. Na comparação da qualidade das sobreposições dos picos (score), observam-se menores valores nas amostras retiradas da base (10 e 27) relativamente à secção do topo (27 e 32), podendo-se dever a heterogeneidade do tratamento (desequilíbrio da presença do mineral ao longo do provete).

Quanto ao provete tratado com enzima E4ct, determinaram-se invés da calcite, mais formas de silicatos (albite) e minerais contendo cálcio (*calcian*), podendo-se associar a sais cálcio não dissolvidos e não reagidos da solução de alimento. Esta ausência de minerais de carbonato de cálcio pode ser justificada pela fraca cimentação da secção lateral do provete de onde foi retirada a amostra.

### 5.1.2 Imagens microscópio SEM

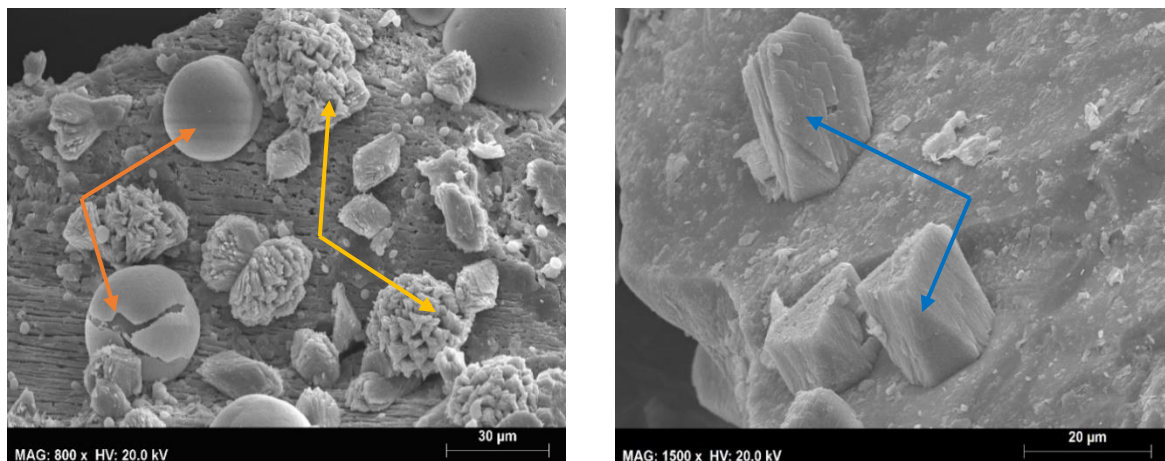
As imagens capturadas com o microscópio de varrimento de eletrões, SEM, permitiram a visualização, à microescala, das superfícies das partículas do solo arenoso. A comparação das amostras não tratadas em relação às biocimentadas revelaram a aparição de precipitados com diferentes estruturas cristalinas (figura 5.1). As análises EDS confirmaram estes mesmos cristais como sendo carbonato de cálcio ao identificar carbono e cálcio na sua composição química.



*Figura 5.1 - Comparação imagens SEM entre amostra não tratada (esquerda) e tratada (direita)*

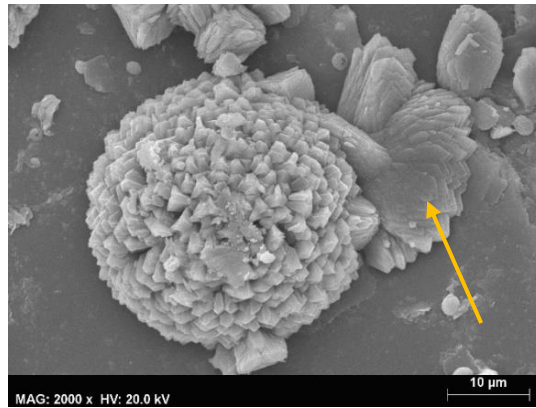
O precipitado de  $\text{CaCO}_3$  foi observado sob três arranjos diferentes:

- Estrutura cristalina semelhante a uma “roseta” (figura 5.2), sendo a forma mais predominante em todas as amostras biocimentadas. O seu tamanho varia entre os 20 e 40  $\mu\text{m}$ .
- Estrutura cristalina esférica, dito amorfa (figura 5.2), observada exclusivamente na amostra tratada com enzima E3t (antes da implementação do dreno e filtro). As suas dimensões variam entre os 30 e 60  $\mu\text{m}$ .
- Estrutura cubica de dimensões mais reduzidas (5 a 20  $\mu\text{m}$ ) e menos frequentes (figura 5.2).



*Figura 5.2 - Diferentes arranjos cristalinos do precipitado: forma amorfa (flechas laranjas), rosetas (amarelas) e formas cubicas (azuis)*

Uma primeira observação das imagens SEM revelam que o precipitado tipo “roseta” é composto por um aglomerado de tetraedros imbricados e dispostos circularmente (figuras 5.2 – flecha amarela e 5.3). Mais, imagens ampliadas de cristais fragmentados revelaram que os tetraedros são formados por lamelas finas sucessivas com extremidades triangulares (figura 5.3 – seta amarela). A mesma forma lamelar aparenta existir nas estruturas cubicas, pondo-se a questão se esta forma pode tratar-se de uma fase inicial das rosetas.

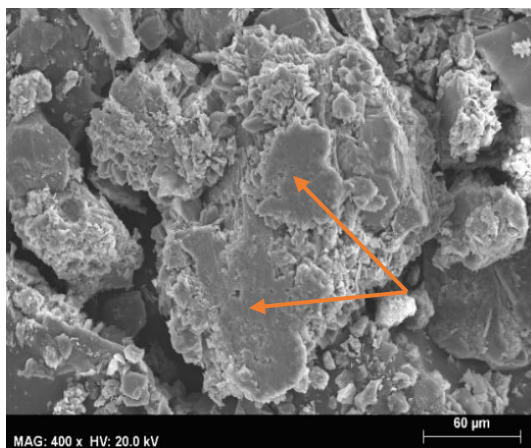


*Figura 5.3 - Mineral de calcite tipo roseta intacta e fragmentada (flecha amarela)*

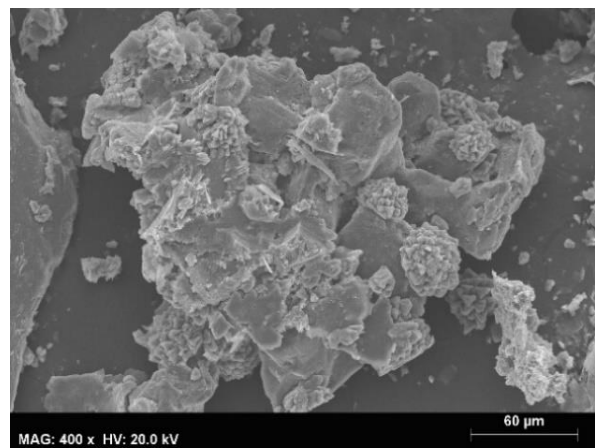
Ligações de precipitado de  $\text{CaCO}_3$ , formadas no contacto entre partículas de areia, constituem a razão principal para se verificarem ganhos mecânicos em solos biocimentados. No entanto, a procura por estas ligações nas imagens SEM recolhidas foi por vezes impossibilitado pelo estado desagregado com que as amostras entravam no microscópio.

A figura 5.4 é exemplo destes fenómenos destrutivos, em que a face lisa do cristal de  $\text{CaCO}_3$  a meio da imagem aparenta revelar uma área anteriormente ocupada por um grão plano cimentado.

Noutros casos, o ângulo com que os grãos foram observados ou até mesmo a elevada quantidade de cristais de  $\text{CaCO}_3$ , dificultaram a diferenciação dos contornos das partículas arenosas e, por conseguinte, das ligações existentes. Não obstante, foi visível a formação de agregados de areia devido às propriedades cimentícias dos minerais de carbonato de cálcio (Figura 5.5).



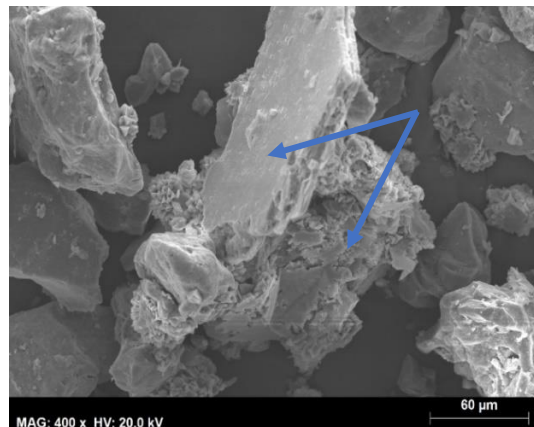
*Figura 5.4 - Partícula arenosa cimentada anteriormente a uma partícula plana*



*Figura 5.5 – Partículas arenosas agregadas pelo biocimento*

Ao longo das sessões notou-se uma maior tendência na precipitação de minerais carbonato em partículas com textura rugosa e entre fendas, podendo ser explicado por uma melhor eficácia de adesão, por parte das bactérias, a superfícies irregulares (Foppen e Schijven, 2005). Na figura 5.6

observa-se o contraste entre a quantidade de precipitado adquirido pela partícula com superfície lisa e o agregado irregular em baixo.



*Figura 5.6 - Contraste da quantidade de precipitado entre uma partícula lisa e um agregado irregular*

A comparação da densidade de precipitado e do tamanho dos cristais, devido aos diferentes teores em  $\text{CaCO}_3$  esperados entre as posições radiais e longitudinais dos diferentes provetes, não foram evidentes nas imagens SEM.

A confirmação da presença de precipitado de carbonato de cálcio nas imagens SEM foi feita pelas análises EDS que permitiram conhecer a estrutura química dos minerais visualizados. O seu funcionamento, igual aos dos raios X, passava pela sobreposição dos picos característicos da energia emitida proveniente de uma zona selecionada na imagem SEM, com uma base de dados contendo o comportamento energético de todos os elementos químicos.

A composição química dos grãos de areia não tratada coincidiu com a dos minerais siliciosos identificados nas análises raios X, verificando-se uma predominância de silício (Si), alumínio (Al), oxigênio (O), potássio (K), ferro (Fe) e magnésio (Mg). Constataram-se, igualmente, outros elementos químicos originalmente não presentes na areia, como o ouro (Au) e o paládio (Pd), provenientes da cobertura condutora utilizada na preparação das amostras para o SEM. Quanto aos minerais de carbonato de cálcio analisados, a composição química não varia para as formas de cristais visualizadas, sendo, como previsto, o carbono (C), oxigênio (O) e cálcio (Ca) os elementos dominantes. Ocasionalmente, observou-se cloro (Cl) nos resultados proveniente da fonte de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) da solução de alimento.

As imagens SEM analisadas pelo EDS e os picos característicos com correspondentes elementos químicos encontram-se no anexo 1. Apresentam-se os resultados das três formas distintas de precipitado (amorfa, roseta e cubica) identificados nas sessões SEM, assim como da areia não tratada.



## 5.2 Resultados dos ensaios à compressão simples (UCS)

### 5.2.1 Figuras de rotura

A resistência mecânica adquirida durante o tratamento de biocimentação foi testada através de ensaios à compressão simples (UCS). Durante a fase de carregamento observaram-se as figuras de rotura de cada provete.

Deste modo, ambos os provetes de controlo C1 e C2 exibiram uma deformação volumétrica típicas de materiais normalmente consolidados, sem planos de rotura bem definidos (Figura 5.7 – a)). Já os provetes injetados com bactéria (B2st e B2ct) apresentaram deformação volumétrica com rotura por esmagamento na secção da base, e curtas fendas verticais ao longo da altura (Figura 5.7 – b) e c)).

Por sua vez, nos provetes em que a areia foi pré-misturada com bactéria (B3st e B3ct), observaram-se superfícies de deslizamento inclinadas em toda a extensão vertical do topo à base (figura 5.7 – d) e e)), característico de falhas devido ao corte de natureza frágil. Para além da rotura por corte no provete B3st, são igualmente visíveis deformações volumétricas e esmagamento ao nível da base.

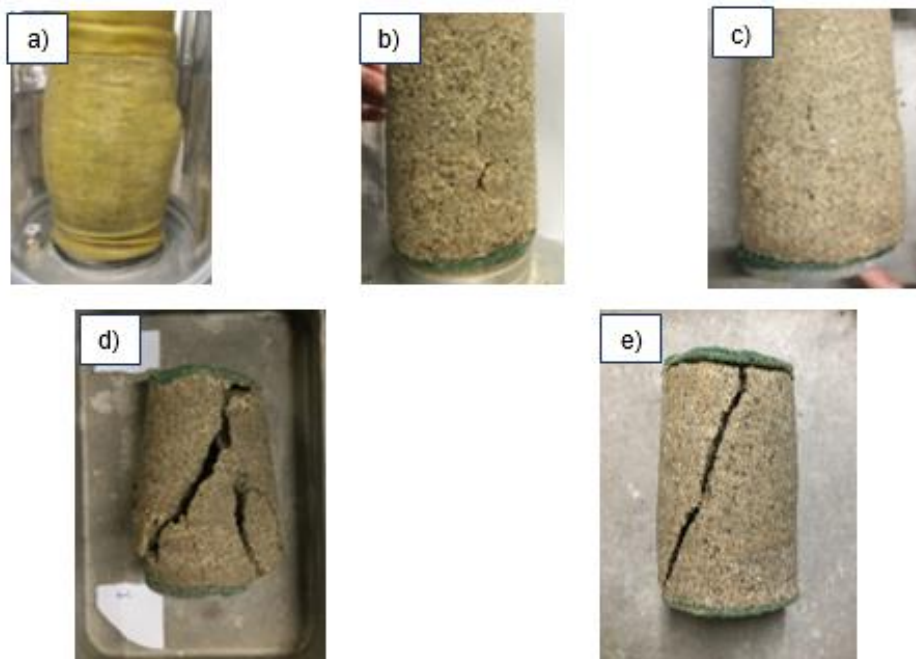


Figura 5.7 - Figuras de rotura dos provetes de: Controlo a) C1; Injetadas b) B2st, c) B2ct e Pré-misturadas d) B3st, e) B3ct

Assim, os provetes injetados B2st e B2ct, em conjunto com a pré-misturada B3st, apresentaram esmagamento localizado junto à base, possivelmente dada a diferença entre o grau de cimentação da secção junto à base e os substratos subjacentes. Por outro lado, a formação de planos de deslizamento, resultante de esforços excessivos de corte nos provetes pré-misturados sugerem roturas frágeis.

## 5.2.2 Avaliação da resistência e rigidez

Quadro 5.2 - Propriedades mecânicas das provetes ensaiados

	Provete	qu (kPa)	$\delta\epsilon_{pico}$ (%)	E50 (MPa)
Controlo	C1	18	4,5	0,35
	C2	18	5,7	0,36
Injetadas	B2st	99	2,85	4,96
	B2ct	120	3,7	4,79
Pré-misturadas	B3st	150	2,9	6,89
	B3ct	60	2,76	3,48

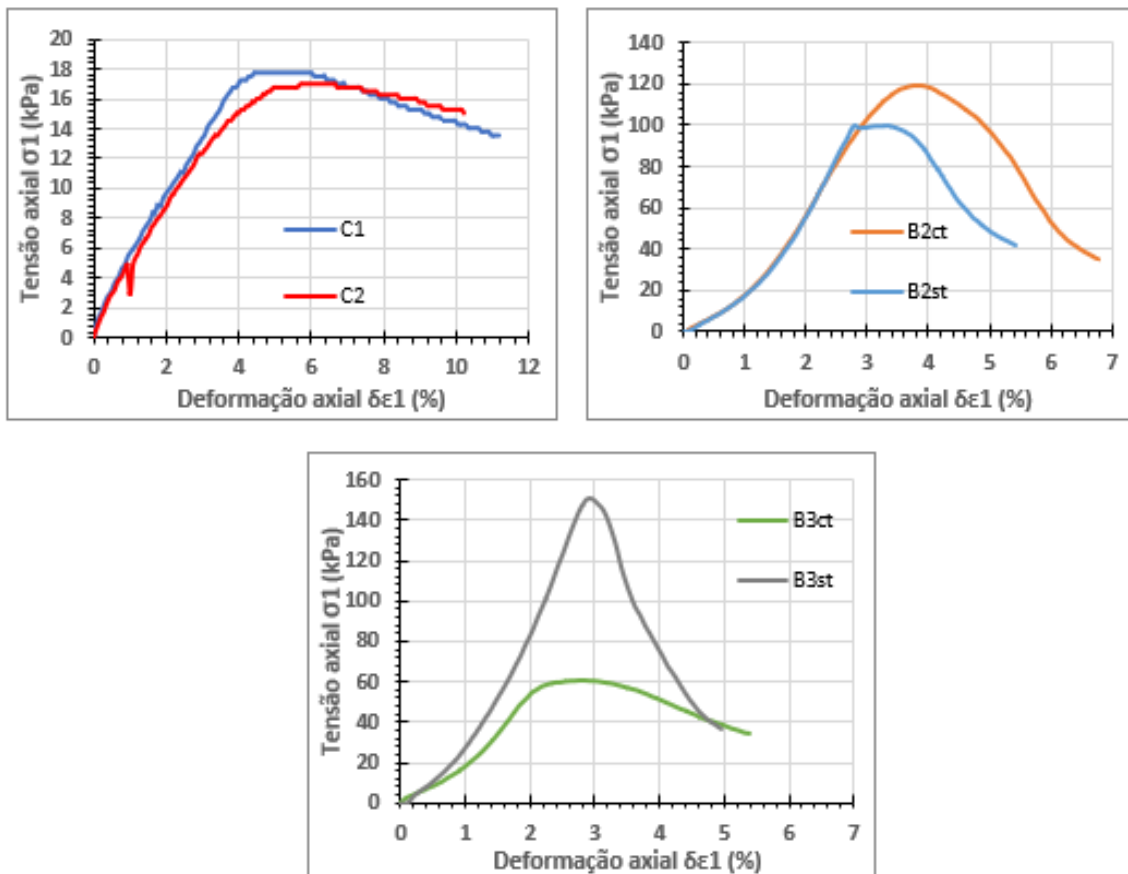


Figura 5.8 - Diagramas tensão deformação obtidos dos ensaios UCS aos provetes de: a) controlo, b) injetados, c) pré-misturados

A figura 5.8 apresenta os gráficos tensão-deformação registados durante os ensaios de compressão simples das várias amostras. Os valores de pico ( $q_u$ ) e a deformação máxima conseguida em cada caso sintetizam-se no quadro 5.2.

A comparação entre os provetes de controlo e os provetes tratados com bactérias permite concluir que o recurso às bactérias permitiu um aumento da resistência em quase 9 vezes: passa de 18 kPa

(C1 e C2) para um máximo de 150 kPa registado no provete B3st. Já o provete B2st apresentou a menor resistência (100 kPa) dos três provetes biocimentados e ensaiados com sucesso, tendo o seu homólogo com tubo B2ct apresentado 120 kPa de pico.

Finalmente, o ensaio do provete B3ct revelou uma tensão de pico muito abaixo do expectável dos provetes pré-misturados (60 kPa), por supostamente a sua preparação permitir amostras mais homogéneas.

O mau resultado observado no provete B3ct foi associado à interferência do tubo no interior porque instabilizou por ser esbelto e estar sujeito a esforços elevados. Ao encurvar quebrou parte das ligações cimentícias que o mantinham ligado ao solo. Este comportamento do tubo não se verificou no ensaio do provete B2ct pois, neste último, o tubo partiu-se quando se descofrou o provete, agindo como uma armadura em suspenso.

No que se refere à rigidez dos provetes, os ganhos são bem ilustrados pela determinação do módulo de Young, sendo o seu maior valor medido no provete B3st (módulo tangente a 50% do pico de 6,9 MPa, muito acima dos 0,35 MPa registados nos provetes de controlo). Para os provetes injetados com e sem tubo, ambos apresentaram módulos semelhantes e muito superiores aos de controlo (4,8 e 5,0 MPa respetivamente). Quanto ao provete B3ct, mediu-se uma rigidez abaixo dos restantes provetes biocimentados (3,5 MPa), dado que o ensaio foi interrompido precocemente.

A diferença entre rigidezes é observável, igualmente, na evolução das curvas tensão-deformação. Curiosamente, constatou-se uma evolução idêntica, tanto nos provetes injetados como no pré-misturado B3ct, apesar deste último ter recebido um tratamento semelhante ao B3st (figura 5.9).

Esperava-se aliás, que nos primeiros momentos do ensaio UCS, o tubo no interior, não estando a ser solicitado, resultasse em uma evolução inicial das tensões-deformações semelhante ao do homólogo sem tubo. Já para o provete B3st, o caminho tomado pela curva mostrou ter uma maior rigidez inicial, divergindo da trajetória tomada pelos restantes provetes.

Finalmente, após o pico verificou-se uma queda abrupta, sobretudo no provete B3st, o que corresponde ao comportamento típico de uma rotura frágil, associado à rotura das ligações biocimentadas. Da mesma forma, a redução da deformação registada no pico ( $\delta\epsilon_{pico}$ ) após o tratamento demonstra a perda de ductilidade do material (de 4,5 a 5,7% nas amostras de controlo para o intervalo 2,8 a 3,6% nos provetes biocimentados). Este mesmo comportamento também foi observado nas figuras de rotura como já referido.



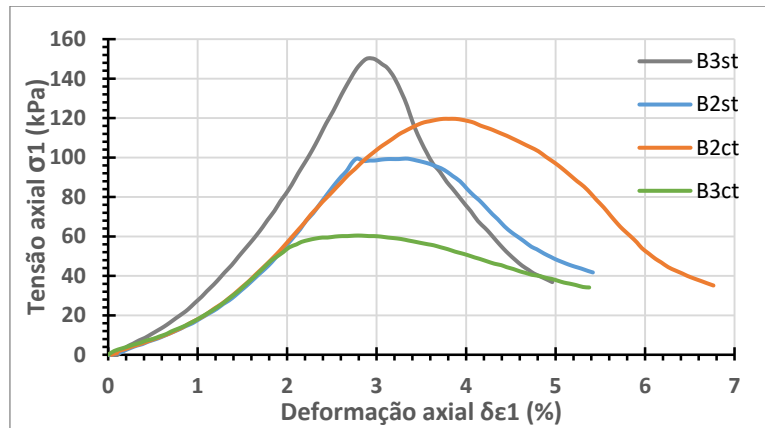


Figura 5.9 - Curvas tensão-deformação dos provetes biocimentados

Concluindo, os resultados dos ensaios UCS permitiram verificar ganhos mecânicos nos provetes biocimentados. Observaram-se figuras de rotura por esmagamento junto à base nos provetes injetados e no B3st, eventualmente devido à falta de biocimento na secção. Por outro lado, os provetes pré-misturados demonstraram rotura por corte, sinal de comportamento mais frágil (associado a um maior teor de cimentação) e comprovado pela redução da deformação axial aquando do pico. Os ganhos em rigidez foram confirmados através da comparação dos módulos de Young. A obtenção de uma resistência superior no provete pré-misturado B3st e a transição para uma rotura frágil com menores deformações volumétricas junto à base, aparentam demonstrar o sucesso deste método de preparação dos provetes (pré-mistura da bactéria) em obter mais homogeneidade.

### 5.3 Resultados das técnicas de avaliação da homogeneidade do tratamento

A secção 5.3 relaciona os resultados das diferentes técnicas de monitorização à medida que estes são apresentados, assim como com os resultados dos ensaios UCS.

#### 5.3.1 Ensaio de lixiviação – determinação do teor em $\text{CaCO}_3$

O ensaio de lixiviação permitiu quantificar os teores de  $\text{CaCO}_3$  dos provetes tratados com bactérias e enzimas, segundo a posição radial e longitudinal de onde foram retiradas as amostras. Estes teores consistem na massa de precipitado, dissolvido durante o ensaio de lixiviação, em relação à massa final das amostras (correspondendo ao das partículas de areia), tal como explicado no capítulo 3.6.2.

Para esta secção, a análise da homogeneidade do tratamento foi realizada: i) Apresentando os resultados obtidos radialmente (segundo eixo central ou lateral) e longitudinalmente (em altura), ii) Relacionando os resultados com o efeito do tubo, segundo os métodos de preparação do solo (injetados ou pré-misturados), e iii) Discutindo a conformidade da distribuição dos teores de carbonato de cálcio com os resultados obtidos nos ensaios UCS. Ao final será discutida, igualmente, as distribuições de precipitado nos provetes tratados com enzima E3t e E4ct e dos provetes de controlo C1 e C2, tratados sem bactéria ou enzima.

### 5.3.1.1. Análise dos provetes injetados (bactéria) B2st e B2ct

A distribuição do  $\text{CaCO}_3$  ao longo da altura no centro ou na periferia lateral apresentam-se na figura 5.10 para os dois provetes injetados e tratados com bactéria.

Os resultados obtidos mostram teores em  $\text{CaCO}_3$  variando dos 1,8% aos 4,2% para os provetes injetados (B2st e B2ct), tendo-se notado que a distribuição do precipitado radialmente e ao longo do corpo arenoso variou consoante o método de injeção.

No provete B2st observam-se disparidades radiais no conteúdo de precipitado nas secções do topo (junto ao inlet) e na base. Na base é mais visível, com a posição lateral possuindo mais 1,2% de calcite em relação ao centro. O provete B2ct, pelo contrário, revelou valores praticamente iguais quer a amostra tivesse sido extraída do centro ou da lateral.

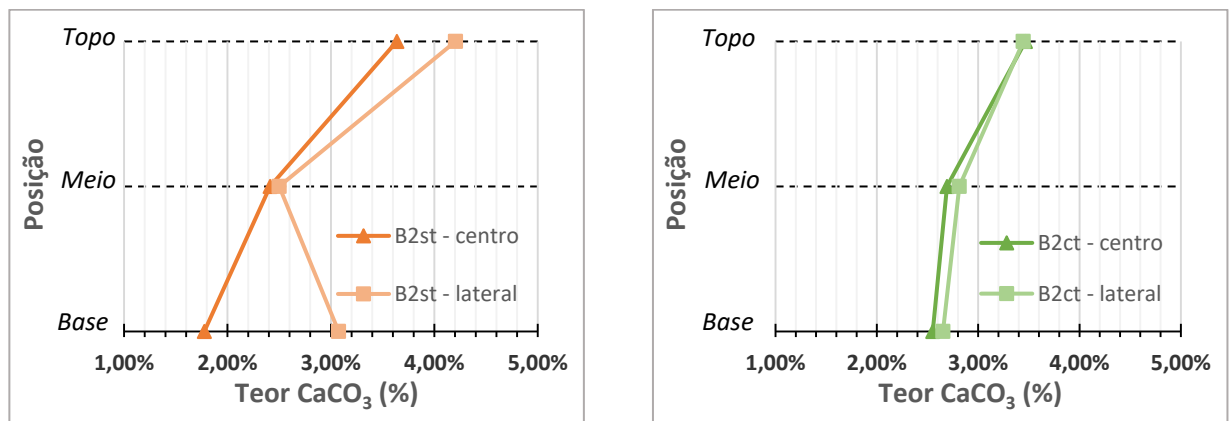


Figura 5.10 – Conteúdo em  $\text{CaCO}_3$  segundo as posições longitudinais e radiais dos provetes injetados B2st (esquerda) e B2ct (direita)

Quanto à homogeneidade do precipitado ao longo da altura, os resultados revelam uma redução linear dos teores em ambos os casos. De facto, o provete sem tubo demonstra um maior conteúdo junto ao topo (3,8%) em oposição às suas secções do meio e base (1,8%, 2,4% e 3,1%). O mesmo acontece no provete com tubo (3,5% no topo contra 2,6% na base). Contudo, constata-se uma certa estabilidade do teor em calcite, sendo a diferença entre o máximo e o mínimo (por outras palavras entre o topo e a base) de apenas 0,9%, por oposição aos 2,4% do provete sem tubo B2st.

Esta falta de cimentação nos troços inferiores nos dois provetes coincidem, alias, com a localização da rotura por esmagamento na base, observada nos ensaios UCS. Por outro lado, o teor de cimentação superior na base, onde se deu rotura, para o provete B2ct (2,6%) em relação ao B2st (1,8% ao centro), explica igualmente a melhor resistência deste primeiro (120 kPa contra 100 kPa).

Não obstante, constata-se um teor/grau de cimentação médio (média ponderada tendo em conta o volume de cada secção de onde se extraiu a amostra dissolvida e o seu teor em  $\text{CaCO}_3$ ) semelhante

em ambos os provetes (3,0 e 3,1%) embora, lembremos, que o tratamento nos provetes com tubo não tenha sido concluído (devido à obstrução do tubo com precipitado, ver secção 4.2.2).

A utilização de tubo teve, portanto, impacto no que toca à distribuição de precipitado ao longo do provete, ao diminuir as distâncias que reagentes e bactérias teriam que percorrer no interior do solo, irrigando-se mais facilmente as secções inferiores. Como consequência o provete com tubo B2ct revelou melhor homogeneidade de tratamento em contraste ao provete sem tubo B2st, cuja forma de injeção (coluna de infiltração) promoveu a precipitação no troço superior (junto ao inlet) em detrimento do troço inferior (junto à saída), assim como do eixo lateral (junto às paredes da câmara) em detrimento do eixo central.

No quadro 5.3, ilustram-se as principais diferenças constatadas entre os provetes injetados e as principais observações do efeito da forma de inoculação utilizada na cimentação.

*Quadro 5.3- Quadro resumo contendo principais observações dos ensaios de lixiviação nos provetes injetados*

	<b>Provete sem tubo B2st</b>	<b>Provete com tubo B2ct</b>	<b>Provetes injetados</b>
<b>Observações</b>	Amplo intervalo de teores (1.8% a 4.2%) revela heterogeneidade longitudinal	Reduzido intervalo de teores (2,6% a 3,4%) revela boa homogeneidade longitudinal	Grau de cimentação médio 3.0% e 3.1%
	Heterogeneidade radial no topo e base (1,2% e 0,7%)	Homogeneidade radial (diferença de teores entre eixo central e lateral nula)	Teor em CaCO <sub>3</sub> decresce com aumento da distância ao topo
	Troço superior mais cimentado (3,8% no topo contra 2,4% na base)	Topo melhor cimentado que meio e base (3,4 % no topo contra 2,7% na base)	Alto contraste na homogeneidade lateral e longitudinal segundo forma de injeção
	Eixo lateral mais cimentado	-	Intervalo de teores de CaCO <sub>3</sub> amplo (1,8 a 4,2%)

### 5.3.1.2. Análise dos provetes pré-misturados (bactéria) B3st e B3ct

Na figura 5.11 apresentam-se os teores de  $\text{CaCO}_3$  dos provetes pré-misturados.

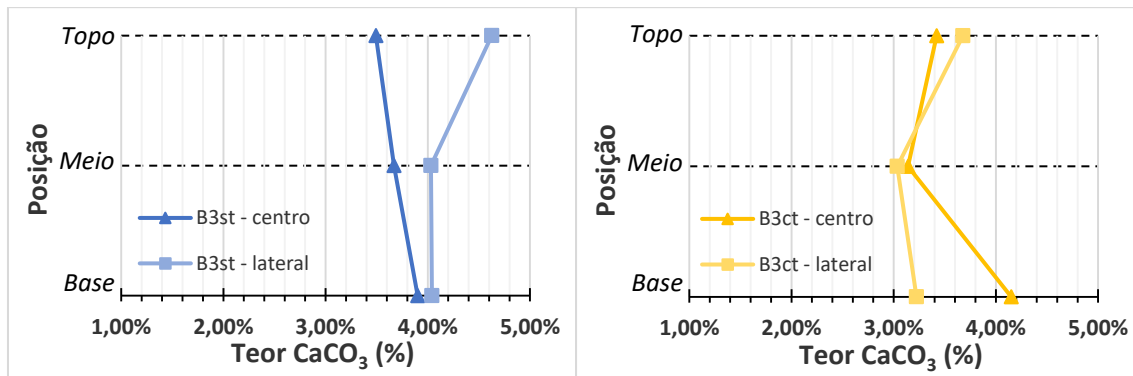


Figura 5.11 - Conteúdo em  $\text{CaCO}_3$  segundo as posições longitudinais e radiais dos provetes pré-misturados sem tubo B3st (esquerda) e com tubo B3ct (direita)

O intervalo em teores de  $\text{CaCO}_3$  dos provetes pré-misturados registou-se entre os 3,0% e 4,5%, sendo o seu teor médio superior no provete sem tubo B3st (4,1%) em relação ao homólogo com tubo B3ct (3,4%).

Em altura, ambos os provetes apresentam evoluções crescentes ou estáveis dos teores de cimentação (do topo para a base), sendo o acréscimo mais visível no eixo central da B3st (3,5% para 4,0%).

No que se refere à distribuição radial, observa-se uma maior cimentação nas posições laterais, estando este fenómeno mais presente no provete B3st onde a secção do topo apresenta a maior discrepância em relação ao centro (cerca de 1,0%). Em contraste, no caso da B3ct a secção da base é a que apresenta a maior diferença (1,0%) embora seja, neste caso, a posição central a mais cimentada. As restantes posições (meio e base para B3st, meio e topo para B3ct) mostram baixa heterogeneidade radial, com a máxima diferença registada de apenas 0,5%

No geral, a utilização de tubo aparenta ter favorecido a homogeneidade do tratamento segundo a direcção radial, ao favorecer a cimentação do eixo central (junto ao tubo) quando comparado à opção coluna de infiltração, onde as posições laterais saíram favorecidas. Este último fenómeno, também observado no provete B2st, pode estar ligado ao favorecimento da percolação do alimento junto das paredes da câmara.

Já a boa homogeneidade de ambos os provetes, e melhor grau de cimentação da base, coincidem com as baixas deformações volumétricas e transição para uma rotura por corte observadas durante os ensaios UCS. Contudo, a reduzida diferença de 0,7% entre os teores médios de ambos os provetes contrastam com as grandes diferenças de resistências entre estes dois provetes (60 kPa e 150 kPa). Tal reforça a ideia que o tubo quase intacto do provete B3ct interferiu, de facto, na resistência registada.

No quadro 5.4 voltam-se a ilustrar as principais diferenças constatadas entre os provetes pré-misturados e as principais observações do efeito da forma de inoculação utilizada na cimentação.

Quadro 5.4- Quadro resumo contendo as principais observações dos ensaios de lixiviação nos provetes pré-misturados

	<b>Provete sem tubo B3st</b>	<b>Provete com tubo B3ct</b>	<b>Provetes pré-misturados</b>
<b>Observações</b>	Intervalo de teores longitudinal para cada eixo inferior a 0,6%	Intervalo de teores nos dois eixos de 0,6 e 1,0%	Grau de cimentação médio de 3,4% e 4,1%
	Heterogeneidade radial mais notável no topo (diferença de 1,0%)	Heterogeneidade radial mais notável na base (diferença de 1,0%)	Teor em CaCO <sub>3</sub> com tendência crescente com aumento da distância ao topo
	Eixo lateral mais cimentado	Eixo central e lateral com semelhanças em teores à exceção da base	Intervalo de teores de CaCO <sub>3</sub> limitado (3,0 a 4,5%).

### 5.3.1.3. Conclusão

Segundo os resultados de lixiviação, a pré-mistura de bactérias com solo permitiu obter provetes mais cimentados (3,4% e 4,1%) em relação aos provetes injetados (3,0 e 3,1%). De igual modo, tanto a homogeneidade longitudinal, como radial, foi inferior no provete injetado B2st em relação aos pré-misturados. Tal deveu-se às diferentes distribuições de bactérias alcançadas pelos dois métodos de preparação dos provetes.

Pelo contrário, a boa homogeneidade em altura e radial do provete injetado B2ct revela o efeito benéfico na distribuição de precipitado na utilização de tubo no método de injeção de bactéria. Deduz-se que o tubo promoveu a irrigação das secções inferiores dos provetes em relação à coluna de infiltração. Já no provete pré-misturado com tubo B3ct, o efeito benéfico da utilização de tubo pode ser posto em causa pela heterogeneidade constatada na base e pela diferença no grau de cimentação médio em relação ao provete homólogo pré-misturado B3st (0,7%), não observado nos provetes injetados (0,1%) assim como pela menor teor médio de cimentação (3,5% contra 4,1%).

No quadro 5.5, apresentam-se as principais observações sobre os efeitos dos métodos de injeção e inoculação de bactérias observadas nos ensaios de lixiviação:

Quadro 5.5 - Quadro resumo apresentando as principais conclusões em relação aos ensaios de lixiviação

	Método de injeção		Método de inoculação bactérias	
	Coluna de infiltração	Com tubo	Injeção	Pré-mistura
Observações	Eixo lateral com teores em CaCO <sub>3</sub> mais elevados	Ambos eixos radiais com teores em CaCO <sub>3</sub> semelhantes	Teores decrescentes com distância ao topo (topo e meio mais cimentados)	Teores estáveis com distância ao topo
	Maior heterogeneidade radial e longitudinal	Homogeneidade radial e longitudinal mais visível	Resultados de homogeneidade contrastantes segundo método de injeção de alimento	Resultados de homogeneidade semelhantes entre métodos de injeção de alimento
	Graus de cimentação contrastantes entre B2st e B3st (3,0 e 4,1%)	Graus de cimentação semelhantes entre B2ct e B3ct (3,1 e 3,4%)	Menores graus de cimentação (3,0 e 3,1%)	Graus de cimentação mais elevados (3,4 e 4,1%)

#### 5.3.1.4. Análise provetes tratados com enzimas e de controlo

No que se refere aos ensaios de lixiviação realizados nos provetes tratados com enzima (E3t e E4ct), a dicotomia extrema de teores de CaCO<sub>3</sub>, obtida entre as posições laterais e centrais (em redor do tubo interior), confirmam a falta de alcance do tratamento com enzimas. Na figura 5.12 em baixo observam-se os diferentes teores obtidos nestes dois provetes.

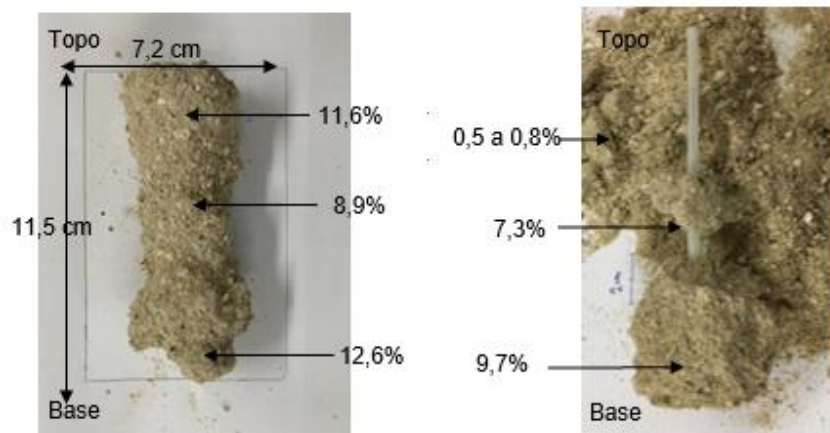


Figura 5.12 - Conteúdo em CaCO<sub>3</sub> de diferentes posições das amostras tratadas com enzimas E4t (esquerda) e E3t (direita)

Se no caso das bactérias, os provetes apresentavam teores de  $\text{CaCO}_3$  no intervalo entre 1,8% e 4,5%, no caso das enzimas esse intervalo foi alargado dos 0,5% aos 12,6%, sendo evidente a disparidade entre os valores do centro e das zonas laterais desagregadas.

Quanto à variabilidade da cimentação ao longo do comprimento dos provetes (evidente no provete E3t), este parece depender em grande parte à integridade dos furos no tubo, sendo possível que parte destes furos tenham ficado parcialmente obstruídos durante o tratamento, favorecendo assim a irrigação de certas secções em detrimento de outras.

A heterogeneidade radial, no uso de enzimas, foi igualmente visualizada no trabalho de Neupane *et al*, (2013) numa coluna de areia com dimensões 56,0 x 85,0 cm. Neste trabalho, o tratamento consistiu na injeção de uma solução, contendo enzimas em pó e alimento, ao centro da coluna de areia com recurso a tubo. Resultados mostraram a disparidade entre teores de  $\text{CaCO}_3$  entre as secções mais próximas do *inlet* em oposição às mais distantes, sendo este fenómeno sobretudo observável radialmente.

Finalmente, análises realizadas no provete de controlo C1 e C2 demonstraram a presença de biocimento em quantidades reduzidas (1,3 a 1,4%), produzido sem o recurso a bactérias ou enzimas. Suspeita-se que este biocimento tenha surgido de reações de equilíbrio na solução de alimento que permitiram uma precipitação mínima de minerais de carbonato de cálcio. É de se destacar, todavia, que este biocimento não conferiu ganhos mecânicos perceptíveis nos ensaios UCS, presumindo-se por não ter formado ligações ativas entre partículas.

### **5.3.2 Porosimetria por intrusão de mercúrio, MIP**

Os testes de porosimetria foram realizados porque se associa a redução do tamanho dos poros com a sua colmatação com carbonato de cálcio. Os resultados destes testes apresentam-se sob a forma de curvas da distribuição do tamanho dos vazios em relação ao volume total destes vazios nas amostras cúbicas testadas. Recorda-se que os testes MIP foram somente realizados nos provetes injetados B2st e B2ct.

A análise dos resultados foi realizada de igual modo à secção anterior, procedendo-se ao estudo individual de cada provete i) Radialmente, ii) Longitudinalmente, e iii) Relacionando os resultados de ambos os provetes, concluindo-se sobre o efeito do tubo na colmatação e homogeneidade do tratamento. Trata-se, logo, de uma análise relativa dado a ausência de curvas características de amostras não tratadas. Mais, ao longo desta secção, os resultados MIP serão relacionados com os obtidos nos ensaios anteriores.

As figuras apresentadas nesta secção ilustram as curvas características dos testes MIP, diferenciando-se as posições centrais do topo (Tcent), do meio (Mcent) e da base (Bcent) das posições equivalentes laterais (Tlat, Mlat e Blat) dos provetes injetados B2st e B2ct. Excetua-se desta análise a secção da base do provete sem tubo B2st, uma vez que a fraca cimentação das amostras levou a que estas não resistissem aos testes MIP.

### 5.3.2.1. Análise do provete injetado sem tubo (B2st)

Na figura 5.13 observa-se que tanto nas secções de topo como do meio, as posições ao centro mostram maior colmatção, uma vez que a dimensão dos poros dominantes (correspondente ao maior pico) deslocou-se para a esquerda. Este deslocamento resultou numa diminuição do tamanho dos poros de 45000 nm para 29000 nm no caso do topo, e 55000 nm para 40000 nm no meio.

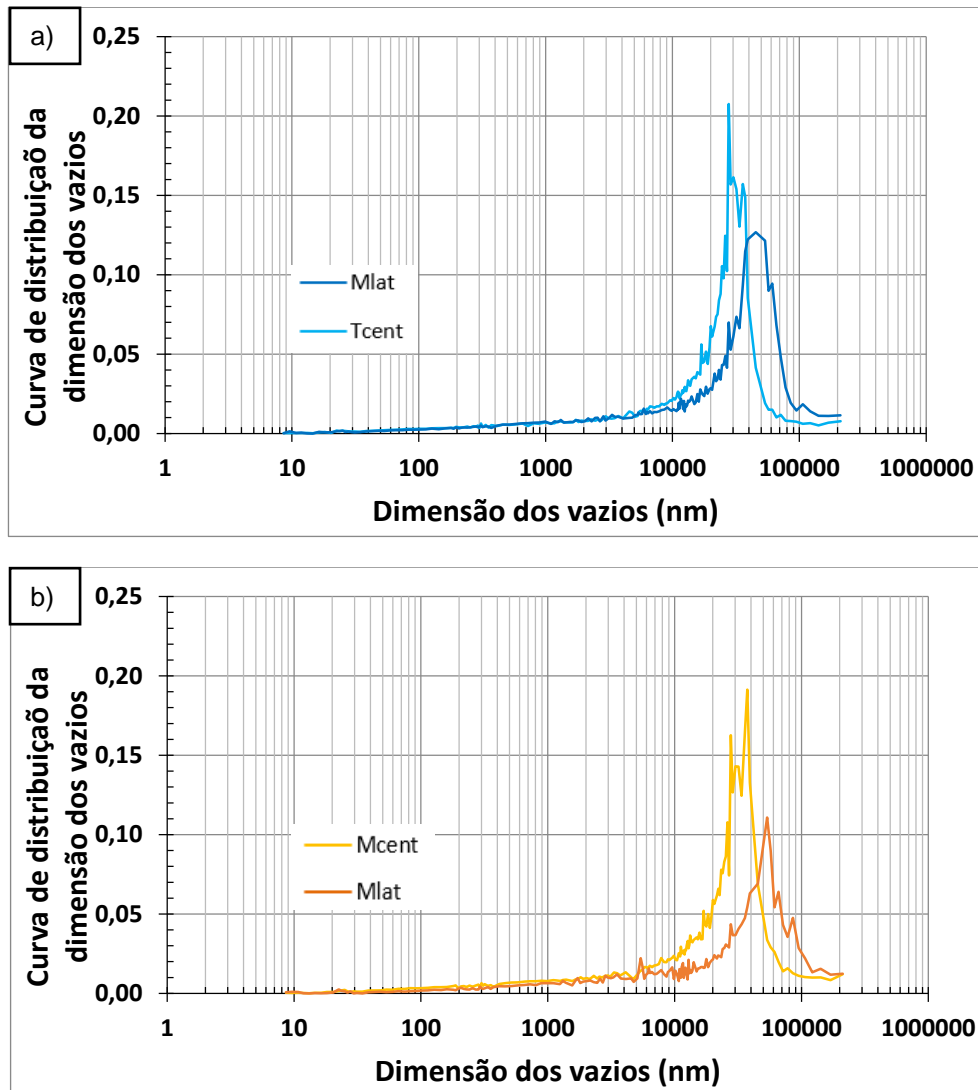


Figura 5.13 - Curva de distribuição dos vazios segundo a posição radial do provete B2st nas posições topo (a) e meio (b)

Longitudinalmente, existe uma clara sobreposição das curvas características do eixo central (Tcent e Mcent) revelando que as quantidades de biocimento tanto no topo como no meio são semelhantes (figura 5.14 – a)). No que respeita ao eixo lateral, apesar da curva de distribuição da secção do topo (Tlat) se situar ligeiramente mais para a esquerda (maior proporção de vazios com tamanhos menores), constata-se uma proximidade de picos com a secção do meio (Mlat), revelando colmatções semelhantes (45000 e 50000 nm) (figura 5.16 – b)).



Deste modo, a forma de injeção tipo coluna de infiltração permitiu obter provetes homogêneos longitudinalmente segundo cada eixo, embora radialmente se tenham registado maiores colmatagens nas posições centrais.

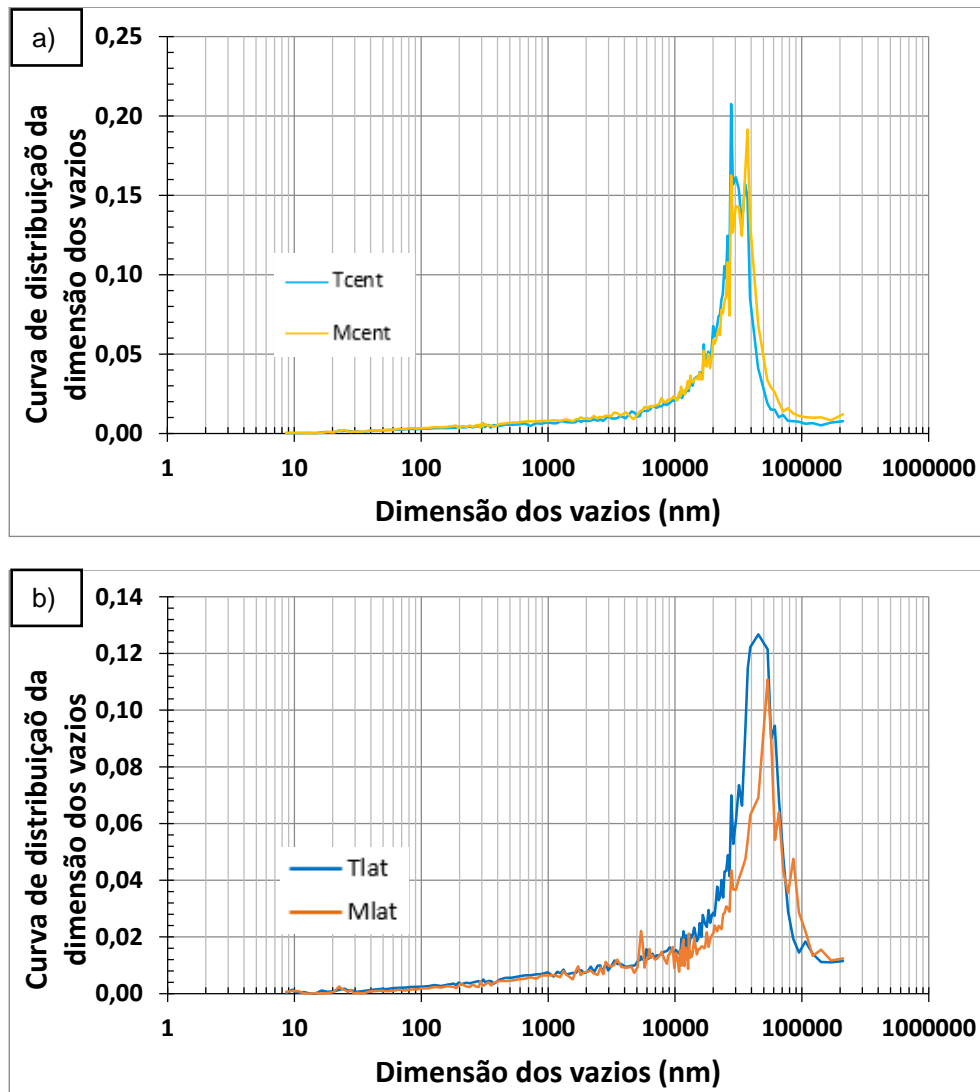
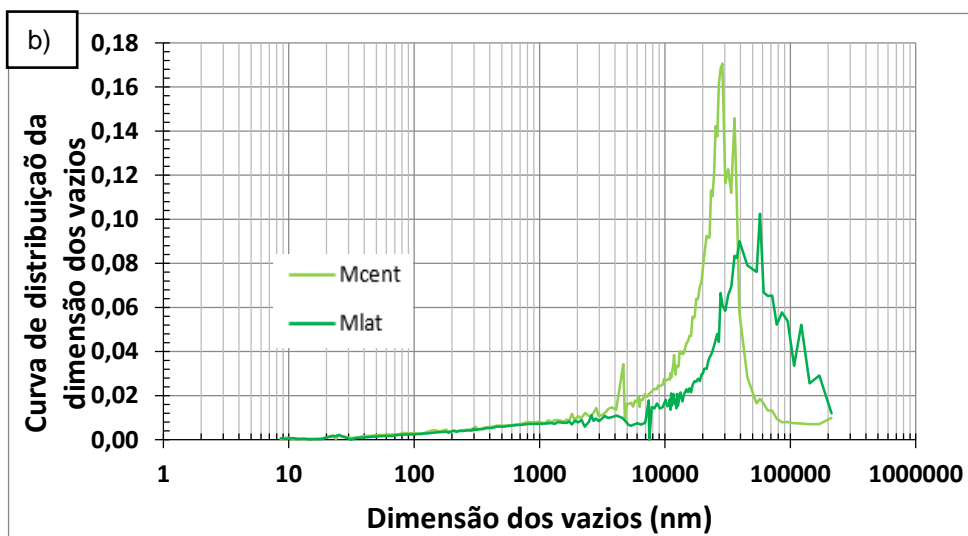
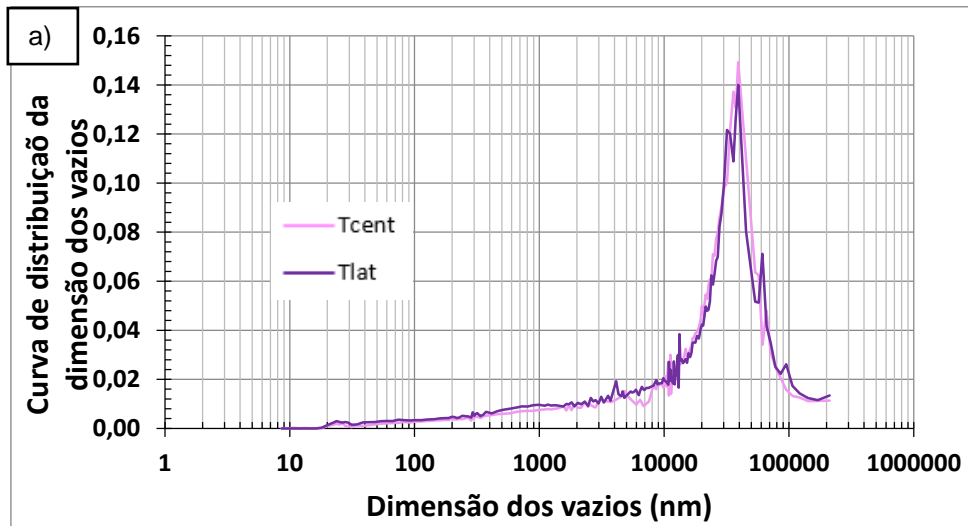


Figura 5.14 - Curva de distribuição dos vazios no provete B2st segundo eixo longitudinal a) central e b) lateral

Em relação aos ensaios de lixiviação, a maior colmatção no eixo central observada (30000 nm contra 45000nm) não está em acordo com a dedução de que o método de injeção tipo coluna de infiltração promove a precipitação junto às paredes da câmara (eixo lateral). Da mesma forma constata-se que a heterogeneidade marcada entre a secção do meio e do topo na coluna de infiltração B2st não é visível nos resultados teste MIP como foi nos ensaios de lixiviação.

### 5.3.2.2. Análise provete injetado com tubo (B2ct)

Na utilização de tubo, a sobreposição das curvas características no topo e base e dos picos (40000 nm em ambas as secções) comprovam a eficácia deste método de injeção em homogeneizar o tratamento radialmente (figura 5.15 - a) e c)). Já na secção do meio, a posição central encontra-se mais cimentada em relação à lateral (29000 nm e 60000 nm), devendo-se à ação do tubo como promotor de precipitação no eixo central como determinado nos ensaios de lixiviação (figura 5.15 - b))



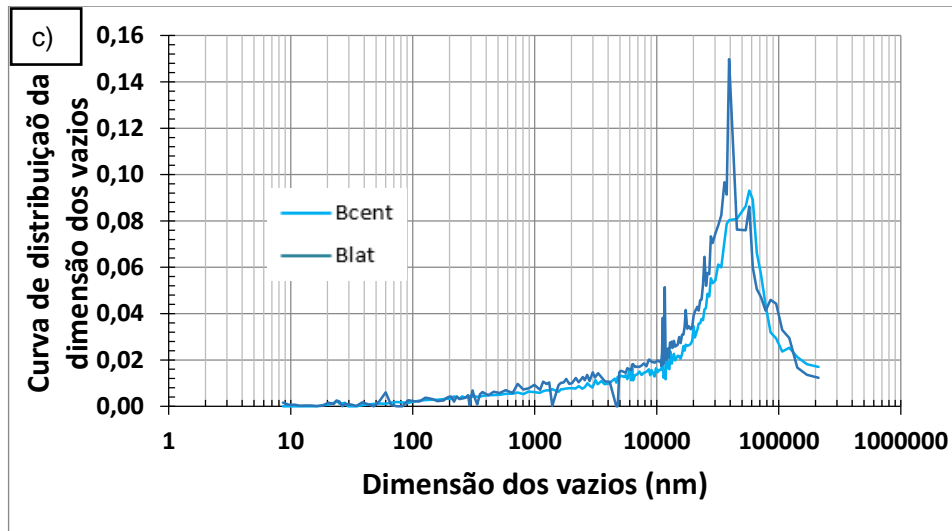
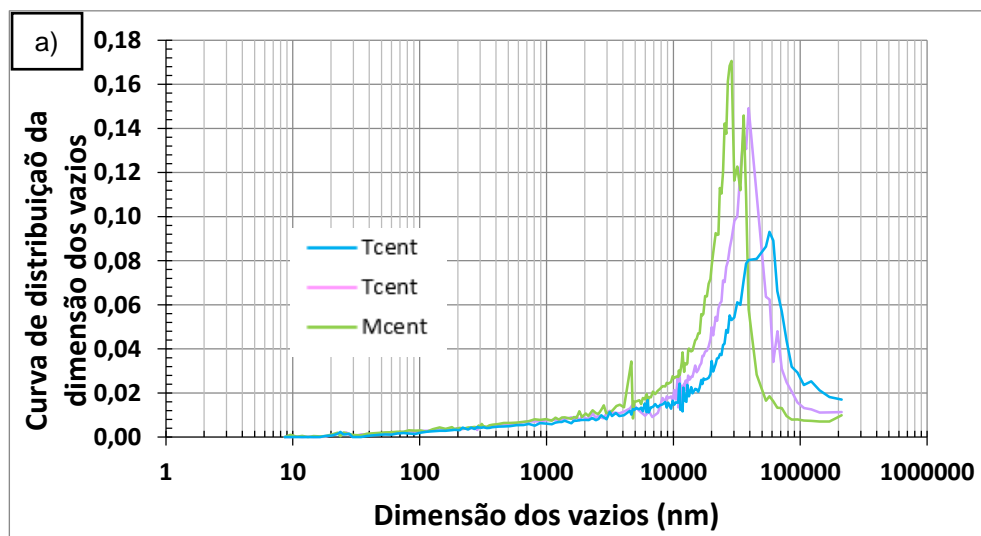


Figura 5.15 - Curva de distribuição dos vazios segundo a posição radial dos provetes B2st nas posições topo (a) e meio (b), e da B2ct na posição do meio (c)

No que respeita à distribuição de precipitado em altura, as diferenças de tamanho de vazios entre secções é mais notável ao centro do que lateralmente. Assim, no eixo central, constata-se que as secções superiores (topo e meio) encontram-se mais colmatadas (40000 nm e 29000 nm respetivamente) em relação à base (50000 nm) (figura 5.16 – a)). Por oposição, lateralmente, as diferenças em biocimento são menos notáveis, verificando-se uma sobreposição de picos no topo e base situado nos 40000 nm, mas igualmente das curvas características ao longo do seu desenvolvimento num seu todo (topo, meio e base) (figura 5.16 – b)).



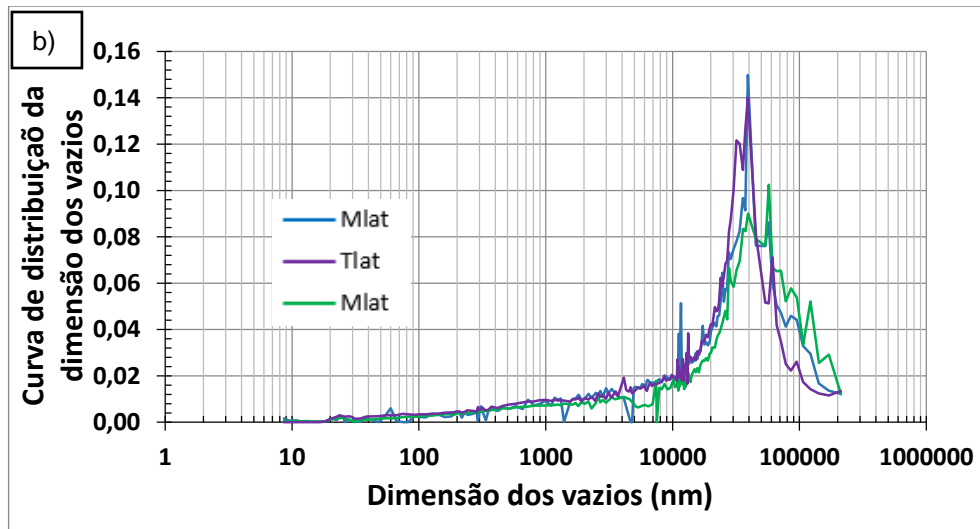


Figura 5.16 - Curva de distribuição dos vazios no provete B2ct segundo eixo longitudinal a) central e b) lateral

A utilização de tubo permitiu, portanto, obter provetes homogêneos ao longo do eixo lateral e mais colmatados nas suas secções superiores. Ao nível de cada secção (radialmente), a homogeneidade de tratamento foi alcançada no topo e na base, visualizando-se na secção do meio uma maior colmatação ao centro (Mcent) em relação à lateral (Mlat).

Em relação aos ensaios de lixiviação, os resultados MIP revelam-se, mais uma vez, contraditórios, pois a heterogeneidade radial observada na secção do meio (figura 5.15 - b)), ou as variações de colmatação entre meio e base no eixo central (figura 5.16 - a)) contrastam com os resultados homogêneos de lixiviação do provete B2ct. Todavia, certas semelhanças se manifestam, nomeadamente na predominância de precipitado nas secções superiores do provete ou a homogeneidade registada entre as posições radiais do topo e base.

### 5.3.2.3. Análise do efeito do tubo

Comparativamente, os resultados obtidos dos provetes B2st e B2ct não apresentam diferenças quanto ao tamanho de poro predominante nas posições radiais da secção do meio, já que existe sobreposição de picos (55000 nm para Mlat e 29000 nm para Mcent) (figura 5.19 - a) e b)) e das curvas no caso da posição central (figura 5.17 - a)).

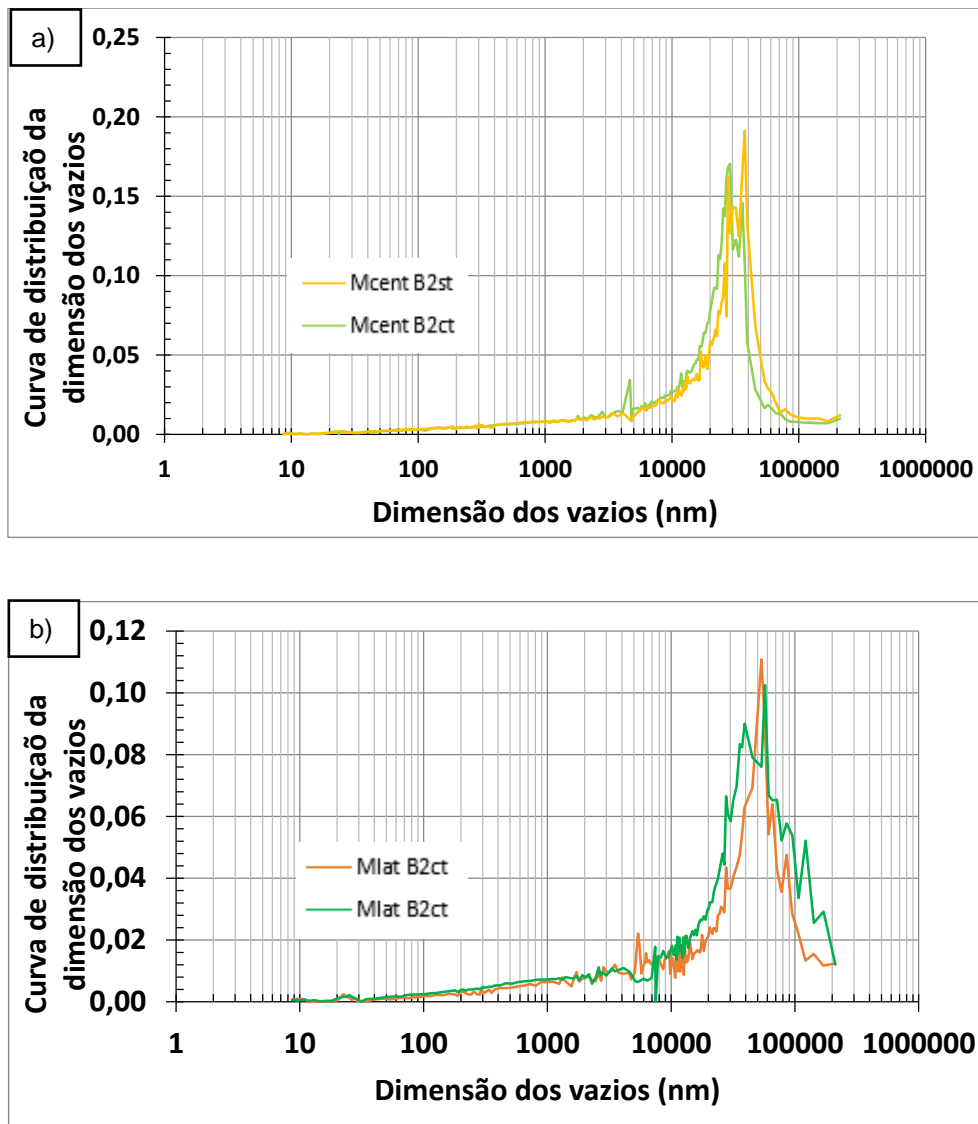


Figura 5.17 - Curva de distribuição dos vazios entre provete B2ct (verde) e B2st (cor amarelada) (segundo eixo longitudinal a) central e b) lateral

No topo, o provete com tubo B2ct mostra maior colmatção na lateral enquanto o homologado sem tubo B2st ao centro. Estas diferenças apesar de pouco acentuadas, são observáveis nas figuras 5.20 pela reduzida sobreposição de curvas e deslocamento dos picos para a esquerda.

Assim, os testes MIP mostram que ambos os métodos de injeção (com e sem tubo) produzem o mesmo grau de colmatção na secção do meio, coincidindo com a igualdade de teores de  $\text{CaCO}_3$  entre B2st e B2ct observadas nos ensaios de lixiviação (2,4% e 2,6%). Já na secção do topo, a maior colmatção constatada ao centro (Tcent) para o provete sem tubo B2st em comparação à B2ct (figura 5.18 – a)) e o inverso lateralmente (Tlat) (figura 5.18 – b)), contradiz a aptidão do método de injeção coluna de infiltração em favorecer a precipitação lateralmente e o do tubo em favorecer ao centro.

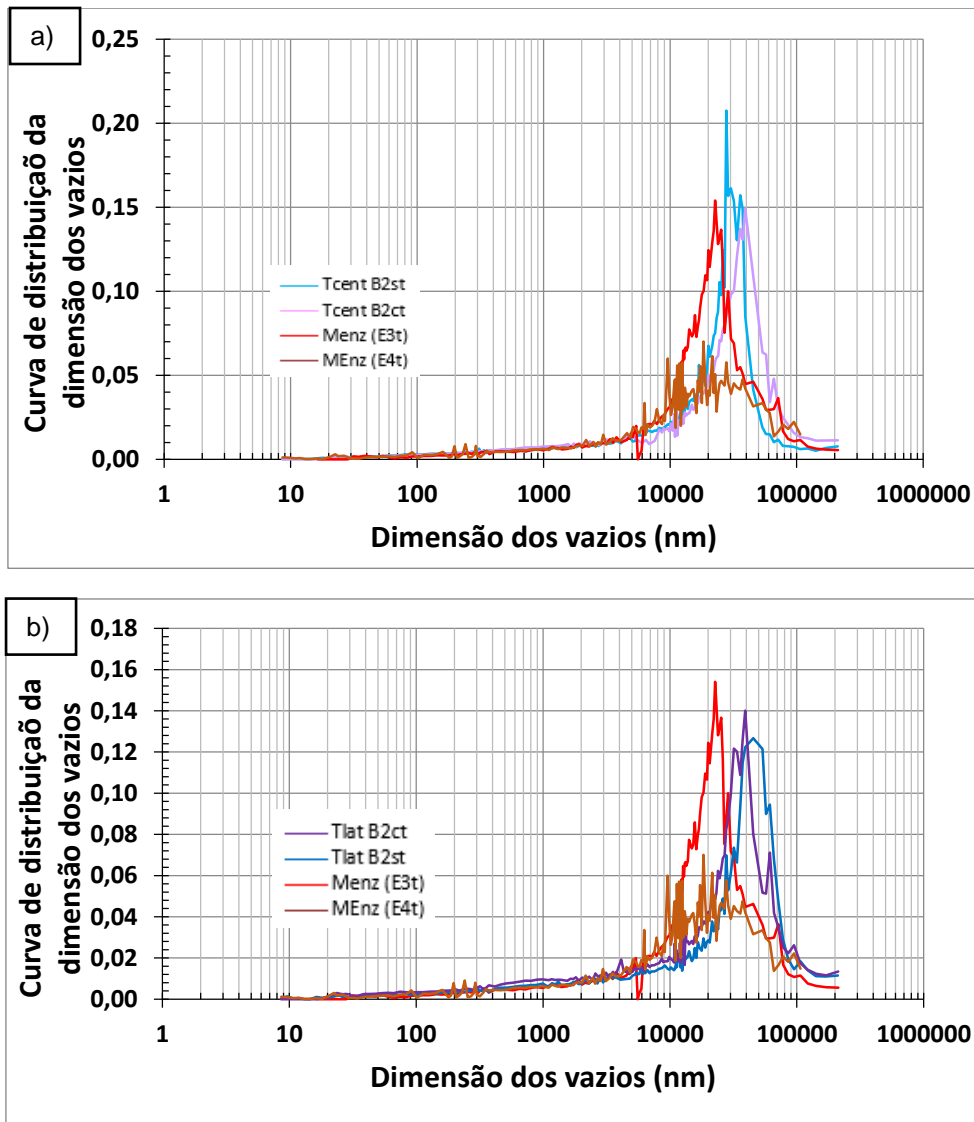


Figura 5.18 - Comparação das curvas de distribuição dos vazios entre provetes biocimentados com bactéria no topo na posição central (a) e lateral (b) e com enzimas

#### 5.3.2.4. Comparação com resultados dos provetes tratados com enzimas E3t e E4ct

É na comparação das curvas de distribuição das bactérias com as amostras retiradas dos provetes tratados com enzimas (E3t e E4t) que se notam maiores reduções no tamanho dos macroporos. Assim, verificam-se tamanhos de vazios dominantes na ordem dos 20000 nm contrastando com os picos mínimos de 29000 nm e máximos de 55000 nm, observados nos provetes B2st e B2ct (figura 5.18 - a) e b)).

Esta redução do tamanho dos vazios encontra-se em concordância com os elevados estados de cimentação dos provetes tratados com enzimas determinados nos ensaios de lixiviação.

### 5.3.2.5. Conclusão

Conclui-se que as curvas de distribuição determinadas pelos testes MIP não aparentam ser precisas o suficiente para ilustrar as diferenças do grau de cimentação entre as posições longitudinais e radiais e entre formas de injeção no caso das amostras com bactéria, uma vez que se está a lidar com intervalos de teores de  $\text{CaCO}_3$  reduzidos.

Para além desta observação, as diferenças de granulometria entre secções (adquiridas durante a preparação do solo e devido a alguma lavagem de finos durante o tratamento) podem ter alterado os resultados obtidos nos testes. Na figura 5.19, observa-se um exemplo deste fenómeno, sendo notável a presença de partículas mais grossas na secção da direita (secção da base) em relação à da esquerda (secção do meio). Alia-se a este facto o desconhecimento da precisão da evolução das curvas de distribuição associado ao equipamento e ao ensaio.

Finalmente, o reduzido volume das amostras testadas ( $1 \text{ cm}^3$ ) em comparação com o volume de cada secção e dos provetes ( $580 \text{ cm}^3$ ), mostram como existem problemas de representatividade neste teste.



Figura 5.19 - Amostra da base (esquerda) e da secção do meio (direita)

### 5.3.3 Distribuição de iões $\text{NH}_4^+$ pelo método Nessler

A determinação das concentrações molares de iões  $\text{NH}_4^+$  através da densidade ótica pelo método de Nessler, permitiu investigar a eficácia de hidrólise de ureia (ou precipitação) a diferentes níveis da altura dos provetes. Esta eficácia depende da atividade enzimática disponível em cada secção dos provetes (logo, concentração de bactérias), mas igualmente da capacidade de cada método de injeção estudado, em renovar a solução de alimento reagida com a não reagida a cada dia de injeção.

Os resultados aqui apresentados foram determinados a partir do efluente retirado ao segundo dia de injeção. Recordemos que os primeiros volumes de efluente saído (0 a 100 ml) correspondem aos primeiros volumes de alimento reagido próximo da saída (secções inferiores do provete – base e meio), em oposição aos últimos volumes (100-200 ml) que correspondem às secções superiores do provete (topo e meio).

A análise desta técnica será realizada analisando primeiro os provetes sem tubo (B2st e B3st), seguido dos com tubo (B2ct e B3ct), discutindo-se a correspondência destes resultados com os obtidos nos ensaios de lixiviação, testes MIP e UCS. Finalmente, será também abordada a eficácia dos métodos de injeção e preparação estudados na homogeneidade do tratamento.

#### 5.3.3.1. **Evolução geral das concentrações**

O comportamento das concentrações (ou das densidades óticas) com o volume saído é similar para todos os provetes:

- Assiste-se a uma subida inicial, quase linear, das concentrações nos primeiros volumes que se localizam junto ao *outlet* na base (0 aos 75 ml).
- As concentrações máximas são atingidas entre os 75 a 100 ml saídos, correspondendo à secção a meio dos provetes.
- Os volumes saídos no final (após os 100 e 125 ml), correspondendo às secções superiores da câmara (incluído o efluente do dreno do topo), demonstram uma redução constante nas concentrações de iões, para níveis inferiores aos valores iniciais.

#### 5.3.3.2. **Análise dos provetes sem tubo B2st (bactéria injetada) e B3st (bactéria pré-misturada)**

Olhando especificamente para os resultados dos provetes sem tubo (figura 5.20), constatamos que o provete injetado B2st detém as menores concentrações em iões ao longo da totalidade da sua altura, sendo o seu valor máximo 600 mM aos 75 ml. Este valor corresponde a uma eficácia química de hidrólise de ureia de 60% tendo em conta que para a concentração de 0,5 M de ureia injetados e disponíveis no alimento, gera-se um máximo de 1,0 M de amónio (ver Eq (1)).

Do lado oposto, o provete pré-misturado B3st demonstrou uma eficácia de hidrólise alcançando os 90% (ou 900 mM de  $\text{NH}_4^+$ ) para os 100 ml saídos. Adicionalmente, a comparação entre os dois provetes injetados sem tubo revela uma diferença constante ao longo da recolha do efluente superior de 250 mM, atingindo um máximo pontual de 500 mM aos 100 ml saídos (figura 5.20).



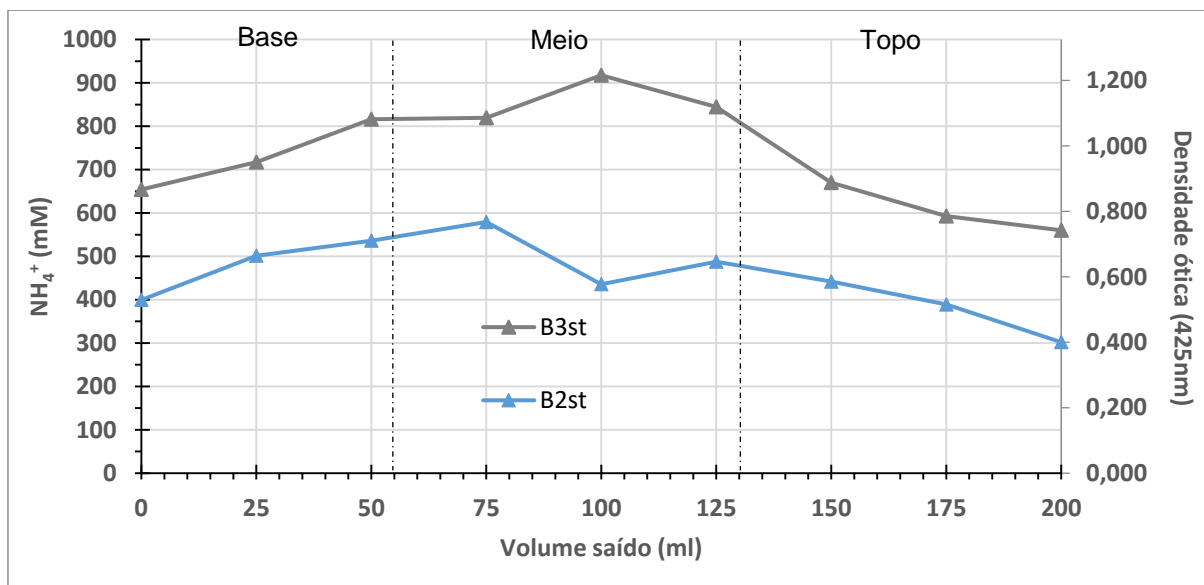


Figura 5.20 - Distribuição das concentrações em íons  $\text{NH}_4^+$  com volume efluente saído dos provetes sem tubo

Assim, o modo como as bactérias foram distribuídas pelo corpo dos provetes (pré-misturados ou injetados) aparenta ter tido um grande efeito na capacidade dos provetes em hidrolisar a ureia. Estes resultados estão concordantes com a maior resistência e teores de cimentação observados no provete pré-misturado B3st em relação ao injetado B2st.

Nos últimos volumes saídos observam-se quedas nas concentrações de 33% para o B3st (900 mM para 600 mM) e de 45% para o B2st (570 mM para 300 mM). Adicionalmente constata-se que os maiores teores de cimentação observados no topo do provete B2st nos ensaios de lixiviação não se traduziram em maiores concentrações nos volumes finais saídos. Este fenômeno pode estar relacionado com o efeito de diluição dos últimos volumes saídos com o alimento ainda não reagido, injetado no dia

### 5.3.3.3. Análise provetes com tubo B2ct (injetados) e B3ct (pré-misturados)

Quanto aos provetes com tubo B2ct e B3ct, constataram-se evoluções semelhantes das concentrações ao longo do comprimento, a divergência entre valores sendo inferior a 100 mM nos primeiros 175 ml saídos. As eficiências máximas alcançadas encontraram-se igualmente para ambos os casos, próximos, nos 78% e 88% (780 mM e 880 mM para os provetes B2ct e B3ct respectivamente) (figura 5.21).

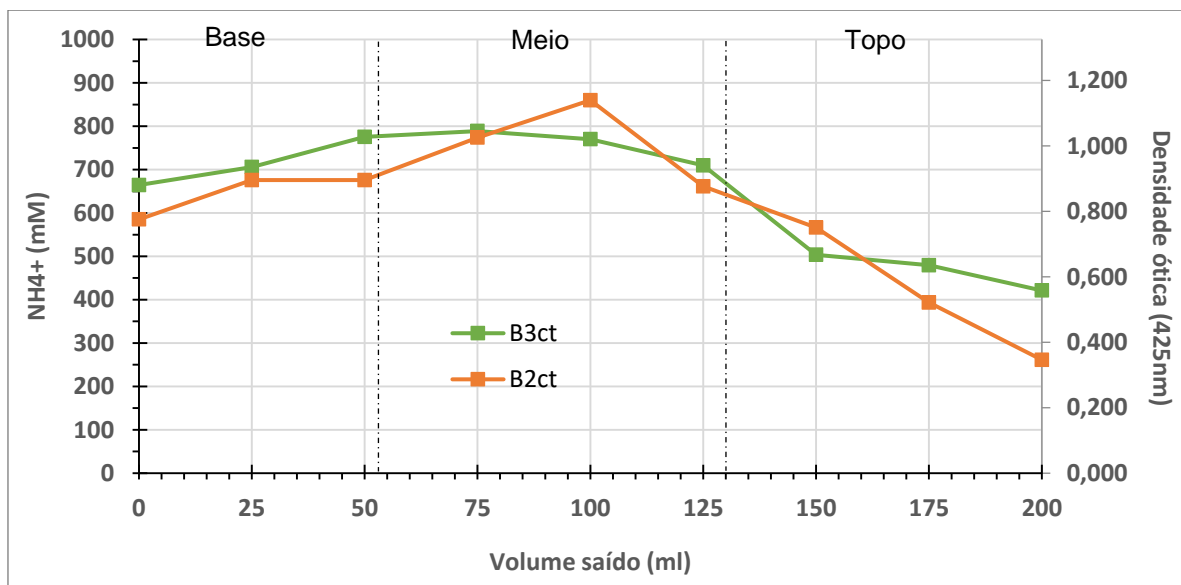


Figura 5.21 - Distribuição das concentrações em íons  $\text{NH}_4^+$  com volume efluente saído dos provetes com tubo

Nos últimos 100 ml saídos as quedas nas concentrações observadas para ambos os provetes são significantes, registando-se 70% para o B2ct (de 880 mM para um mínimo de 280 mM) e 50% para o B3ct (800 mM para 400 mM).

#### 5.3.3.4. Análise entre provetes segundo método de injeção e preparação

Os provetes pré-misturados apresentaram concentrações mais elevadas em relação às injetadas, comprovando a eficácia do método em criar provetes cimentados. Esta observação, em conjunto com os resultados dos ensaios de lixiviação reforçam a noção de que a distribuição homogénea das bactérias é essencial à obtenção de provetes com maiores graus de cimentação.

O método de injeção tipo coluna de infiltração e pré-mistura das bactérias, empregue no provete B3st, resultou numa melhor distribuição de concentrações em relação aos restantes provetes, entrando em conformidade com a melhor resistência UCS e maior grau de cimentação observado nas técnicas de monitorização.

Mais, não obstante a melhoria de concentrações notadas entre os provetes injetados B2st e B2ct devido à utilização de tubo, no caso dos pré-misturados (B3st e B3ct), este método de injeção não permitiu melhorar as concentrações (ver figura 5.21 e 5.22). Tal pode indicar que a utilização de tubo tem como benefício primário a distribuição homogénea de bactérias pelas secções (visto nos provetes injetados), constituindo, contudo, um entrave à renovação do alimento.

Alias, a dificuldade em renovar o alimento nos métodos de injeção com tubo é visível nas maiores diminuições das concentrações nos últimos volumes saídos nos provetes com tubo em relação aos tratados por coluna de infiltração (diminuições de 33% e 45% da concentração máxima dos provetes sem tubo contra 50% e 70% dos provetes com tubo).

Estas quedas das concentrações já tinham sido observadas num estudo semelhante de 2008 de Harkes *et al*, tendo sido atribuído à diluição do fluido cimentício já reagido com o novo fluido injetado nesse dia. Desta forma, e aplicando a mesma lógica às distribuições medidas, supõe-se que as concentrações nas secções de topo (125 a 200 ml) se encontram alteradas devido a diluições, sendo estas mais precoces e intensas nos provetes com tubo.

Finalmente, observa-se em todos provetes, distribuições crescentes em concentração de iões com volume saído (ver figuras 5.21 e 5.22), traduzindo-se em maiores quantidades de biocimento nas secções superiores dos provetes como observado nos ensaios de lixiviação e indicado nas figuras de rotura por esmagamento.

#### 5.3.3.5. Conclusão

No que se refere aos resultados quando à homogeneidade e estado de cimentação dos provetes, a técnica do reagente de Nessler permitiu concluir:

- A pré-mistura de bactérias foi essencial na obtenção dos provetes com maiores concentrações de amónio.
- O método de injeção coluna de infiltração de alimento e bactérias empregue no provete B2st revelou as menores concentrações máximas e constantes ao longo do comprimento, reforçando a importância da distribuição homogénea de bactérias para a obtenção de provetes homogéneos.
- A utilização de tubo nos provetes injetados permitiu obter concentrações similares aos do provete com tubo pré-misturado, associando-se à distribuição homogénea das bactérias graças ao tubo.
- Observa-se um aumento das concentrações quanto maior for a distância ao inlet (base) sendo esta máxima na secção do meio, voltando a diminuir após os 125 ml de efluente saído (correspondendo aos troços superiores dos provetes) devido a diluições do efluente com alimento não reagido.
- O efeito benéfico da introdução de tubo, na cimentação dos provetes, não foi visível nos provetes pré-misturados, associando-se à dificuldade de renovação do alimento em relação à forma de injeção tipo coluna de infiltração.

Finalmente, constatou-se boas correspondências entre resultados dos ensaios de lixiviação e UCS com os desta técnica.

## 5.4 Discussão sobre as formas de injeção e preparação do solo estudadas

### 5.4.1 Validação das técnicas de monitorização

Os ensaios realizados neste trabalho permitiram concluir sobre os métodos de injeção e preparação do solo na homogeneidade do tratamento. Contudo, a fiabilidade dos resultados obtidos dependeu em muito da representatividade das amostras retiradas dos provetes em certos ensaios, nomeadamente:

- Nos ensaios de lixiviação onde as amostras dissolvidas representaram entre 20% a 40% da massa (antes da lixiviação) de cada secção para a posição central, e 10% a 14% no caso da posição lateral.
- Nas porosimetrias MIP cujo reduzido volume das amostras (1,0 cm<sup>3</sup>) do volume total dos provetes de areia (580 cm<sup>3</sup>) não é suficiente para caracterizar a heterogeneidade dos provetes como visto pelos resultados contraditórios obtidos.
- Nas imagens captadas pelo microscópio SEM provêm de amostras cujos volumes não excederam os 1,0 cm<sup>3</sup>.

Consequentemente, os resultados obtidos dos ensaios resultaram essencialmente da qualidade da informação contida em cada amostra.

Observa-se, também, que a análise realizada neste trabalho está marcada por uma determinação pontual das características identificadas por cada ensaio, nomeadamente das colmatações pontuais pelos testes MIP e pela visualização dos padrões e cristais de precipitado nas imagens SEM. Em oposição, ensaios como de Nessler e de lixiviação providenciam resultados com valores médios das amostras recolhidas.

Outros erros associados aos resultados dos ensaios, podem estar ligados a imprecisões experimentais ou de equipamento, assim como do impacto de fatores externos não parametrizados neste trabalho, como:

- Na presença de humidade nas amostras MIP que impediram a apropriada intrusão do mercúrio para a quantificação dos tamanhos de vazios.
- No desconhecimento da precisão da evolução das curvas de distribuição características dos testes MIP fornecido pelo equipamento utilizado.
- Na interferência das substâncias químicas presentes no efluente (nomeadamente iões cloro), nas densidades óticas determinadas pelo espectrofotómetro (Jeong *et al.*, 2013). Todavia, se estes erros podem interferir nas concentrações absolutas de iões amónio determinadas, tal não invalida a análise relativa entre densidades óticas realizada entre provetes.

Não obstante, as análises resultante de amostras de controlo como no caso dos ensaios de lixiviação, e a repetição das leituras no caso do método de Nessler (ver secção 3.4.2), permitiram aferir a variabilidade dos resultados e reduzir possíveis erros experimentais. Deste primeiro, referem-se os

resultados de lixiviação em areia não tratada cujos teores de  $\text{CaCO}_3$  (ou erros) determinados ficaram abaixo dos 0,19%.

#### 5.4.2 Efeito da pré-mistura e utilização de tubo

As figuras de rotura mostraram uma transição de rotura por esmagamento, observado nos provetes injetados, para uma rotura frágil por corte nos pré-misturados. Esta transição traduziu-se em melhores resistências e rigidezes por parte destes últimos (150 kPa do B3st contra 100 kPa e 120 kPa dos provetes B2st e B2ct respetivamente) e é explicado pelas formas de distribuição do precipitado nos provetes consoante a forma de injeção e preparação do solo.

De facto, resultados das técnicas de monitorização da homogeneidade do tratamento revelam distribuições de precipitado decrescentes com a distância ao *inlet* (topo) nos provetes injetados, sendo a secção da base a menos cimentada. Esta redução em altura é visível nos ensaios de lixiviação, com a redução dos teores de  $\text{CaCO}_3$ , tanto ao centro como lateralmente, (figura 5.22 – símbolos verdes).

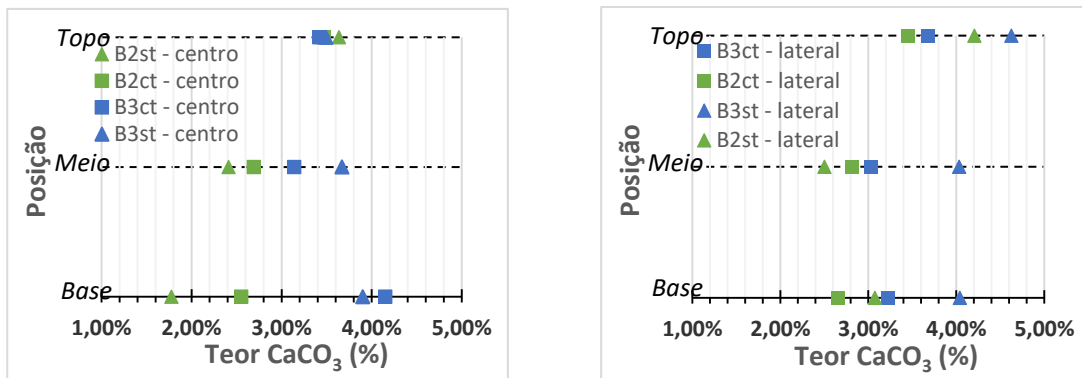


Figura 5.22 – Distribuição dos teores de carbonato de cálcio dos provetes injetados e pré-misturados segundo o eixo central (esquerda) e lateral (direita)

A mesma tendência é constatada nos testes de porosimetria MIP, com a visualização de tamanhos dominantes de vazios (picos) de maiores dimensões junto à base em relação ao topo, visível na figura 5.23. Do mesmo modo, determinou-se no método de Nessler valores crescentes de amónio nos primeiros volumes saídos de efluente, correspondendo às secções junto à base e meio do provete.

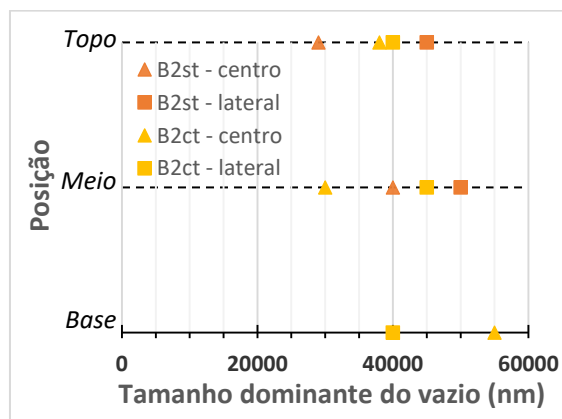


Figura 5.23 - Distribuição dos tamanhos dos vazios dominantes (nm) determinados nas porosimetrias MIP ao longo da altura dos provetes injetados

A diminuição da precipitação com a distância ao *inlet* encontra-se conforme os resultados de Neupane *et al* (2013) (figura 5.24 - esquerda), e Yasuhara *et al* (2012) (figura 5.24 - direita) em ensaios tipo injeção através de tubo não perfurado e coluna de infiltração, em que se observou diminuição dos teores em calcite e aumento da porosidade com a distância ao inlet.

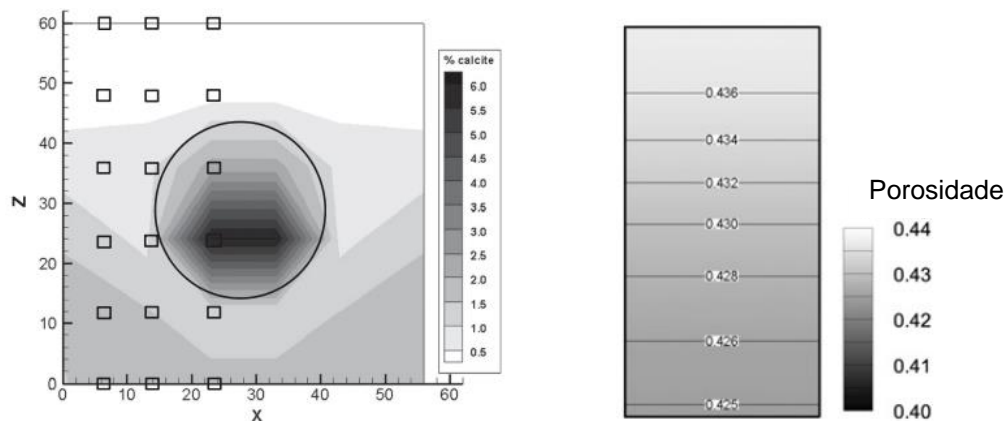


Figura 5.24 - Distribuição da calcite em coluna tratada com tubo (esquerda) Neupane *et al* (2013), e da porosidade em provete injetado como coluna de infiltração direção ascendente (direita) Yasuhara *et al* (2012)

Já em relação aos provetes pré-misturados, a transição para uma rotura por corte é justificado pela homogeneização dos teores de  $\text{CaCO}_3$  em altura, explicado pela homogeneização da distribuição das bactérias pelo solo devido ao tratamento aplicado, mas igualmente pelos melhores graus de cimentação médios (3,4% e 4,1% contra 3,0% e 3,1% dos injetados). Se é verdade que estes maiores teores estão conforme às maiores concentrações de amónio determinadas pelo método de Nessler, também é verdade que os aumentos iniciais das concentrações indicam uma menor precipitação de carbonato de cálcio junto à base contrastando com os resultados de homogeneidade dos ensaios de lixiviação.

Não obstante, os benefícios da pré-mistura de bactérias na homogeneidade e grau de cimentação dos provetes, e conseqüentemente no comportamento mecânico, favorecem a sua utilização em relação ao método de injeção.

O provete sem tubo B2st apresentou acentuada heterogeneidade ao longo do seu comprimento (intervalo de teores variando dos 1,8% a 4,2%) assim como a maior variação radialmente (1,2%) junto à base. Adicionam-se outras observações como menor colmatação dos poros junto à base em relação ao topo (tendo em conta que as amostras retiradas junto à base não resistiram aos testes MIP por falta de coesão), e elevada diferença nas densidades óticas em relação aos restantes métodos de injeção (chegando às 500 mM).

Em contrapartida, o provete homólogo com tubo B2ct apresentou melhores indícios de homogeneidade longitudinal (com diferença entre base e topo fixando-se abaixo dos 0,8%), e radiais (ausência de diferenças de cimentação em todas as secções), assim como de concentrações de  $\text{NH}_4^+$  alcançando uma divergência máxima de 400 mM nos 100 ml saídos (figura 5.25).

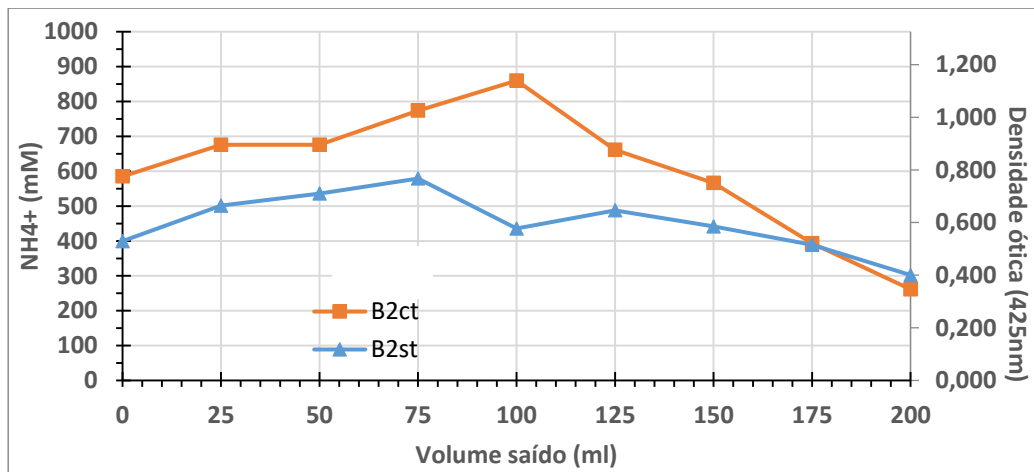


Figura 5.25 - Distribuição das concentrações em iões  $\text{NH}_4^+$  com volume efluente saído dos provetes injetados

A distinção dos resultados de homogeneidade do tratamento, obtidos entre os dois provetes (B2st e B2ct) é clara traduzindo-se, além do mais, num acréscimo de 20% da resistência de pico UCS para o provete com tubo (100 para 120 kPa). Contudo, se a utilização de tubo permitiu melhorar o tratamento de biocimentação nos provetes injetados, no caso dos pré-misturados (B3s e B3ct) o oposto ocorre.

Assim, tanto o método de Nessler como os de lixiviação apresentaram maiores níveis de precipitação na coluna de infiltração B3st em relação ao com tubo B3ct. Tal é visível pelos valores continuamente superiores nas leituras de concentrações de iões amónio (diferença atingindo os 200 mM) (figura 5.26), ou no grau médio de cimentação dos provetes (4,1% do B3st contra 3,4% do B3ct). O mesmo acontece nas resistências UCS (150 kPa contra 60 kPa). Apesar da interferência do tubo no ensaio UCS do provete B3ct (e assim na resistência de pico), é evidente pela trajetória tomada pelas deformações-tensões dos provetes (antes de surgir a interferência do tubo), que as rigidezes entre B3ct e provetes injetados (menos cimentados) são semelhantes e contrastam com o do B3st.

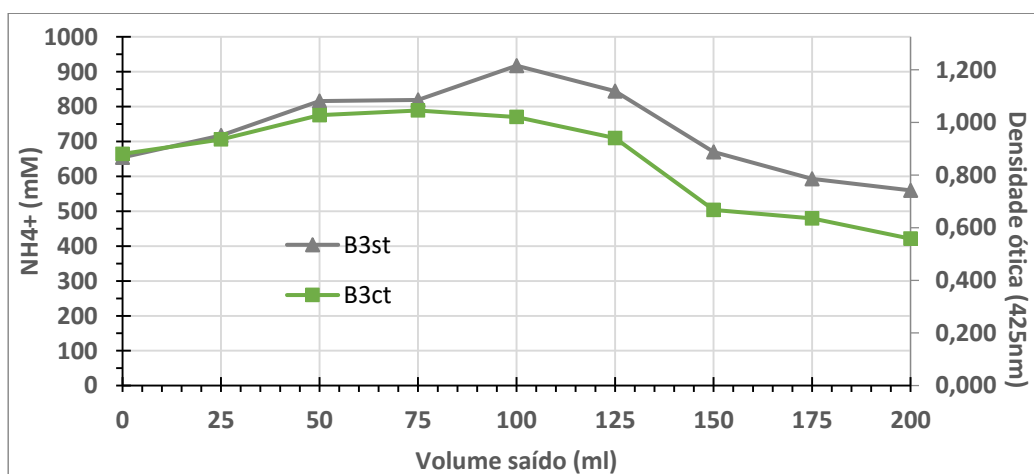


Figura 5.26 - Distribuição das concentrações em iões  $\text{NH}_4^+$  com volume efluente saído dos provetes pré-misturados

Esta diferença nos benefícios da utilização do tubo entre provetes injetados e pré-misturados é justificado pelo facto de nos provetes injetados, o tubo ter a função acrescida de homogeneizar a distribuição de bactérias pelo solo. Quanto à função, esperada inicialmente, de promoção da irrigação das secções inferiores que se encontram mais afastadas do *inlet com alimento*, as diminuições de concentrações de amónio (fruto de diluições) mais acentuadas nos provetes com tubo em relação aos provetes injetados tipo coluna de infiltração (33% e 45% contra 50% e 70% respetivamente) revelam fenómenos que dificultam a renovação do alimento na utilização de tubo.

Uma das razões que pode ter levado a tal fenómeno foi a alteração de regime de escoamento imposto pela introdução de tubo, como um acréscimo de perturbações, devido à modificação das linhas de fluxo unidireccionais típicas de coluna de infiltração (figura 5.27 - direita) para linhas de fluxo bidireccionais (figura 5.27 - esquerda). Este escoamento com linhas de fluxo unidireccionais só se estabeleceu graças à utilização de dreno junto à entrada e saída da câmara.

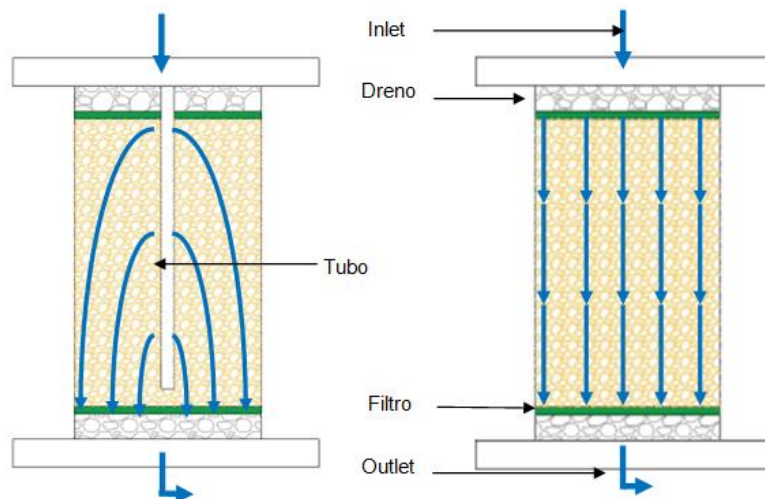


Figura 5.27 - Esquema do regime de escoamento esperado nos provetes com tubo (esquerda) e coluna da infiltração (direita)

A utilização de tubo permite obter provetes mais homogéneos e resistentes devido à homogeneização da distribuição das bactérias (ou enzimas), sendo desejável, contudo a pré-mistura das bactérias no solo (caso seja possível) em conjunto com uma injeção da solução de alimento tipo coluna de infiltração para promover a renovação de alimento.



## 6 Conclusões e Desenvolvimentos futuros

### 6.1 Conclusões

A câmara de inoculação desenvolvida mostrou ser apta para a aplicação do tratamento de biocimentação em provetes de areia com dimensões 7,2 x 12,0 cm. As condições de injeção utilizadas como o caudal, intervalo entre injeções de 24h ou concentrações de reagentes revelaram ser adequadas para a promoção da biocimentação dos provetes. O equipamento permitiu igualmente ensaiar a injeção de alimento e agentes hidrolisadores sob a forma de coluna de infiltração e através de um tubo interior perfurado, simulando diferentes condições de injeção possíveis em campo. No entanto, a finalização do tratamento com recurso a tubo foi limitada pela sua eventual colmatção com precipitado.

As análises de raios X, em conjunto com imagens de microscópio SEM confirmaram a presença de precipitado de carbonato de cálcio sob a forma do mineral de calcite.

A avaliação do estado de cimentação dos provetes e da homogeneidade do tratamento foi efetuada com recurso a técnicas de monitorização em amostras retiradas para diferentes posições radiais e longitudinais dos provetes. Os ensaios de porosimetria (MIP) permitiram a comparação do estado de colmatção dos vazios pelo precipitado ao longo dos eixos centrais e laterais dos provetes injetados. Os ensaios de lixiviação possibilitaram a determinação dos conteúdos em  $\text{CaCO}_3$  considerando amostras retiradas de zonas idênticas em todos os provetes. O método colorimétrico de Nessler para a discretização das concentrações em iões amónio foi utilizado como indicador da distribuição do precipitado ao longo do comprimento dos provetes.

A realização de ensaios à compressão não confinada (UCS) permitiram comparar os ganhos em resistência e rigidez dos provetes segundo o método de tratamento aplicado. A diferenciação das formas de rotura durante os ensaios (corte ou por esmagamento) e a confirmação das secções menos cimentadas foi realizada a partir da visualização das figuras de rotura.

Do conjunto dos resultados concluiu-se que a distribuição homogénea dos agentes hidrolisadores, conseguida através da pré-mistura, possibilitou a obtenção de provetes com maior grau de cimentação e mais homogéneos quando comparado com os provetes injetados. Para os provetes injetados, a utilização de tubo permitiu uma redução notável da heterogeneidade ao longo do comprimento e radialmente, tendo sido associado à melhoria na distribuição das bactérias pelo provete. No caso dos provetes pré-misturados este mesmo efeito não foi observado, tendo-se associado à dificuldade em renovar a solução de alimento reagida devido ao regime de escoamento imposto pelo tubo.

Finalmente, de todas as técnicas consideradas foi possível definir uma metodologia de tratamento eficiente, consistindo em usar o esquema de coluna de infiltração em provetes preparados com solo pré-misturado com bactérias. Esta metodologia é válida para ensaios laboratoriais.

## 6.2 Estudos futuros

No que respeita ao desenvolvimento da câmara de inoculação para aplicação da biocimentação, o procedimento que incluiu a realização de injeções através do tubo interior mostrou necessitar melhorias por não ter sido possível a conclusão do número de injeções planeadas inicialmente. A fim de se evitar a obstrução do tubo, sugere-se que sejam ensaiados, em novos provetes, as seguintes alterações:

- Aumento do diâmetro do tubo e dos seus furos para uma mais fácil circulação do fluido e possibilitar a formação de precipitado no seu exterior.
- Injeção de um volume reduzido de água destilada no final de cada dia de injeção, substituindo o alimento no interior do tubo e no seu mais imediato redor, com o intuito de impedir a formação de precipitado.

Outros estudos futuros poderão apoiar-se na variação das condições de injeção e na sucessiva caracterização dos seus efeitos na distribuição do precipitado pelos provetes, nomeadamente:

- Em ensaios com crescentes velocidades de escoamento: Como foi observado por Whiffin *et al* (2007), para escoamentos muito reduzidos a precipitação ocorre ainda durante a fase de injeção levando a que zonas mais próximas do inlet tenham maior teor em  $\text{CaCO}_3$ . Em contrapartida, escoamentos demasiado elevados podem levar a menores graus de cimentação finais visto as menores taxas de retenção de bactérias no solo (expulsas no efluente) (Harkes *et al.*, 2010).
- Pela introdução de um novo método de injeção consistindo na alternância da entrada de alimento utilizada a cada dia de injeção, entre topo e base, sendo esperado melhorias na homogeneidade do tratamento uma vez que se diminuiriam as distâncias de tratamento.

No que se refere ao uso da enzima urease em pó, um estudo comparativo poderá ser estabelecido com este trabalho, ao se reproduzirem os mesmos métodos de tratamento ensaiados com bactérias. Um especial enfoque poderá ser dado ao comportamento mecânico dos provetes uma vez que as extremas heterogeneidades de precipitado esperadas (e já observadas neste trabalho), poderão levar a resistências muito diferentes entre métodos de tratamento.

Finalmente, a câmara de inoculação desenvolvida permitirá o estudo da aplicação da biocimentação usando soluções alternativas de agentes biológicos hidrolisadores. Exemplifica-se o uso de bactéria liofilizada (desidratada) já existente no laboratório de Bioengenharia do IST, cujo estado desidratado simplifica o seu armazenamento e transporte, podendo tornar a sua utilização mais competitiva, embora a sua eficiência hidrolisadora esteja ainda pouco documentada.

## Referências Bibliográficas

Bavaye, P. & Vandevivere, P. (1992). Relationship between transport of bacteria and their clogging efficiency in sand columns. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 2523–2530.

Cardoso, R., Pires, I., Duarte, S.O.D. & Monteiro, G.A. (2018). Effects of clay's chemical interactions on biocementation. *Applied Clay Science*, **156**, 96–103.

Carmona, J.P.S.F., Oliveira, P.J.V. & Lemos, L.J.L. (2016). Biostabilization of a Sandy Soil Using Enzymatic Calcium Carbonate Precipitation. *Procedia Engineering*, **143**, 1301–1308.

Castanier, S., Métayer-Levrel, G. Le & Perthuisot, J.P. (1999). Ca-carbonates precipitation and limestone genesis - the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, **126**, 9–23.

Chou, C.-W., Seagren, E.A., Aydilek, A.H. & Lai, M. (2011). Biocalcification of Sand through Ureolysis. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, **137**, 1179–1189.

DeJong, J.T., Fritzges, M.B. & Nüsslein, K. (2006). Microbially Induced Cementation to Control Sand Response to Undrained Shear. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, **132**, 1381–1392.

Gannon, J., Tan, Y., Baveye, P. & Alexander, M. (1991). Effect of sodium chloride on transport of bacteria in a saturated aquifer material. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 2497–2501.

Gollapudi, U.K., Knutson, C.L., Bang, S.S. & R., I.M. (1995). A New Method for Controlling Leaching through Permeable Channels. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering ASCE*, **120**, 259.

Gomez, M.G., Martinez, B.C., DeJong, J.T., Hunt, C.E., deVlaming, L.A., Major, D.W. & Dworatzek, S.M. (2015). Field-scale bio-cementation tests to improve sands. *Proceedings of the Institution of Civil Engineers - Ground Improvement*, **168**, 206–216.

Hammes, F. & Verstraete, W. (2002). Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Re/Views in Environmental Science and Bio/Technology*, 3–7.

Harkes, M.P., Paassen, L.A. van, Booster, J.L., Whiffin, V.S. & Loosdrecht, M.C.M. van. (2010). Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement. *Ecological Engineering*, **36**, 112–117.

Mitchell, J.K. & Santamarina, J.C. (2005). Biological Considerations in Geotechnical Engineering. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, **131**, 1222–1233.

Nemati, M., Greene, E.A. & Voordouw, G. (2005). Permeability profile modification using bacterially formed calcium carbonate: Comparison with enzymic option. *Process Biochemistry*, **40**, 925–933.

Nemati, M. & Voordouw, G. (2003). Modification of porous media permeability, using calcium carbonate produced enzymatically in situ. *Enzyme and Microbial Technology*, **33**, 635–642.

Neupane, D., Yasuhara, H., Kinoshita, N. & Unno, T. (2013). Applicability of Enzymatic Calcium Carbonate Precipitation as a Soil-Strengthening Technique. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, **139**, 2201–2211.

Oliveira, P.J.V., Costa, M.S., Costa, J.N.P. & Nobre, M.F. (2013). Comparison of the Ability of Two Bacteria to Improve the Behavior of Sandy Soil. *Materials in Civil Engineering*, **27**, 1–5.

Paassen, L.A. van, Ghose, R., Linden, T.J.M. van der, Star, W.R.L. van der & Loosdrecht, M.C.M. van. (2010). Quantifying Biomediated Ground Improvement by Ureolysis: Large-Scale BiogROUT Experiment. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, **136**, 1721–1728.

Paassen, L.A. Van, Harkes, M.P., Zwieter, G.A. Van, Zon, W.H. Van Der, Star, W.R.L. Van Der & Loosdrecht, M.C.M. Van. (2009). Scale up of BioGrout: A biological ground reinforcement method. *Proceedings of the 17th International Conference on Soil Mechanics and Geotechnical Engineering: The Academia and Practice of Geotechnical Engineering*, **3**, 2328–2333.

Pedrazzini, F., Tarsitano, R. & Nannipieri, P. (1987). The effect of phenyl phosphorodiamidate on urease activity and ammonia volatilization in flooded rice. *Biology and Fertility of Soils*, **3**, 183–188.

Phadnis, H.S. & Santamarina, J.C. (2011). Bacteria in sediments: pore size effects. *Géotechnique Letters*, **1**, 91–93.

Qabany, A. Al & Soga, K. (2013). Effect of chemical treatment used in MICP on engineering properties of cemented soils. *Géotechnique*, **63**, 331–339.

Qabany, A. Al, Soga, K. & Santamarina, C. (2012). Factors Affecting Efficiency of Microbially Induced Calcite Precipitation. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, **138**, 992–1001.

Sahrawat, K.L. & Patancheru, P.O. (1984). Effects of temperature and moisture on urease activity in semi-arid tropical soils. *Plant and Soil*, **8**, 401–408.

Stocks-Fischer, S., Galinat, J.K. & Bang, S.S. (1999). Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**, 1563–1771.

Wei-Soon, N., Lee, L.M. & Siew-Ling, H. (2012). An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **62**, 723–729.

Wei, S., Fang, N., Cui, H., He, H., Jiang, Z. & Hao, L. (2015). Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments. *Brazilian Journal of Microbiology*, **46**, 455–464.

Whiffin, V.S. (2004). Microbial CaCO<sub>3</sub> Precipitation for the Production of Biocement. PhD thesis, *Murdoch University*, 1–162.

Whiffin, V.S., Paassen, L.A. van & Harkes, M.P. (2007). Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiology Journal*, **24**, 417–423.

Whitaker, J.M., Vanapalli, S. & Fortin, D. (2018). Improving the strength of sandy soils via ureolytic CaCO<sub>3</sub> solidification by *Sporosarcina ureae*. *Biogeosciences*, **15**, 4367–4380.

Yasuhara, H., Neupane, D., Hayashi, K. & Okamura, M. (2012). Experiments and predictions of physical properties of sand cemented by enzymatically-induced carbonate precipitation. *Soils and Foundations*, **52**, 539–549.

Zhong, L. & Islam, M.R. (1995). A New Microbial Plugging Process and Its Impact on Fracture Remediation. *70th Annual Technical Conference and Exhibition of The Society of Petroleum Engineers*, 703–715.

*(página deixada em branco intencionalmente)*

## Anexos:

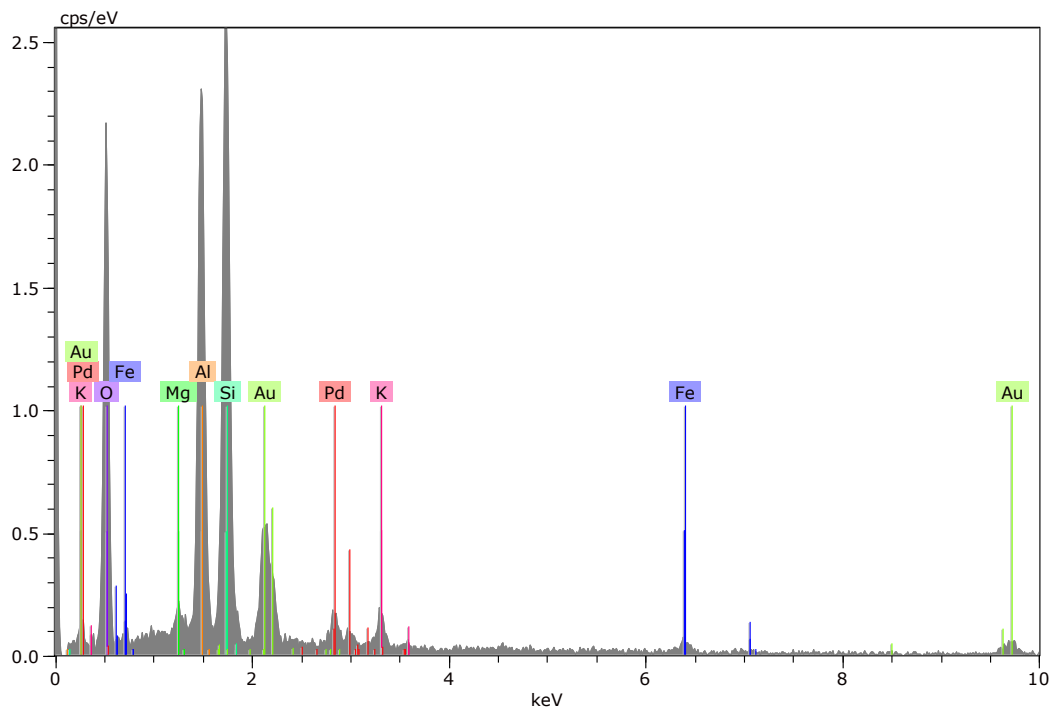
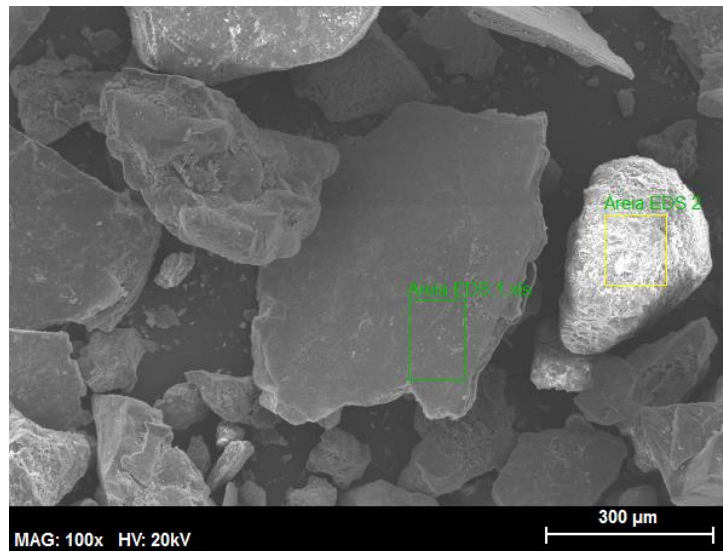
### Anexo 1: Imagens SEM e correspondentes análises EDS

---

Elementos químicos identificados nas análises EDS e correspondentes símbolos:

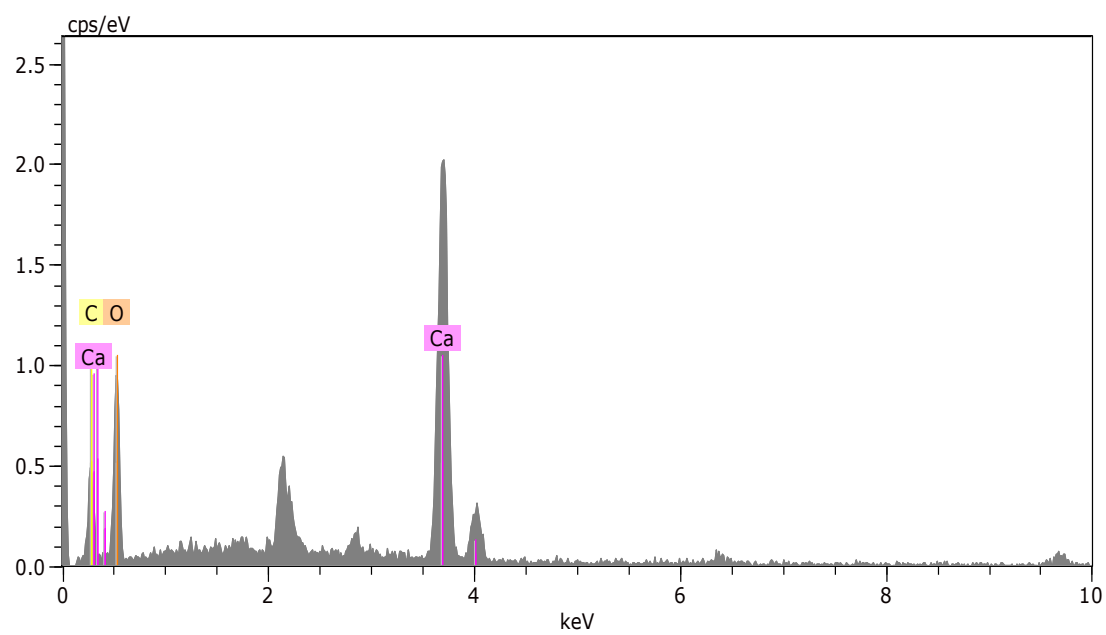
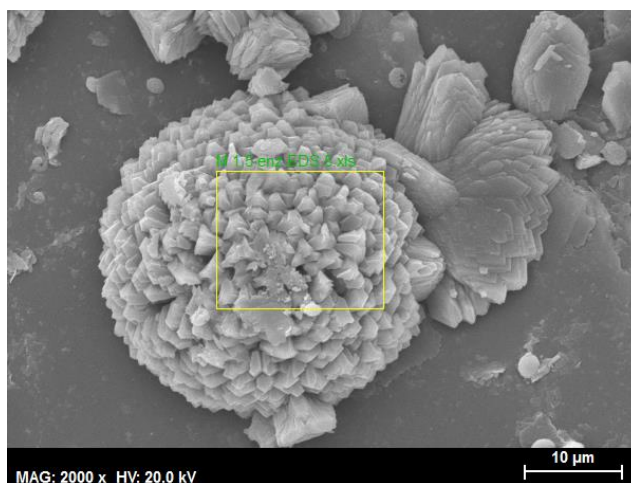
Observação	Elemento	Símbolo
<b>Areia</b>	Magnésio	Mg
	Alumínio	Al
	Potássio	K
	Silício	Si
	Ferro	Fe
<b>Precipitado/Reagentes</b>	Oxigénio	O
	Cálcio	Ca
	Cloro	Cl
<b>Tratamento para visualização SEM</b>	Ouro	Ag
	Platina	Pd

**Areia não tratada (branco) – EDS 1**

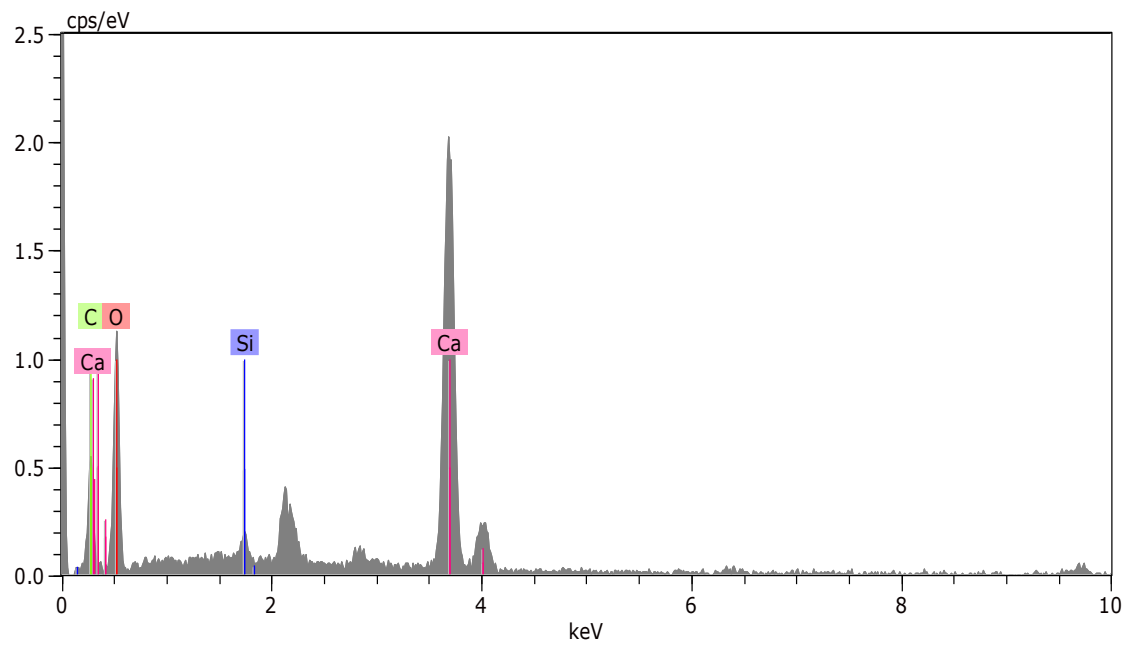
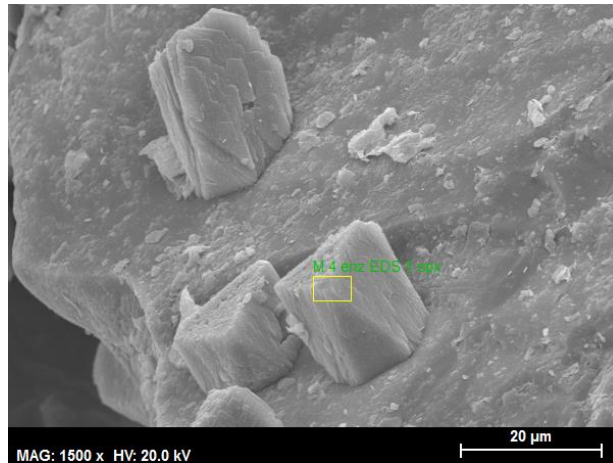




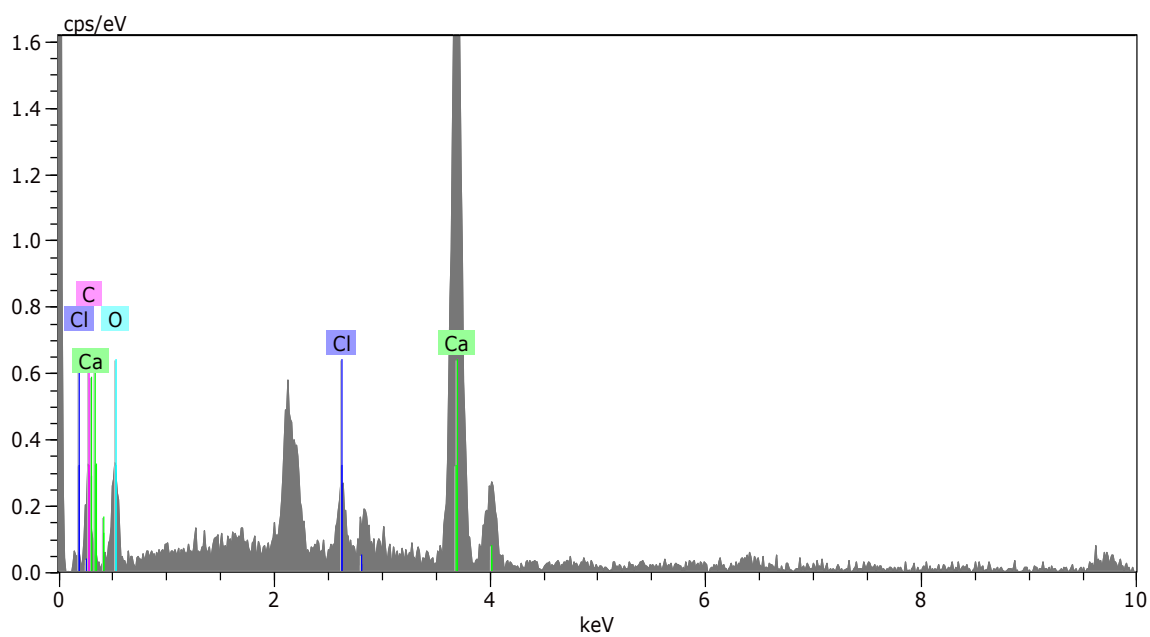
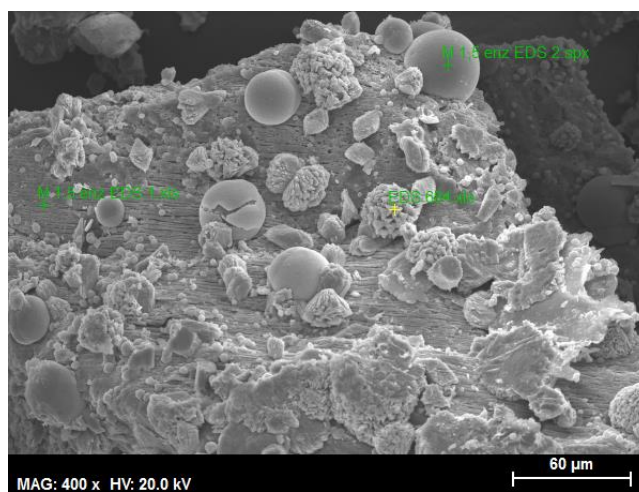
**Calcite sob forma cristalina roseta, (amostra enzima E3ct) – EDS 5**



**Calcite sob a forma cúbica, (amostra enzima E3ct) – EDS 1**



**Calcite sob a forma amorfa (esférica) (amostra enzima E3ct) – EDS 2**



## Anexo 2: Comportamento difractário e identificação dos minerais que compõe o provete B2ct

