

**Bio-cimentação em Solos Arenosos: Efeito do Tempo  
de Tratamento na Compressibilidade e na Quantidade  
de Bio-cimento Produzido**

**Maria Carolina da Silva Damas Pinto**

Dissertação para a obtenção de grau de Mestre em

**Engenharia Civil**

Orientadora:

Professora Doutora Maria Rafaela Pinheiro Cardoso

**Júri**

Presidente: Professora Doutora Teresa Maria Bodas de Araújo Freitas

Orientadora: Professora Doutora Maria Rafaela Pinheiro Cardoso

Vogal: Professor Doutor Jaime Alberto dos Santos

**Dezembro de 2020**

*(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

Aproveito este espaço para agradecer a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação, em especial:

À minha orientadora, professora Rafaela Cardoso, por todos os conhecimentos transmitidos, pela extrema dedicação e preocupação e pela eterna compreensão e disponibilidade mesmo em tempos de pandemia. Um grande obrigado.

À colega, Inês Borges, que sempre se demonstrou disponível e paciente ao longo deste trabalho laboratorial.

Aos colegas tornados amigos e aos amigos de sempre que permitiram que isto fosse possível, tanto pelo companheirismo como pelo apoio nos momentos difíceis.

E finalmente, o maior agradecimento vai para a minha família, em especial aos meus pais e irmã, que ao longo de mais de duas décadas estiveram sempre presentes com palavras de carinho e incentivo.

*(Página deixada em branco intencionalmente)*

## RESUMO

O betão é o segundo produto mais consumido na indústria da construção depois da água. A sua produção causa mais de 5% das emissões antropogénicas de  $CO_2$  o que com a crescente consciencialização sobre o impacto climático, faz com que exista um grande interesse em reduzir a sua pegada de carbono.

A bio-cimentação foi introduzida no final do século XX e surgiu como uma alternativa ao uso de cimento no melhoramento dos solos. Esta técnica constitui um processo biológico que utiliza bactérias capazes de catalisar a reação da ureia para precipitar carbonato de cálcio. Com este tratamento, dá-se a colmatação dos poros por preenchimento de calcite, reduzindo-se assim a permeabilidade e aumentando a resistência e a rigidez dos solos.

O objetivo deste trabalho passou por compreender como é que a duração do tratamento iria influenciar o comportamento mecânico do solo, tendo para isso sido analisada a compressibilidade e a quantidade de bio-cimento produzido, o que se traduz, indiretamente, na avaliação da durabilidade desta técnica.

Para cumprir este objetivo foram preparados provetes sujeitos a diferentes tipos de tratamento para compreender de que forma a presença do bio-cimento afeta o comportamento observado. De entre os ensaios realizados destacam-se os ensaios edométricos, necessários para a medição da compressibilidade, os ensaios de lixiviação para a quantificação da presença de  $CaCO_3$ , a análise de imagens de microscópio de varrimento de eletrões (SEM), a caracterização química por espectroscopia de difração de raios-x e as porosimetrias por intrusão de mercúrio (MIP) cruciais para identificar a formação de calcite.

Todas as conclusões obtidas justificam assim a necessidade de futuras investigações para que se possam reproduzir mais casos de up-scaling do laboratório para o campo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bio-cimentação, MICP, carbonato de cálcio, SEM, MIP.

*(Página deixada em branco intencionalmente)*



# ABSTRACT

Concrete is the second most-consumed product in construction after water. Its production causes more than 5% of anthropogenic CO<sub>2</sub> emissions and therefore, due to the increasing awareness of the climate impact there is a large interest in reducing its carbon footprint.

Microbial induced calcium carbonate precipitation (MICP) technique was introduced at the end of the 20th century as an alternative to the use of cement for soil improvement. MICP is a biologically driven calcium carbonate precipitation technology that uses urease producing bacteria fed with a calcium source. With this treatment the precipitation of calcium carbonate in the soil pores occurs, reducing soil permeability and increasing stiffness and strength as a function of the amount precipitated.

The aim of this work is to understand how the treatment duration would influence the mechanical behaviour of the soil by analysing compressibility and the amount of bio cement produced and, indirectly, durability.

To fulfil this goal, the specimens were prepared with different types of treatment for later comparison and to understand how the presence of bio-cement affects the observed behaviour.. The treatment with both water and feeding solution served as reference and control, respectively, for later comparison with the results of the specimens treated with bacteria and to understand how the presence of bio-cement affects the observed behaviour. The tests carried out were oedometer tests, necessary for the measurement of compressibility, leaching tests for the quantification of the presence of CaCO<sub>3</sub>, the analysis of electron scanning microscope (SEM) images, the chemical characterization by spectroscopy X-ray diffraction and porosimetry by mercury intrusion (MIP) to detect calcite.

All the conclusions obtained justify the need for future investigations so that more cases of up-scaling from the laboratory to the field can be reproduced.

**KEYWORDS:** Bio-cementation, MICP, calcium carbonate, SEM, MIP.

*(Página deixada em branco intencionalmente)*

# ÍNDICE

DECLARAÇÃO.....	i
AGRADECIMENTOS .....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xv
SIMBOLOGIA.....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Objetivos.....	1
1.2. Organização do documento .....	2
2. ESTADO DE ARTE .....	3
2.1. Bio-cimentação.....	3
2.1.1. Descrição do Processo.....	3
2.1.2. Parâmetros que Influenciam a Eficiência de MICP.....	4
2.2. Bio-cimentação e Jet Grouting .....	7
2.2.1. Processo Construtivo .....	7
2.2.2. Análise Comparativa .....	13
2.2.2.1. Em termos tecnológicos .....	13
2.2.2.2. Em termos económicos .....	16
2.2.3. Aplicações <i>in situ</i> .....	18
2.2.3.1. Caso de Estudo 1 .....	18
2.2.3.2. Caso de Estudo 2 .....	20
2.3. Durabilidade .....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
3.1. Solo Utilizado.....	23
3.2. Preparação das Bactérias .....	25
3.3. Preparação da Solução de Alimento.....	27
3.4. Montagem de Provetes .....	27
3.5. Procedimento Adotado para o Tratamento .....	29
4. ENSAIOS E RESULTADOS.....	33
4.1. Análise por Difração de Raios-X, XRD.....	33
4.2. Microscopia de Varrimento de Eletrões (SEM) .....	34

4.3.	Porosimetria por intrusão de mercúrio (MIP) .....	39
4.4.	Quantificação do carbonato de cálcio (CaCO <sub>3</sub> ) .....	41
4.5.	Ensaio Edométrico .....	42
4.6.	Resumo dos ensaios .....	47
5.	CONCLUSÕES E ESTUDOS FUTUROS .....	49
5.1.	Conclusões .....	49
5.2.	Estudos futuros .....	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53
	ANEXOS .....	55
	Anexo 1 – Liofilização das bactérias .....	55
	Anexo 2 – Solução de Alimento .....	57
	Anexo 3 – Imagens SEM e correspondentes análises EDS .....	58
	Anexo 4 – Curvas de compressibilidade para os vários provetes .....	63

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1- Esquema ilustrando: (a) processo de MICP a pequena escala; (b) processo de MICP a maior escala. Adaptado de Terzis et al., 2019.....	4
Figura 2.2 - Representação esquemática do processo de precipitação de carbonato de cálcio. Adaptado de Yasuhara et al., 2012.....	6
Figura 2.3 - 3 sistemas de injeção do jet-grouting. ....	8
Figura 2.4 Exemplo de material de refluxo. Adaptado de Brito, 2002. ....	10
Figura 2.5- Relação entre a permeabilidade normalizada e o conteúdo de $CaCO_3$ para diferentes concentrações de alimento. Adaptado de Al Qabany et al., 2013. ....	12
Figura 2.6- Aplicação do Jet-Grouting e do Bio-Cimento em função da granulometria dos solos. Adaptado de Brito, 2002.....	13
Figura 2.7– Resistência à compressão do jet-grouting em função do tipo de solo e dosagem de cimento. Adaptado de Brito, 2002. ....	14
Figura 2.8 - Resistência à compressão da bio-cimentação em função do carbonato de cálcio precipitado. Adaptado de Terzis et al., 2019.....	15
Figura 2.9 - Zonas de teste submetidas ao tratamento MICP. Adaptado de Gomez et al., 2015. ....	18
Figura 2.10 - Crosta superficial cimentada. ....	19
Figura 2.11 - Local a ser intervencionado. Adaptado de Terzis et al., 2020. ....	20
Figura 2.12 - Imagem de um tratamento de bio-cimentação a larga escala. Adaptado de van Paassen et al., 2010.....	21
Figura 2.13 – Representação esquemática das pontes de calcite formadas. Adaptado de Mujah et al., 2017.....	22
Figura 3.1 - Representação esquemática do talude de onde provêm o solo em estudo. ....	23
Figura 3.2 - Talude em campo. ....	24
Figura 3.3 - Curva granulométrica do solo tratado.....	24
Figura 3.4 – Montagem inicial dos provetes tratados: a) amostra montada para testar a técnica; b) amostra preparada com água. ....	28
Figura 3.5 – Disposição dos 4 provetes tratados com bactérias .....	29
Figura 3.6 – Primeira fase da primeira etapa de tratamento com bactérias. (a) Injeção de bactérias (b) rega superficial com solução de alimento.....	30
Figura 3.7 - Ensaio edométrico do provete. ....	30
Figura 3.8- Representação esquemática do protocolo adotado para o tratamento dos provetes. ....	31
Figura 4.1 - Representação da análise EDS.....	35
Figura 4.2 – Imagens SEM de solo não tratado (a) e solo tratado (b).....	35
Figura 4.3 - Resultados da análise EDS. ....	36
Figura 4.4 - Imagem SEM provete 1. ....	37
Figura 4.5 - Imagem SEM provete 2. ....	37

Figura 4.6 - Imagem SEM provete 3. ....	38
Figura 4.7 - Imagem SEM Terzis. ....	38
Figura 4.8 - Imagem SEM provete 4. ....	39
Figura 4.9 - Curva de distribuição da dimensão dos poros para as amostras de água e solução de alimento. ....	40
Figura 4.10 - Curva de distribuição da dimensão dos poros para os provetes 1, 2, 3 e 4. ....	40
Figura 4.11 - Secagem das amostras. ....	41
Figura 4.12 - Carregamentos e descargas feitas no provete que continha a solução de alimento. ....	43
Figura 4.13 - Trajetórias e $-\log \sigma'$ do solo obtidas a partir do ensaio edométrico das amostras de água e de alimento. ....	44
Figura 4.14 - Trajetórias e $-\log \sigma'$ do solo obtidas a partir do ensaio edométrico das amostras de água e os provetes 1 e 2. ....	45
Figura 4.15 - Trajetórias e $-\log \sigma'$ do solo obtidas a partir do ensaio edométrico das amostras de água e o provete 4. ....	46

# ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Valores característicos das pressões dos vários sistemas de jet-grouting. Adaptado de Brito, 2002.....	8
Tabela 2.2- Características mecânicas de solo tratado com jet-grouting e de betão armado C30/37. Adaptado de Brito, 2002. ....	11
Tabela 2.3 – Características mecânicas do solo tratado com MICP. Adaptado de van Paassen et al., 2010.....	12
Tabela 2.4 - Análise Comparativa entre as técnicas de jet-grouting e bio-cimento.....	16
Tabela 3.1 – Concentrações finais desejadas da solução de stock inicial. ....	25
Tabela 3.2– Concentrações finais desejadas da solução de liofilização. ....	26
Tabela 3.3 - Quantidades necessárias para se produzir 1l de solução de alimento. ....	27
Tabela 3.4 - Características da montagem de todos os provetes ensaiados. ....	32
Tabela 4.1 - Minerais identificados em cada provete.....	34
Tabela 4.2 - Quantificação do carbonato de cálcio.....	42
Tabela 4.3 - Quadro resumo dos principais parâmetros a analisar no ensaio edométrico. ....	47

*(Página deixada em branco intencionalmente)*



## SIGLAS E ABREVIATURAS

IST	Instituto Superior Técnico
MICP	Microbial Induced Calcite Precipitation
MIP	Porosimetria por Intrusão de Mercúrio
SEM	Scanning Electron Microscope

## SIMBOLOGIA

Ca	Cálcio
$Ca^{2+}$	Iões de Cálcio
$CaCl_2$	Cloreto de Cálcio
$CaCO_3$	Carbonato de Cálcio
$C_i$	Concentração Inicial
$C_f$	Concentração Final
$CO_2$	Dióxido de Carbono
$CO_3^{2-}$	Iões de Carbonato
$CO(NH_2)_2$	Ureia
$DO_{600}$	Densidade Ótica lida a 600 nm
e	Índice de Vazios
$e_0$	Índice de Vazios Inicial
Fe	Ferro
Gs	Densidade das Partículas Sólidas
$H_2O$	Água
K	Potássio
Mg	Magnésio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de Sódio
$NH_4^+$	Iões de Amónio
$NH_4Cl$	Cloreto de Amónio
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de Amónio
P	Fósforo
$V_i$	Volume Inicial
$V_f$	Volume Final
w	Teor em Água

*(Página deixada em branco intencionalmente)*

# 1. INTRODUÇÃO

No passado, a pesquisa e a prática nas diversas áreas da engenharia civil e geotécnica tinha vindo a ignorar a presença de microrganismos vivos no subsolo e como isso afetava as práticas convencionais, no entanto, nas últimas décadas esse paradigma mudou. O termo Microbial Induced Calcite Precipitation ou Bio-cimentação ganhou destaque e tem sido alvo de investigação científica, havendo já alguns casos de aplicação prática.

MICP ou bio-cimentação é uma técnica natural e ecológica que se baseia na produção de carbonato de cálcio por micro-organismos presentes no meio. A forma como se processa a precipitação, sob condições favoráveis, permite a união das partículas e a colmatação dos poros do meio poroso. Com esta premissa, o solo torna-se assim menos permeável, mais rígido e mais resistente.

As aplicações para este método são promissoras e podem resolver inúmeros tipos de problemas, desde a erosão do solo, à mitigação do risco de deslizamento de terras, presente no caso de estudo de Terzis et. al. (2020), ao reforço de fundações, ao reforço de diques na ocorrência de catástrofes naturais como enchentes e tempestades no mar descritas por Van Paassen (2011) e na proteção contra a liquefação caracterizada por Montoya et al. (2013).

Embora os solos tratados com MICP se apresentem como uma técnica de grande potencial comparando com os métodos convencionais de melhoramento de solos, há ainda bastantes questões a serem analisadas antes da sua aplicação em obra e posterior generalização, nomeadamente a homogeneização do tratamento no solo, a resistência conseguida consoante o tratamento efetuado (dosagens de bactérias e de alimento, frequência de alimentação e duração) e a durabilidade do tratamento.

Nesta tese vai-se analisar a influência da duração do tratamento na melhoria do comportamento do solo à compressão, medido através de ensaios edométricos. Vai-se também avaliar a durabilidade de forma indireta através da análise do mineral correspondente ao bio-cimento produzido em função da duração do tratamento.

## 1.1. Objetivos

Este trabalho foi desenvolvido no seguimento de um projeto financiado pela FCT com a referência PTDC/ECI-EGC/32590/2017 (BIOSOIL).

Esta dissertação é um trabalho essencialmente experimental realizado com o objetivo de estudar o processo MICP como uma alternativa a outras técnicas tradicionais de melhoramento de solos, tais como o jet grouting.

Para o estudo, foram montados provetes compostos por solo e cultura bacteriana de modo a avaliar, por comparação, os ganhos de resistência e averiguar a existência de vantagens na utilização de bactérias. Assim, pretendeu-se compreender quais as alterações entre os diferentes tempos de tratamento dos provetes, de forma a confirmar se, fornecendo durante mais tempo a solução de alimento às bactérias, existia uma produção maior e mais rápida de bio-cimento.

De modo a validar esta investigação, e como objetivo final, os resultados foram devidamente processados e avaliados tendo em consideração a sua durabilidade em função da produção de calcite (forma insolúvel de carbonato de cálcio), e posterior possível aplicação em obra.

## **1.2. Organização do documento**

O presente trabalho está dividido em cinco capítulos da seguinte forma:

- Capítulo 1, que inclui uma breve referência aos objetivos do estudo realizado, de como foram atingidos e da organização do documento.
- Capítulo 2, que descreve de forma pormenorizada todo o processo de formação de carbonato de cálcio, enumerando os diferentes parâmetros químicos e físicos que influenciam o comportamento das bactérias. É também estabelecida uma comparação entre a técnica MICP e a técnica Jet-Grouting.
- Capítulo 3, que apresenta detalhadamente as metodologias utilizadas no trabalho experimental realizado nos laboratórios de Biologia e de Geotecnia. Aqui é feita a caracterização do solo utilizado nos ensaios e mostra-se como se procedeu à montagem dos provetes utilizados para o estudo da técnica MICP. É igualmente descrito o procedimento referente à preparação das bactérias e da solução de alimento.
- Capítulo 4, que representa todos os resultados obtidos nos diferentes ensaios e é feita uma análise dos resultados experimentais de modo a compreender quais as limitações da técnica.
- Capítulo 5, que expõe as principais conclusões retiradas deste estudo e propõem-se ainda utilizações futuras da técnica de bio-cimentação no sentido de melhorar a aplicação da técnica.

Posterior às conclusões apresenta-se o capítulo das referências onde está listada toda a literatura consultada para a realização desta dissertação.

## 2. ESTADO DE ARTE

Este capítulo assenta na caracterização da técnica de tratamento de solos em questão – a bio-cimentação.

Partindo de um enquadramento teórico deste sistema, procede-se à descrição geral da sua metodologia, os seus fatores determinantes e a sua aplicabilidade real.

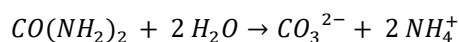
Para uma melhor compreensão do alcance deste método, é também descrita uma comparação com outra técnica de melhoramento de solos para averiguar as vantagens da metodologia em estudo.

### 2.1. Bio-cimentação

#### 2.1.1. Descrição do Processo

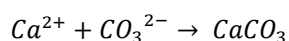
A Bio-cimentação é um processo natural que consiste na utilização de micro organismos para a produção de carbonato de cálcio. Em condições naturais, a precipitação de carbonato de cálcio acontece de uma forma muito lenta e por isso, para encurtar esse mesmo tempo e para aumentar as quantidades de carbonato de cálcio, são utilizados certos micro organismos tais como bactérias. As bactérias mais comuns são do tipo *Sporosarcina Pasteurii* ou *Bacillus Pasteurii*, escolhidas porque são não patogénicas, ou seja, não são prejudiciais.

O processo bioquímico da produção de bio-cimento tem por base a hidrólise da ureia ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ), que é catalisada com recurso à enzima urease, que se encontra presente nas bactérias referidas anteriormente. Na Equação 2-1 encontra-se a equação que traduz a degradação da ureia.



Equação 2-1

Sequencialmente, na Equação 2-2 ocorre a formação de calcite através da combinação dos iões de carbonato juntamente com os iões de cálcio, fornecidos pelo cloreto de cálcio presente na solução de alimentação.



Equação 2-2

O carbonato de cálcio formado, sob a forma mineral de calcite, corresponde ao que se chama bio-cimento. É responsável pela ligação das partículas do solo porque se precipita na superfície

das partículas formado pequenas películas (Figura 2.1), aumentando assim a sua rigidez e a resistência do solo. Quando é precipitado em quantidades apreciáveis consegue também preencher os vazios do solo diminuindo a sua permeabilidade.

Na figura abaixo está uma representação esquemática das bactérias (a preto) a fixarem-se aos grãos do solo (a castanho) e a induzir a formação e o crescimento da calcite (minerais com forma cúbica a branco).

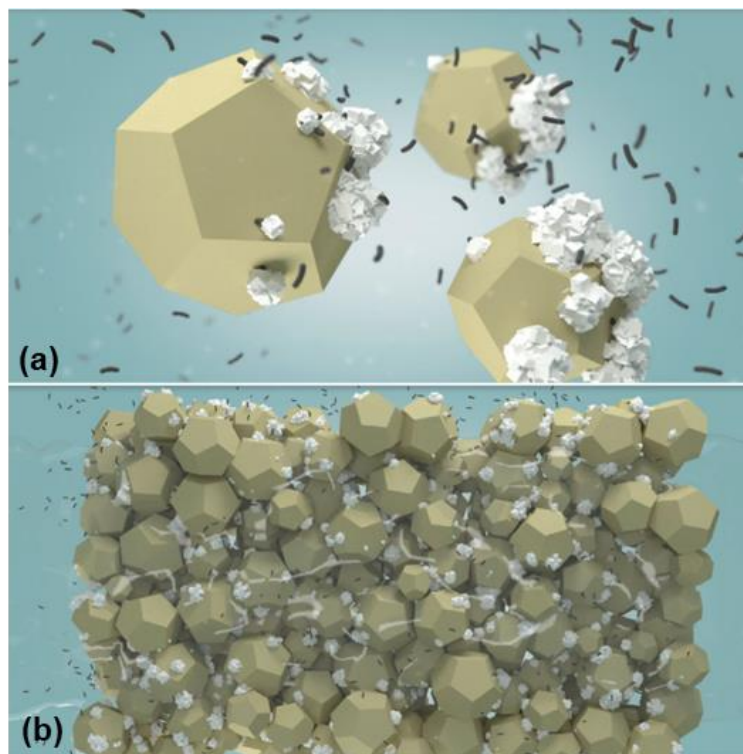


Figura 2.1- Esquema ilustrando: (a) processo de MICP a pequena escala; (b) processo de MICP a maior escala. Adaptado de Terzis et al. (2019).

Todo este processo é, usualmente, denominado por Microbial Induced Calcite Precipitation (MICP). A MICP trata-se de uma técnica que constitui uma alternativa para melhoramento das propriedades mecânicas dos solos, controlo de permeabilidade de entre outras opções.

### **2.1.2. Parâmetros que Influenciam a Eficiência de MICP**

A eficiência da aplicação desta técnica depende da sua otimização que está inteiramente dependente de certos parâmetros essenciais, descritos abaixo:

- **Compatibilidade Geométrica das Bactérias**

Nos solos, as bactérias são os microrganismos presentes em maior abundância e estes podem apresentar uma grande variação de tamanhos. Por esse facto, é necessário garantir que as bactérias se conseguem deslocar facilmente por entre os poros para que a produção de calcite possa ser feita duma maneira homogénea. Um maior índice de vazios possibilita um maior enriquecimento de carbonato de cálcio (Ng et al., 2012).

- **Nutrientes**

Os nutrientes são a fonte de alimento e energia das bactérias e por esse fato são elementos fundamentais em todo o processo de MICP.

Nem sempre os solos possuem nutrientes suficientes para que as bactérias tenham boas condições para procederem à sua função e por isso, os nutrientes tem de ser fornecidos durante a fase de tratamento do solo. Segundo Mitchell et al. (2005), exemplos desses nutrientes são o dióxido de carbono ( $CO_2$ ), o fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca), ferro (Fe), entre outros.

- **Concentração de Bactérias**

Uma maior concentração de bactérias conduz a uma maior produção de urease que por consequência leva a um aumento de calcite precipitada (Ng et al., 2012). As bactérias atuam como sítio de nucleação daí serem determinantes na otimização do processo de MICP.

- **Concentração dos Reagentes**

As concentrações de ureia e cloreto de cálcio são importantes para garantir a quantidade precipitada de calcite desejada (Figura 2.2).

Baixas concentrações destes reagentes resultam numa maior eficiência comparando com altas concentrações (Gomez et al., 2015). Isto deve-se ao aumento da salinidade da solução provocada pelos sais de cálcio levarem à inibição da atividade bacteriana e, por consequente, à produção de calcite. Com concentrações mais baixas é assim possível atingir uma distribuição mais homogénea da calcite.

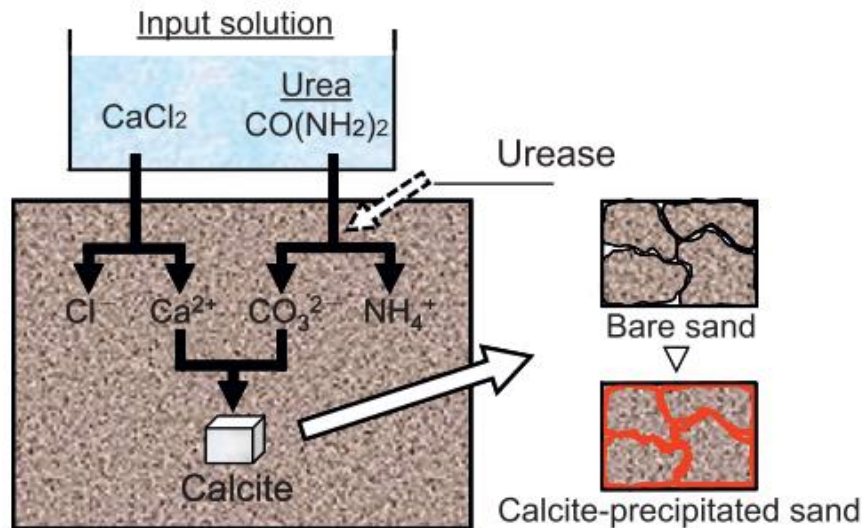


Figura 2.2 - Representação esquemática do processo de precipitação de carbonato de cálcio. Adaptado de Yasuhara et al. (2012).

- **Fixação e Distribuição das Bactérias pelo Solo**

Para um melhor desenvolvimento desta técnica as bactérias devem ser distribuídas uniformemente quando injetadas no solo. Um método de injeção mal executado pode levar a que estas se fixem apenas em algumas partes o que leva a um mau aproveitamento da técnica (Ng et al., 2012).

- **pH**

O pH tem uma grande influência sobre as diferentes comunidades microbianas presentes no solo. Tanto a produção de  $CO_3^{2-}$  como a precipitação de carbonato de cálcio dependem fortemente do pH do ambiente, sendo que a última acontece mais facilmente em ambientes alcalinos abundantes em cálcio e iões de carbonato.

Segundo Ng et al., 2012, o intervalo de valores mais favorável para a produção de calcite está compreendido entre 8,5 e 9,3, sendo o pH ótimo de aproximadamente 9,0.

- **Temperatura**

Cada micro organismo tem um valor ideal de temperatura para o seu desenvolvimento.

As bactérias do tipo *Bacillus Pasteurii* são capazes de sobreviver à temperatura ambiente, mas apresentam um rendimento superior à temperatura de 30°C. Para a enzima urease, a temperatura de máxima atividade ocorre perto dos 60°C (Cheng et al., 2017), no entanto não é



possível reproduzir esta medida *in situ* logo, o processo de precipitação de calcite sofre algum atraso.

## **2.2. Bio-cimentação e Jet Grouting**

São várias as soluções tradicionais para tratamento de solos, no entanto, uma das mais utilizadas e a que apresenta uma técnica análoga ao bio-cimento é o jet-grouting. Ambas as técnicas consistem na injeção de um ligante no solo que promove a ligação física entre as partículas. Os equipamentos usados para ambas são praticamente os mesmos, pelo que se usará a técnica de jet grouting para enquadrar o procedimento adotado para a MICP e assim fazer uma comparação detalhada das duas para se perceber que a bio-cimentação pode ser uma técnica viável por ser bastante acessível.

### **2.2.1. Processo Construtivo**

- **Tipo de Solos**

O jet-grouting pode ser aplicado em qualquer tipo de solos, tanto em solos incoerentes, tais como em areias, seixos e cascalho, como em solos coesivos como é o caso de argilas e siltes.

O bio-cimento, por sua vez, desenvolve-se mais eficazmente em solos incoerentes tais como as areias. Há, no entanto, registo de ter sido usado em solos com alguma percentagem de finos, (Terzis et al., 2020).

- **Tecnologia**

Após a caracterização do terreno, é possível determinar o sistema de injeção e os demais equipamentos necessários ao desenvolvimento do jet-grouting.

O sistema de injeção do jet-grouting compreende 3 alternativas: o sistema simples, duplo e triplo. No que diz respeito ao sistema simples, este apenas injeta calda de cimento com uma pressão elevada. Quanto ao sistema duplo, para além do jato de calda de cimento, este possui também um jato de ar comprimido ou água. Já o sistema triplo, este dispõe de dois bocais onde um deles injeta a calda de cimento e o outro o ar comprimido e água. Na Figura 2.3 encontra-se uma representação esquemática dos 3 sistemas de injeção.

Tendo isso em conta, para solos com maior quantidade de finos, uma vez que estes solos apresentam uma maior plasticidade e por consequência uma maior consistência e coesão, existe a dificuldade de desagregar os grãos e de aglutinar o cimento aos mesmos, e por isso é

necessária a aplicação de maiores pressões de calda de cimento e eventualmente ar e ar e água (sistemas duplo e triplo) para promover a desagregação antes da mistura com a calda de cimento.

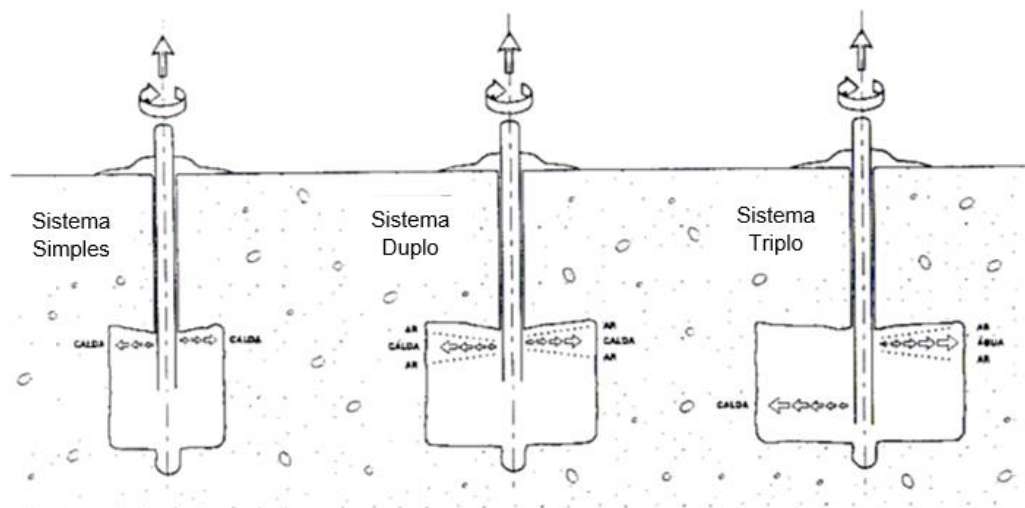


Figura 2.3 - 3 sistemas de injeção do jet-grouting. Adaptado de Brito (2002).

Para solos mais grosseiros, como a coesão que apresentam é praticamente nula, a desagregação dos grãos é mais fácil o que leva a que as pressões de calda de cimento utilizadas sejam menores e o sistema simples seja suficiente.

Na Tabela 2.1, encontram-se os valores característicos dos parâmetros de pressão de injeção dos diversos sistemas de injeção de jet-grouting.

Tabela 2.1 - Valores característicos das pressões dos vários sistemas de jet-grouting. Adaptado de Brito (2002).

	Sistema Simples		Sistema Duplo		Sistema Triplo	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Pressão de Injeção de Calda [MPa]	20	60	30	60	3	7
Pressão de Injeção de Ar [MPa]	-	-	0,6	1,2	0,6	1,2
Pressão de Injeção de Água [MPa]	-	-	-	-	20	50

Para além dos equipamentos de injeção, a bomba e máquina de injeção, são também necessários o silo de cimento, a central misturadora, o compressor e a máquina de furação.

Para o processo de bio-cimentação, os equipamentos necessários para a sua execução são semelhantes aos de jet-grouting, sendo estes a máquina de furação, a máquina de injeção, a bomba de injeção e a bomba de extração. É de notar, que por se tratar de solos arenosos as pressões de injeção são muito baixas quando comparadas com as técnicas cimentícias de tratamento de solos, tal fato, garante assim que não existe a desagregação do solo. Valores típicos de injeção são entre 2 a 4 MPa.

O processo de aplicação desta metodologia difere muito do processo de jet-grouting pois compreende a execução de poços de injeção e poços de extração. A partir dos poços de injeção são injetadas numa primeira fase, as bactérias e de seguida a solução de alimento. Estes fluidos são recolhidos nos poços de extração e os restos biológicos são bombados para fora da área a intervir.

- **Controlo de Qualidade**

Para assegurar que a execução de jet-grouting seja bem-sucedida e que seja verificado o seu adequado funcionamento, é necessário garantir certas medidas de controlo de qualidade.

Assim sendo, deve proceder-se à realização de ensaios in situ tais como a execução de colunas de teste. A partir deste ensaio pode fazer-se não só uma inspeção visual dos elementos de jet-grouting após escavação parcial à volta da coluna, mas também é permitida a recolha de amostras para a realização de ensaios de laboratório para que se possa aferir os diâmetros das colunas obtidos, bem como os parâmetros de resistência, possibilitando assim ajustar os parâmetros de execução, caso necessário.

Relativamente ao controlo de execução da técnica este é efetuado através da monitorização e do registo contínuo em tempo real dos parâmetros de execução de jet grouting durante os processos de furação e injeção.

Os principais parâmetros registados são a velocidade, a pressão e a profundidade de furação, a quantidade de cimento consumida, a pressão de injeção, a velocidade da vara, a caracterização da calda de cimento e a quantidade e qualidade do material de refluxo, sendo este último o maior indicador de qualidade durante a execução de jet-grouting.

Durante o processo de injeção deve proceder-se à inspeção visual do material de refluxo (Figura 2.4) e das suas características, devendo este manter-se espesso e contínuo, o que indica que a mistura do solo e da calda está a processar-se de forma correta. Se for observado algum comportamento inesperado do material de refluxo, por exemplo ficar muito fluido, ou em caso de redução inesperada do caudal, devem ser investigadas as causas e ajustados os parâmetros de execução. Devem ser ainda recolhidas amostras de refluxo para serem submetidas a ensaios laboratoriais de compressão. Estes ensaios permitem estimar, de forma indireta, as características da mistura da coluna.



Figura 2.4 Exemplo de material de refluxo. Adaptado de Brito (2002).

Para a bio-cimentação são necessárias também medidas de controlo de qualidade que assegurem um resultado satisfatório.

Tendo isso em conta, são precisos ensaios *in situ* para que, em primeiro lugar, possam quantificar a calcite produzida ao longo do processo e em segundo, que consigam garantir uma distribuição homogénea pela zona a tratar.

Devem ser também recolhidas amostras de solo tratado para poderem ser analisadas em laboratório e se poder fazer uma avaliação da resistência à compressão e rigidez.

Como controlo de execução são registados em tempo real e monitorizados os parâmetros de execução nomeadamente, a quantidade de bactérias e reagentes utilizados, as pressões de injeção e a qualidade e quantidade dos indicadores químicos da atividade biológica.

A análise dos indicadores químicos é muito importante pois, durante o processo de hidrólise da ureia é formado amónio que em altas concentrações, pode ser tóxico não só para a saúde humana, mas também para os microrganismos do solo.

- **Propriedades Mecânicas e Hidráulicas**

Como consequência da aplicação dos tratamentos, existem propriedades do solo que sofrem alterações, nomeadamente, a resistência à compressão simples, a rigidez e a permeabilidade.

A resistência à compressão do material tratado é condicionada pelo tipo de solo e as respetivas propriedades mecânicas iniciais, pelo sistema de injeção adotado e pela influência dos parâmetros de execução. Contudo, pode concluir-se que a resistência à compressão simples aumenta após a execução de jet-grouting. É de notar ainda, que nos solos de granulometria mais

grosseira os valores de resistência à compressão são mais elevados do que os registados nos solos finos tratados.

Relativamente ao módulo de elasticidade, este apresenta valores superiores nos solos arenosos, todavia, estes valores são muito baixos quando comparados com os valores usuais do módulo de elasticidade do betão. Esta comparação é importante para perceber a diferença da ordem de grandeza das características mecânicas do solo com este tratamento com o betão armado. Na Tabela 2.2 encontram-se os valores típicos da resistência à compressão simples e do módulo de elasticidade para os diferentes tipos de solo tratados com jet grouting.

Tabela 2.2- Características mecânicas de solo tratado com jet-grouting e de betão C30/37. Adaptado de Brito (2002).

Tipo de Solo	Areia	Silte	Argila	C30/37
Compressão simples	7 a 12 MPa	5 a 8 MPa	3 a 6 MPa	37 MPa
Módulo de Elasticidade	6 a 10 GPa	4,5 a 7 GPa	2,5 a 4 GPa	33 GPa

Para a bio-cimentação, a resistência à compressão simples do material tratado é condicionada essencialmente pela concentração de carbonato de cálcio e pela homogeneidade do tratamento.

Tendo em conta o caso de estudo de Van Paassen e co-autores em (van Paassen et al., 2010), quanto maior for esta concentração, maior é a resistência à compressão simples. No entanto, o fenómeno da heterogeneidade conduz a uma imprevisibilidade nos valores resistentes a obter no final do tratamento, pelo que é essencial de ser controlada a homogeneidade do tratamento.

No que diz respeito ao módulo de elasticidade, este apresenta valores muito baixos quando comparados com betão armado pois este tem um processo controlado de fabrico que permite que os materiais sejam muito menos porosos que os do bio-cimento, o que por consequência lhes confere uma maior rigidez.

Na Tabela 2.3 encontram-se valores indicativos do referido acima.

Tabela 2.3 – Características mecânicas do solo tratado com MICP. Adaptado de van Paassen et al. (2010).

% de $CaCO_3$	Compressão Simples [MPa]	Módulo de Elasticidade [GPa]
12,6	0,7	1,31
14,5	2,2	4,08
15,5	0,9	2,13
17,5	4,2	6,16
18,6	1,7	2,19
22,6	7,6	9,19
24,8	12,4	13,88

Após o tratamento de jet-grouting, pode-se dizer que o coeficiente de permeabilidade das colunas de solo tratado varia entre  $10^{-8}$  e  $10^{-11}$  m/s, dependendo da sua geometria. Neste caso a permeabilidade é controlada pela da calda de cimento endurecida.

Para a bio-cimentação, a redução da permeabilidade é uma consequência natural da aplicação, porém esta diminuição depende de alguns fatores, nomeadamente da quantidade de precipitado formado e da geometria dos vazios. Segundo Al Qabany et al. (2012) para uma maior concentração de carbonato de cálcio existe uma diminuição da permeabilidade do solo (Figura 2.5).

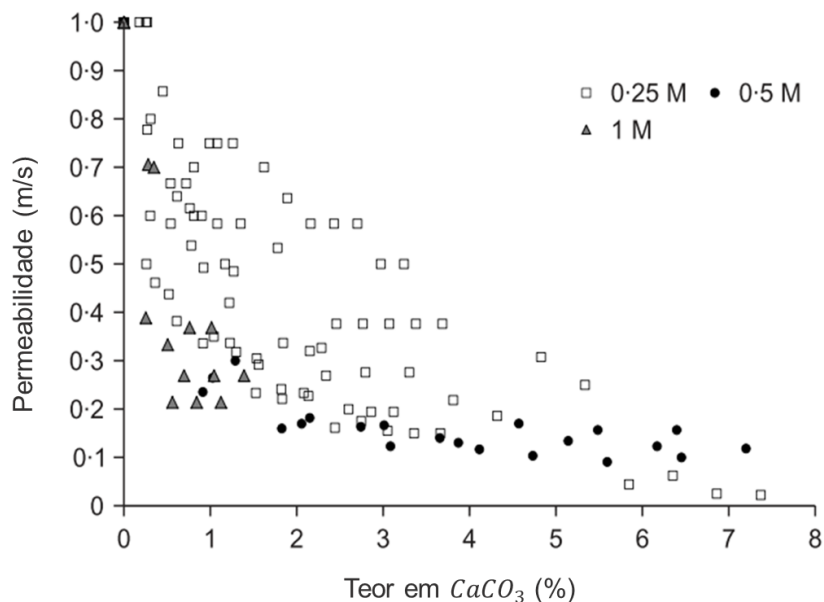


Figura 2.5- Relação entre a permeabilidade normalizada e o conteúdo de  $CaCO_3$  para diferentes concentrações de alimento. Adaptado de Al Qabany et al. (2013).

## 2.2.2. Análise Comparativa

Depois de detalhados ambos os procedimentos, é importante fazer um análise comparativa entre os mesmos para perceber as vantagens e desvantagens da bio-cimentação em relação a esta técnica conhecida.

### 2.2.2.1. Em termos tecnológicos

Como primeiro fator diferenciador está o tipo de solos a que cada um se aplica. Neste aspeto, a técnica de jet-grouting apresenta superioridade pois é capaz de operar em qualquer tipo de material.

Na Figura 2.6 encontram-se os respetivos intervalos de ação de ambas as técnicas perante os vários tipos de solos.

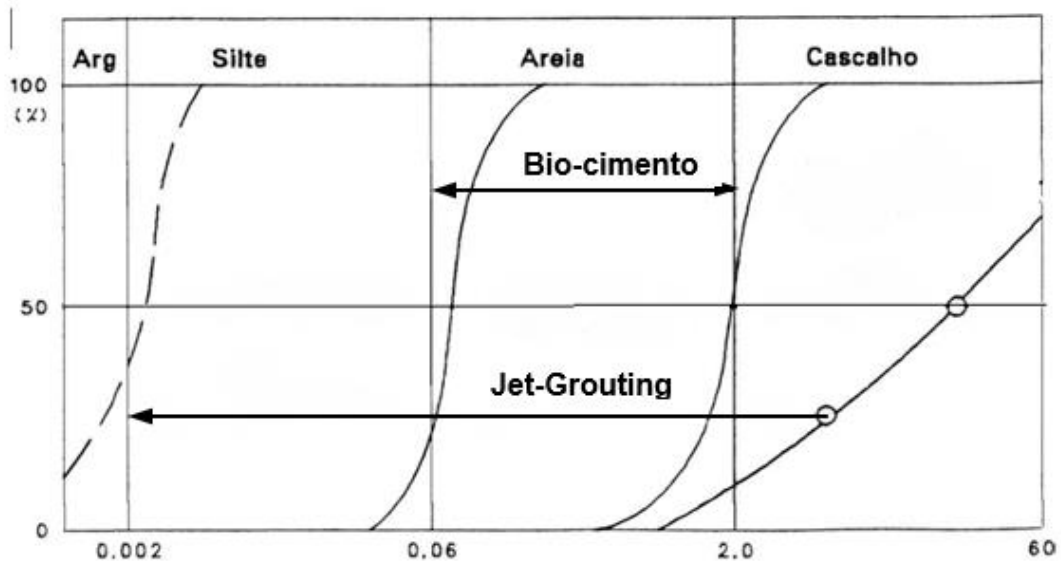


Figura 2.6- Aplicação do Jet-Grouting e do Bio-Cimento em função da granulometria dos solos. Adaptado de Brito (2002).

Em termos de equipamentos necessários à realização dos diferentes tratamentos estes são em parte semelhantes diferindo apenas em certos fatores determinantes. Para o jet-grouting tem de se assegurar toda a maquinaria associada à produção de cimento e para o bio-cimento é necessário garantir que existam condições para manter as bactérias em obra. Há que assegurar

a existência do tanque misturador que permita manter as bactérias em obra e posteriormente manter a solução de alimento.

Como controlo de qualidade existem pontos em comum para as duas técnicas, tais como a necessidade de monitorização em tempo real dos diversos parâmetros inerentes à injeção e a recolha de material.

A partir do material recolhido em obra, é possível fazer uma avaliação dos parâmetros dos solos e constatar-se que tanto a técnica do jet-grouting como a do bio-cimento apresentam um aumento de resistência à compressão simples.

Na Figura 2.7 pode observar-se uma comparação entre os valores de resistência do betão e dos vários tipos de solos tratados com jet-grouting. Para a mesma dosagem de cimento, solos arenosos apresentam valores mais favoráveis que solos argilosos, siltosos e mesmo o solo orgânico, o que leva a concluir que a técnica deve ser utilizada em solos mais grosseiros.

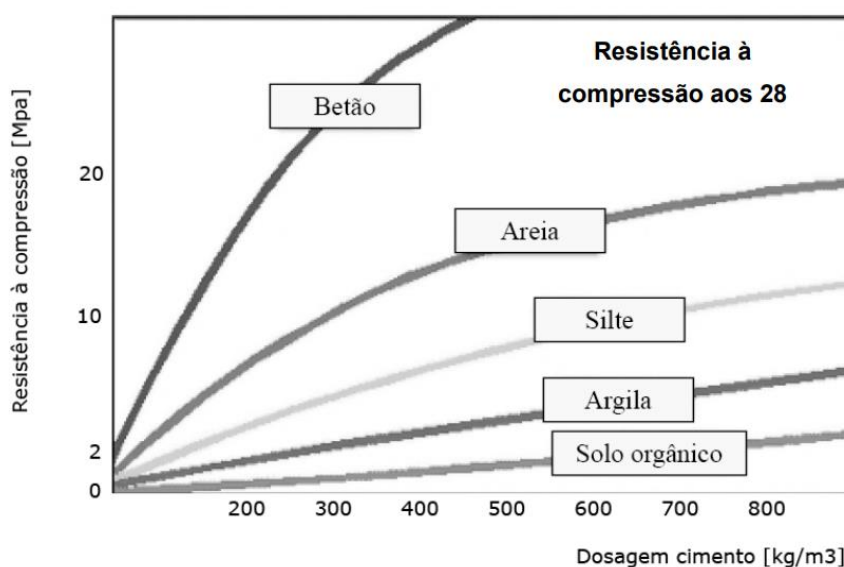


Figura 2.7– Resistência à compressão do jet-grouting em função do tipo de solo e dosagem de cimento. Adaptado de Brito (2002).

A partir da Figura 2.8, pode contemplar-se que para a mesma percentagem de carbonato de cálcio precipitado, os solos arenosos (losango a azul) apresentam valores superiores de resistência à compressão simples. Os solos finos (círculo a branco) exibem valores inferiores para as mesmas condições de aplicação do tratamento.



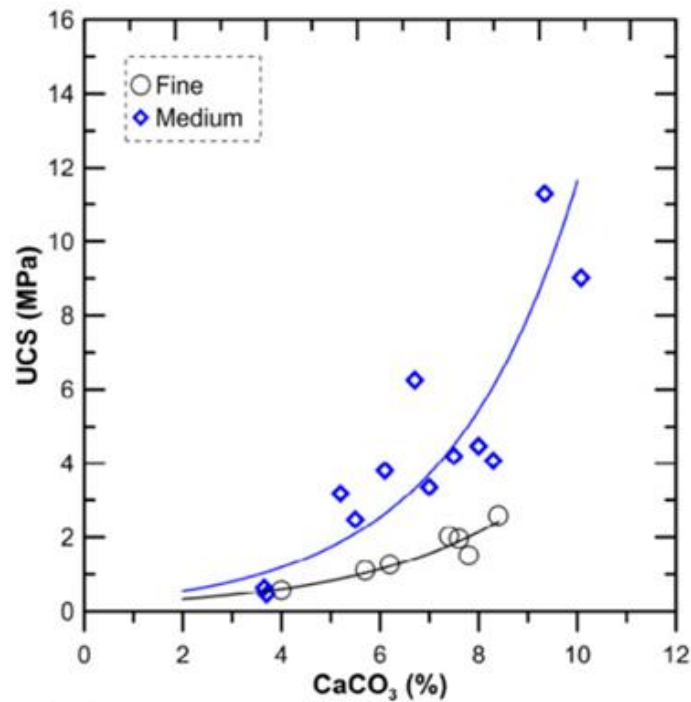


Figura 2.8 - Resistência à compressão da bio-cimentação em função do carbonato de cálcio precipitado.  
Adaptado de Terzis et al. (2019).

Comparando as duas técnicas quando usadas para melhoramento de solos arenosos, estes apresentam valores de aumento de resistência à compressão simples muito semelhantes.

Relativamente ao módulo de elasticidade, com o jet-grouting conseguem obter-se valores maiores que usando a técnica da bio-cimentação. Este fato pode não representar uma desvantagem da bio-cimentação pois, com o jet-grouting está-se sempre a sobre dimensionar enquanto que com o bio-cimento não, ou seja, este limita o desperdício.

Em relação à permeabilidade, ambas as técnicas apresentam valores satisfatórios de redução desta propriedade. Na Tabela 2.4 encontra-se um quadro resumo com os principais parâmetros de comparação descritos em cima.

Tabela 2.4 - Análise Comparativa entre as técnicas de jet-grouting e bio-cimento.

	<b>Jet-Grouting</b>	<b>Bio-cimento</b>
Tipo de Solos	-Todos, preferencialmente solos arenosos;	-Solos arenosos.
Equipamento	-Silo de cimento; -Central misturadora; -Bomba de injeção; -Compressor; -Máquina de furação e injeção.	- Central misturadora; -Máquina de injeção; -Bomba de injeção; -Bomba de extração.
Controlo de Qualidade	- Colunas de Teste; - Registo contínuo dos parâmetros de execução.	- Ensaios in situ; - Registo contínuo dos parâmetros de execução.
Propriedades mecânicas e hidráulica	- Aumento da resistência à compressão simples; -Aumento da rigidez; -Diminuição da permeabilidade.	- Aumento da resistência à compressão simples; -Diminuição da permeabilidade.

#### 2.2.2.2. Em termos económicos

Embora ambas as técnicas apresentem metodologias e equipamentos semelhantes, existem diferenças cruciais que se refletem maioritariamente nos custos globais de cada método. Por isso mesmo, vale a pena fazer uma análise económica comparativa para perceber os benefícios e os obstáculos de cada sistema.

Os custos das alternativas foram categorizadas em 3 parâmetros: o custo de implementação, o custo de operação e o custo da matéria prima.

- **Custos de Implementação**

O processo de aplicação de jet-grouting encontra-se bastante estandardizado ao contrário do processo de bio-cimento. Este compreende obstáculos ainda por contornar tais como a preparação das bactérias.

Preparar bactérias em obra não é praticável por diversos motivos técnicos e organizacionais. Como consequência, as bactérias são provenientes de laboratório, o que representa cerca de 20% a 30% do custo de implementação (Suer et al., 2009).

Para a execução de jet-grouting são necessários diversos equipamentos que acarretam um custo diário e, embora os valores de rendimento desta técnica sejam bastante elevados representam mesmo assim um custo muito grande que apenas é justificado em projetos de alguma dimensão.

Para a execução de bio-cimento, mesmo com as restrições acima referidas, os equipamentos apresentam custos de implementação muito menores o que significa que pode ser uma boa alternativa para projetos de menor dimensão.

- **Custos de Operação**

Enquanto que o processo de jet-grouting exhibe rendimentos diários muito elevados, o bio-cimento apresenta uma alta imprevisibilidade no tempo de operação.

As injeções de nutrientes na técnica de bio-cimento precisam de ser faseadas tendo em conta o tempo de reação e o respetivo tempo decorrido entre os poços de injeção e de extração. Esse período de tempo não tem como ser contabilizado o que leva a uma incerteza na contabilização dos custos.

No entanto, a enzima bacteriana pode ser reutilizada em aplicações de tratamento subsequentes. Isso significa, que o MICP, a longo prazo, apresenta custos de operação inferiores (Mujah et al., 2017).

- **Custos de Matéria Prima**

Para uma melhor conceção das diferenças de custo em relação às matérias primas é vantajoso avaliar o caso de estudo de (Suer et al., 2009). Este estudo teve como objetivo comparar o uso de jet-grouting com o bio-cimento na selagem de uma cortina de estacas. O jet-grouting foi de facto o método utilizado, contudo, o uso do bio-cimento foi simulado para ser feita a comparação.

Nesse caso foi assumido um consumo de  $0,45 m^3$  de cimento por m de coluna de jet-grouting, que se traduziu num consumo de 0,56 toneladas de cimento. Nas mesmas condições, para se atingir um bom tratamento, a quantidade de calcite necessária a ser produzida era de  $300 kg/m^3$ . No entanto, este valor é meramente teórico pois as quantidades reais a serem utilizadas constituem um enorme fator de grande incerteza.

Tendo isto em consideração, segundo Suer et al. o custo das matérias primas do bio-cimento revelou-se mais vantajoso que o custo do jet-grouting.

- **Conclusões**

Embora nos parâmetros avaliados para a análise económica o bio-cimento apresente vantagens significativas sobre o jet-grouting a sua aplicação ainda está longe de ser aplicada a grande escala. Existe ainda a necessidade de mecanizar o processo e de serem melhorados certos processos para promover a homogeneidade do tratamento e a sobrevivência das bactérias, fatores que explicam a imprevisibilidade deste tratamento. Esta imprevisibilidade tem de ser minimizada para que seja viável a aplicação da bio-cimentação em obra.

### **2.2.3. Aplicações *in situ***

As aplicações *in situ* permitem abordar a viabilidade, a eficiência e o desempenho geral da bio-cimentação de modo a que possa vir a ser uma alternativa possível às soluções tradicionais.

De seguida, encontram-se 2 casos de estudo que permitiram retirar algumas conclusões sobre o processo de bio-cimentação.

#### **2.2.3.1. Caso de Estudo 1**

O primeiro caso de estudo pertence a Gomez et. al. (2015) e teve como objetivo avaliar o comportamento de MICP no combate à erosão e à instabilidade superficial de areias soltas.

Foram estabelecidas 4 zonas de teste (Figura 2.9), 3 delas a receberem as soluções de tratamento e a última, como controlo, onde apenas foi aplicada água.



Figura 2.9 - Zonas de teste submetidas ao tratamento MICP. Adaptado de Gomez et al. (2015).

As soluções de tratamento foram aplicadas às 3 zonas de teste (TP2, TP3 e TP4) numa série de 5 ciclos, cada um com 4 dias de duração, totalizando 20 dias consecutivos de tratamento.

Cada ciclo consistia em 1 dia de injeção de bactérias seguido de 3 dias de introdução de nutrientes. Para cada zona de teste foram aplicadas diferentes concentrações de ureia e cloreto de cálcio. Para a zona TP2 foram impostas as concentrações mais elevadas, enquanto que para as zonas TP3 e TP4 foram aplicadas metade e um quarto das concentrações utilizadas em TP2, respetivamente.

Após os 20 dias, nas 3 zonas de tratamento podia-se observar uma crosta superficial cimentada (Figura 2.10). Embora a presença destas crostas represente um melhoramento do solo, estas podem não garantir a proteção contra ventos fortes e grande precipitação. Por isso mesmo, a espessura dessa crosta foi medida em 4 locais diferentes nas 3 zonas de teste.



Figura 2.10 - Crosta superficial cimentada. Gomez et al. (2015).

No total, durante e após o tratamento, foram retiradas amostras em 20 locais diferente de entre as 4 zonas de teste. Como plano de controlo foram feitas medidas de crosta cimentada superficial, testes de erosão e medições de conteúdo de calcite.

Posteriormente a todo o controlo, foi concluído que a zona de teste TP4, que corresponde às menores concentrações de solução de tratamento, apresentaram uma resistência superior e a uma maior homogeneização do terreno tratado.

### 2.2.3.2. Caso de Estudo 2

O segundo caso de estudo pertencente a Terzis et. al. (2020), foi realizado na Suíça, e tinha como objetivo utilizar a MICP para estabilizar um talude após um deslizamento de terras.

Devido à inclinação excessiva do talude, foi necessário construir uma plataforma de trabalho de modo a que fosse possível operar no local de obra. O seu comprimento foi determinado de forma a que apenas metade do talude fosse sujeito ao tratamento de bio-estabilização. Na Figura 2.11 encontra-se a representação esquemática do local que foi intervencionado.

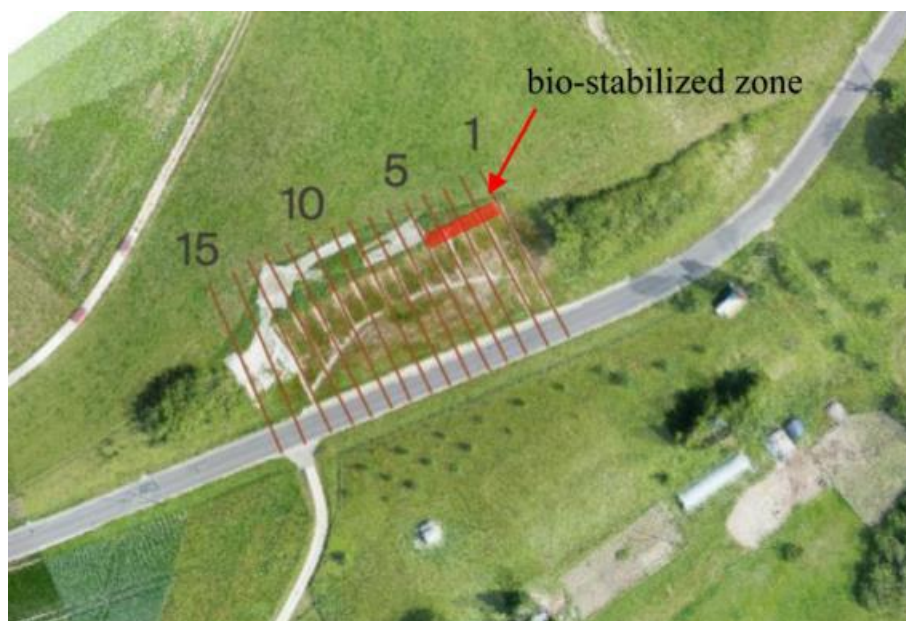


Figura 2.11 - Local a ser intervencionado. Adaptado de Terzis et al. (2020).

No topo do talude encontravam-se os tanques misturadores, a partir dos quais foram injetadas as bactérias e as soluções de alimento que, por gravidade, circularam até aos boreholes.

No total, foram executados 51 boreholes a uma profundidade que permitiu chegar à superfície de rotura, onde a formação de calcite é potenciada.

As injeções duraram no total 4 dias. No quinto dia, o último dia de operações, algumas amostras de solo foram recolhidas para posteriormente serem analisadas no laboratório para ser quantificada a percentagem de calcite produzida.

Após o tratamento, foi instalada uma rede de drones de vigilância para avaliar o comportamento do talude, a longo prazo, no que diz respeito às chuvas intensas.

Depois de uma reconstrução 3D da evolução do perfil do talude, verificou-se que os valores de deslocamento mais pronunciados não se verificavam no lado do talude tratado com MICP.

Como conclusão deste estudo existe o fato desta técnica poder ser aplicada em solos finos. Ao ter sido introduzida, em primeiro lugar, uma solução de  $Ca^{2+}$  e de  $CO_3^{2-}$  e só depois a ureia, levou a que esta técnica se mostrasse eficiente em solos com uma maior percentagem de finos.

### 2.3. Durabilidade

A MICP revela-se como uma alternativa inovadora e sustentável para o melhoramento de solos. Este tratamento tem um potencial ainda muito pouco explorado e por esse fato, existem várias ineficiências a serem combatidas.

Quando a MICP é aplicada em larga escala, o seu tempo de tratamento tem de ser dividido em duas fases. A primeira, onde os reagentes tem de chegar à área a ser intervencionada e a segunda, o tempo que esses mesmos reagentes necessitam para precipitar (Ahmed Al Qabany et al., 2012). Esta logística ainda apresenta algumas dificuldades pois a primeira fase está muito dependente das condições do local de obra e a segunda fase, das concentrações dos reagentes usados e dos sistemas de injeção, nomeadamente, do número, frequência e concentração das mesmas. Ou seja, pode existir uma precipitação inicial de vaterite mas se não for garantido o tempo necessário para esta se redissolver e precipitar em calcite, o tratamento fica comprometido. Por isso, o tempo de tratamento constitui um dos fatores a estudar para garantir a eficiência e durabilidade do processo.

Aliado ao tempo de tratamento, um dos grandes desafios desta técnica é a distribuição do tratamento em profundidade. Quando se faz o up-scaling do laboratório para o campo, como no caso de estudo de Van Paassen (van Paassen et al., 2010), tem-se uma distribuição heterogénea do tratamento, o que leva a uma não uniformização nos ganhos nos valores de permeabilidade, rigidez e resistência, é necessário assim corrigir este ponto para que a técnica prospere. Pela Figura 2.12, resultante ainda desse caso de estudo, é visível a não homogeneização do tratamento.



Figura 2.12 - Imagem de um tratamento de bio-cimentação a larga escala. Adaptado de van Paassen et al. (2010).

Com um bom tratamento de MICP, são criadas pontes de calcite no espaços vazios dos poros que por sua vez aumentam a resistência dos solos, representado na Figura 2.13. No entanto, estas pontes, ao longo do tempo, podem ser quebradas por se poder dar a dissolução do precipitado de calcite (Filet et al., 2020). Ou seja, é necessário assegurar um pós tratamento que garanta a continuidade do mesmo e a sua respetiva resistência. Tal como exposto no caso de estudo 2 (Gomez et al., 2015), é necessário prever a evolução do comportamento, ao logo do tempo, dos materiais tratados com esta técnica, e em particular devido às ações atmosféricas, o que é uma realidade recorrente em obras de construção.

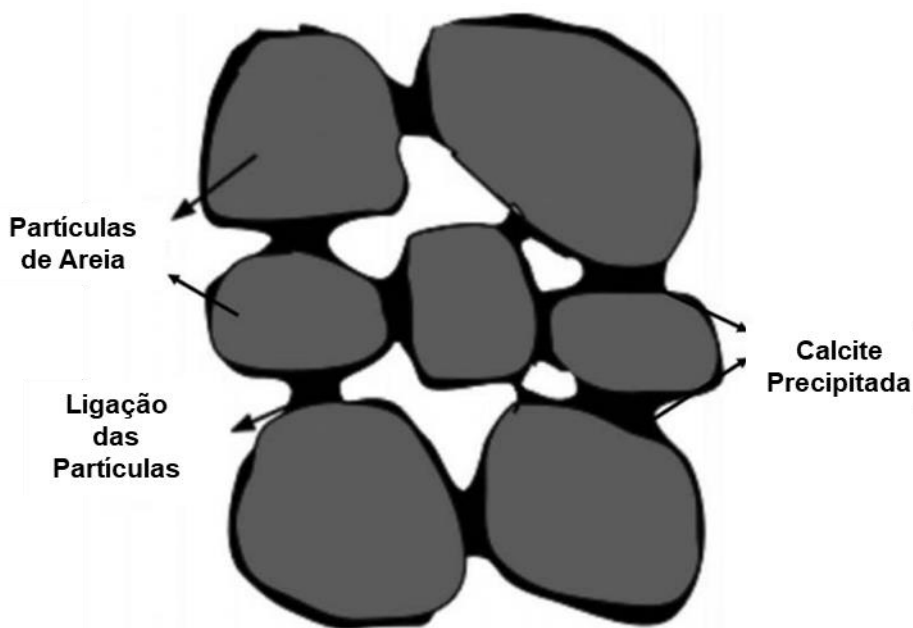


Figura 2.13 – Representação esquemática das pontes de calcite formadas. Adaptado de Mujah et al. (2017).

Apesar destas limitações e por esta técnica ser recente e não existirem casos de obra suficientes para por à prova a sua durabilidade, uma das formas usuais de a garantir é tentar que o carbonato de cálcio formado seja sob a forma mineral de calcite, pois este mineral é insolúvel em água e por isso mais duradouro.

Nesta tese vai-se analisar a influência do tempo de alimentação e conseqüente aumento da quantidade de bio-cimento precipitado, na melhoria do comportamento do solo à compressão, medido através de ensaios edométricos. A durabilidade é analisada indiretamente através da análise do mineral correspondente ao bio-cimento produzido e se há alterações em função da duração do tratamento.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é feita uma apresentação pormenorizada de todos os procedimentos adotados nos laboratórios de Engenharia Civil (Geotecnia) e de Engenharia Biológica do IST.

Como já referido, vai-se analisar a influência da duração do tratamento na melhoria do comportamento do solo à compressão, medida através de ensaios edométricos. Vai-se também analisar a durabilidade de forma indireta através da análise do mineral correspondente ao bio-cimento produzido em função da duração do tratamento. Para tal, foram definidos três tipos de tratamento a aplicar em provetes preparados com solo proveniente de um caso-estudo. Os provetes foram preparados de forma semelhante e depois sujeitos a três tipos diferentes de tratamento: com água, com solução de alimento e com bactérias. O tratamento tanto com água tanto com solução de alimento permitiu servir de referência e controlo, respetivamente, para comparação com os resultados dos ensaios do tratamento com bactérias e assim compreender de que forma a presença do bio-cimento está a afetar o comportamento observado.

Inicialmente, são descritos todos os métodos de caracterização do solo, bem como todo o procedimento de montagem e tratamento das amostras a serem ensaiadas. Posteriormente, são apresentadas as técnicas utilizadas no processo de crescimento e desenvolvimento das bactérias, da preparação do meio de cultura e da solução de alimento.

#### 3.1. Solo Utilizado

Para esta análise, foi utilizado solo proveniente de um possível caso de estudo a realizar pelo IST com a colaboração da Soletanche Bachy. Este caso consiste na bio-estabilização de um talude na auto estrada A13, mais especificamente no km 32+700, para evitar o ravinamento.

Abaixo, na Figura 3.1, apresenta-se uma representação esquemática das 3 zonas desse mesmo talude, tendo sido o terreno da zona I o utilizado para o desenvolvimento laboratorial.

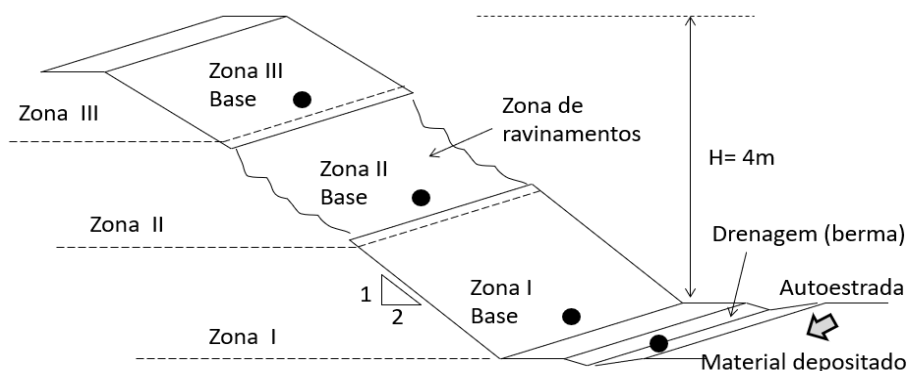


Figura 3.1 - Representação esquemática do talude de onde provém o solo em estudo.

Na Figura 3.2, encontra-se a fotografia do talude em campo, onde a vermelho, está representada a zona de onde provém o solo usado neste estudo.



Figura 3.2 - Talude em campo.

Como ponto de partida para a caracterização do solo escolhido, foi realizada uma análise granulométrica. A partir da mesma (Figura 3.3) verificou-se que a percentagem de finos era de cerca de 2 % sendo os coeficientes de uniformidade e de curvatura, respetivamente, 3,40 e 1,42. Com estas informações e pela classificação unificada dos solos, o solo foi caracterizado como uma areia bem graduada (SW).

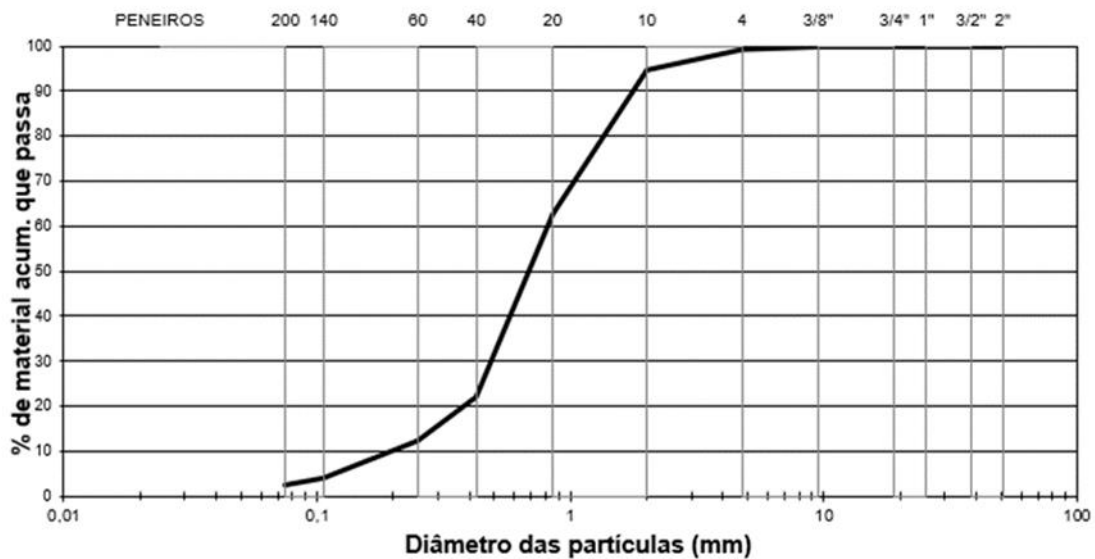


Figura 3.3 - Curva granulométrica do solo tratado.

De seguida, através do método do picnómetro, foi possível averiguar o valor da densidade das partículas, tendo esse valor sido de 2,61. Para o erro ser minimizado, foram realizados 3 ensaios. A partir dos mesmos foi medido o pH através das tiras de teste, o valor obtido foi de cerca de 6,5, um valor que se revela bastante favorável a este tipo de tratamento pois pode facilmente subir para os valores ideais de pH 9,0 (Ng et al., 2012)

### 3.2. Preparação das Bactérias

As bactérias usadas neste estudo foram as *Bacillus Pasteurii* que têm um processo de crescimento bastante moroso. Para serem atingidas as condições desejadas é necessário que sejam cultivadas várias vezes, porém para se evitar a repetição de trabalho, recorreu-se ao procedimento de liofilização das bactérias, que consiste na secagem das mesmas para que estas estejam sempre prontas a serem utilizadas, sem que se seja necessário estar sempre a crescê-las.

Para se iniciar o processo é necessário definir a solução de stock para o meio de cultura inicial. Esta é constituída por extrato de levedura (YE), sulfato de amónio (AS), TRIS e água destilada ( $dH_2O$ ).

Como a produção de *B. Pasteurii* tem de ser feita em larga escala, o seu procedimento de desenvolvimento é feito por etapas, com incremento sequencial de volume. O procedimento desenvolvido em cada etapa é em tudo semelhante, variando apenas as quantidades utilizadas.

Na Tabela 3.1 encontram-se as respetivas quantidades e concentrações dos reagentes.

Tabela 3.1 – Concentrações finais desejadas da solução de stock inicial.

	Concentração
Yeast Extract - YE	20 g/l
Sulfato de Amónio -AS	10 g/l
TRIS	0,13 M
Água Destilada - dH2O	1 l

A partir da informação anterior e através da equação  $C_i V_i = C_f V_f$  foi possível determinar a quantidade de reagentes para perfazer as quantidades referidas de meio de cultura. No Anexo 1-1. encontram-se os cálculos detalhados dos reagentes para os restantes meios de cultura.

Como primeiro passo, são preparados cinco pré inóculos de 5 ml respeitando as quantidades acima referidas. Após esse processo são colocados num incubadora com agitação orbital e são deixados durante a noite para que no dia seguinte se consiga uma quantidade de bactérias suficiente para iniciar o crescimento num volume de meio de cultura maior.

Passadas as 24h é preciso medir a densidade óptica ( $DO_{600}$ ) dos quatro pré-inóculos de 5 ml. No Anexo 1-2., encontram-se os valores registados.

As medidas de  $DO_{600}$  acima de 1 são imediatamente rejeitadas. De seguida, é determinado o volume de células do pré-inóculo a introduzir no balão de 20 ml para que este comece com uma  $DO_{600}$  de 0,1, Anexo 1-3.

Tal como nos primeiros inóculos, estes são também colocados num incubadora com agitação orbital e são deixados durante a noite.

O procedimento anterior é repetido desta vez para se poder inocular um balão com 200 ml de meio. Os valores da  $DO_{600}$  dos balões volumétricos de 200 ml após as 24 h encontram-se no Anexo 1-4.

A partir desses valores e para garantir uma  $DO_{600}$  final de 1 foram feitas outras três amostras com os volumes retratados no Anexo 1-5.

Utilizando cerca de  $\frac{1}{10}$  do volume final procede-se à execução da solução de stock para a liofilização. Esta é constituída por 10% de Sacarose e 10% de Cloreto de Amónio ( $NH_4Cl$ ).

Tendo em consideração a concentração que se pretende de cada reagente (Tabela 3.2) e o volume final que se pretendem, conclui-se a massa a retirar de Sacarose e  $NH_4Cl$  (Equação 3-1).

Tabela 3.2– Concentrações finais desejadas da solução de liofilização.

Reagente	Concentração
Sacarose	100 g/l
$NH_4Cl$	100 g/l
Água MilliQ	:

$$c = \frac{m}{V} \leftrightarrow 100 = \frac{m}{0,063} \leftrightarrow m = 6,3g \text{ de Sacarose e } NH_4Cl$$

Equação 3-1

Após estas medidas, é utilizada a centrífugadora para separar as bactérias do meio. Depois do tratamento na centrífugadora, resulta o sobrenadante, ou seja, as bactérias estão separadas do meio.

De seguida, a partir da solução de stock coloca-se de novo com as bactérias. Depois de misturada a solução com as bactérias são retirados 1,5ml dessa nova cultura e colocados em tubos *Falcon* de 15ml.

Por fim, é colocada na máquina para liofilizar durante 24h, esta provoca o vácuo o que faz com que a água se retire. Após este tempo, as bactérias encontram-se liofilizadas e prontas a ser usadas quando necessárias.

### 3.3. Preparação da Solução de Alimento

Para que o processo de MICP se desencadeie é necessário fornecer às bactérias a sua solução de alimento. Esta contém os nutrientes necessários para que se mantenham fisiologicamente ativas, ou seja, capazes de produzir urease. E também é preciso fornecer uma fonte de cálcio se se pretender que produzam carbonato de cálcio.

Na tabela abaixo encontra-se um quadro resumo com todos os reagentes que constituem 1L de solução de alimento e as respetivas quantidades. Neste caso, a fonte de cálcio é o cloreto de cálcio,  $CaCl_2$ . Os cálculos realizados para serem obtidos estes valores aparecem no Anexo 2.

Tabela 3.3 - Quantidades necessárias para se produzir 1L de solução de alimento.

Reagente	Quantidade
$CO(NH_2)_2$	30,03 g
$CaCl_2$	55,40 g
$NaHCO_3$	2,12 g
$NH_4Cl$	10,00 g
Extrato de levedura	2,00 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,00 g

### 3.4. Montagem de Provetes

Foram definidos 3 tipos de tratamento a aplicar nas amostras: com água, com solução de alimento e com bactérias.

O tratamento com água serviu como referência para os restantes.

O tratamento com solução de alimento serviu como controlo e foi feito para provar que só os reagentes, como o cloreto de cálcio, um dos componentes da solução de alimento, não possibilita por si só a ocorrência de precipitado de carbonato de cálcio em quantidades suficientes para conferir alguma resistência ao solo.

O tratamento com as bactérias permitiu perceber se, com a sua existência, é potenciada a formação de bio-cimento.

Todos os provetes, referência, controlo e bactérias, foram preparados da mesma maneira diferindo na presença das bactérias.

Foram montados provetes de solo no interior de anéis de aço com 70 mm de diâmetro e 20 mm de altura para serem sujeitos a tratamento com água, solução de alimento e tratamento por bio-cimentação (bactérias e solução de alimento) com 4 durações diferentes. Para todos os tipos de tratamento, o solo foi compactado já a pensar que seria sujeito a um ensaio edométrico no final do tratamento. Abaixo, na Figura 3.4, encontra-se essa representação.

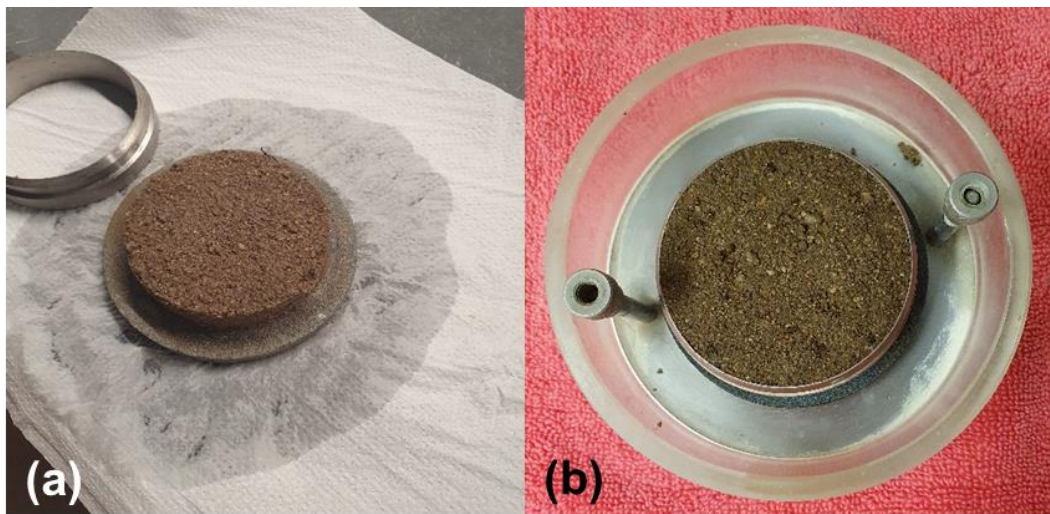


Figura 3.4 – Montagem inicial dos provetes tratados: a) amostra montada para testar a técnica; b) amostra preparada com água.

Como ponto de partida para a definição das quantidades necessárias em cada amostra, foi estabelecido o peso volúmico aparente seco e o teor em água, respetivamente,  $16,5 \text{ kN/m}^3$  e 5%, idênticos aos valores do solo no talude real já apresentado.

Posto isso, foi possível calcular a massa de sólidos e a massa de água ou de solução de alimento, caso esse fosse o pretendido.

De seguida, apresentam-se os cálculos para a obtenção desses valores.

$$V_{anel} = \pi \times \frac{7^2}{4} \times 2 = 76,97 \text{ cm}^3$$

$$M_s = V_s \times \frac{\gamma_d}{10} = 76,97 \times \frac{16,5}{10} = 127 \text{ g/anel}$$

$$M_w = \omega \times M_s = 0,05 \times 127 = 6,35 \text{ g/anel}$$

Com estes dados foi então possível compactar o solo no anel do edômetro para posteriormente ser levado para tratamento.

### 3.5. Procedimento Adotado para o Tratamento

Para uma melhor apreciação do potencial da utilização do MICP foi adotado um protocolo que permitisse uma comparação quantitativa entre os diferentes tratamentos aplicados. No total foram preparados seis provetes, dois deles simplesmente submersos em água ou solução de alimento, e quatro provetes tratados com bactérias e solução de alimento, mas com durações de tratamento diferentes.

O provete tratado com água serviu de referência e o provete tratado com solução de alimento serviu de controle. É importante adicionar apenas alimento ao solo porque esta solução já contém os reagentes para formar carbonato de cálcio, além de que pode alimentar bactérias existentes no solo já que este não foi esterilizado.

Em relação aos quatro provetes tratados por bio-cimentação, ou seja onde se adicionou bactérias e solução de alimento, a primeira fase do processo foi semelhante para todos e ocorreu em simultâneo (Figura 3.5).



Figura 3.5 – Disposição dos 4 provetes tratados com bactérias

Esta consistiu numa operação de 3 dias onde foi feita uma injeção de solução de bactérias, esquematizado na Figura 3.6 (a), e uma rega superficial de solução de alimento a cada 24 horas, representado na Figura 3.6 (b). No final desta fase, o provete 1 foi de imediato submetido ao ensaio edométrico enquanto que os outros seguiram para a segunda fase.

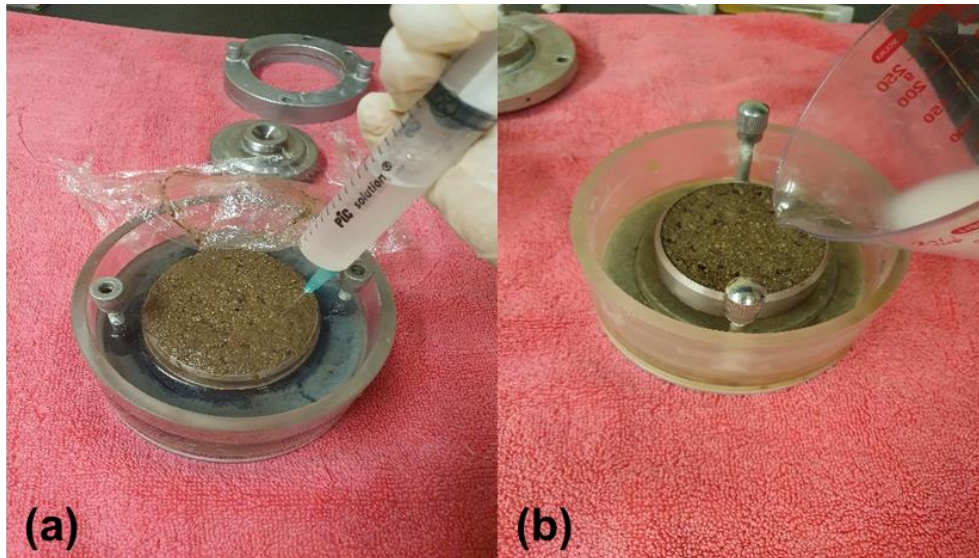


Figura 3.6 – Primeira fase da primeira etapa de tratamento com bactérias. (a) Injeção de bactérias (b) rega superficial com solução de alimento.

Para a etapa seguinte, os restantes provetes foram injetados com a solução de alimento a cada 24 horas durante 3, 8 e 14 dias, respetivamente para os provetes 2,3 e 4. Após esta operação foram todos submetidos ao ensaio edométrico. Na Figura 3.7 encontra-se um dos ensaios edométricos a decorrer onde se pôde visualizar a grande atividade bacteriana no topo do edómetro.



Figura 3.7 - Ensaio edométrico do provete.

Para uma melhor compreensão de todo o processo envolvido no tratamento dos provetes, abaixo na Figura 3.8, encontra-se uma representação esquemática de todo o protocolo adotado.



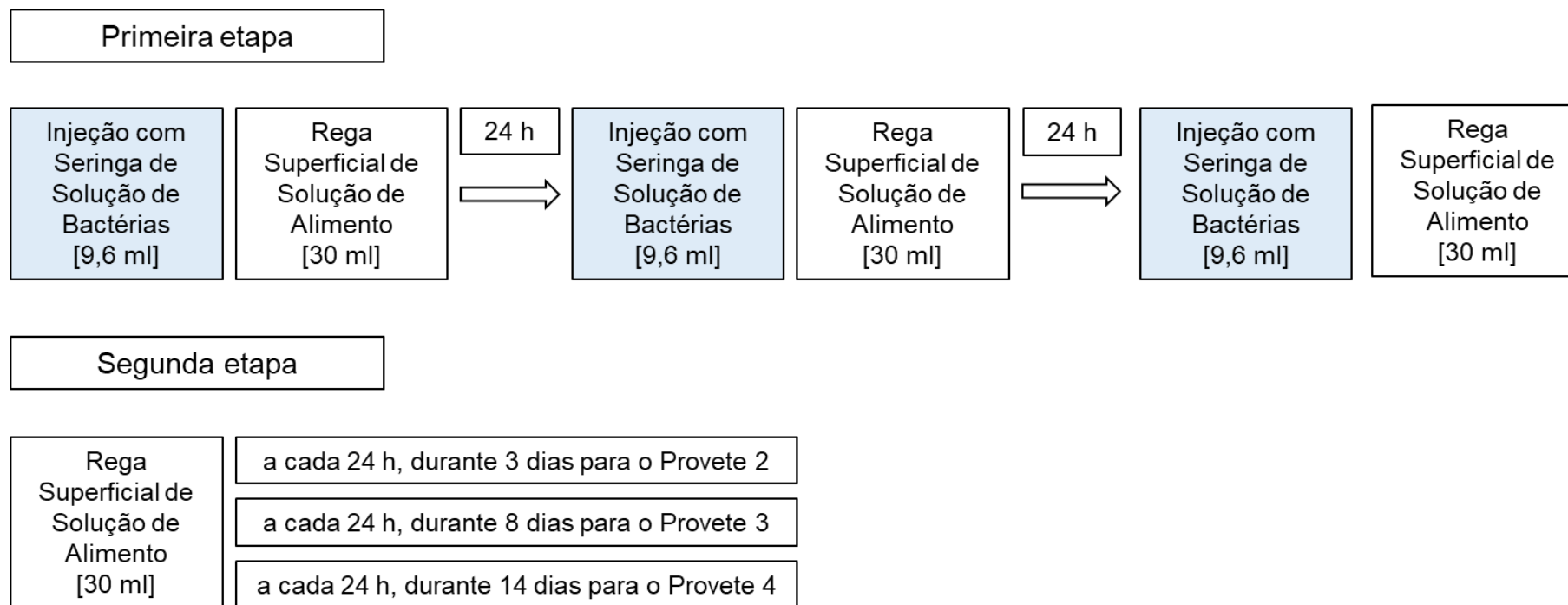


Figura 3.8- Representação esquemática do protocolo adotado para o tratamento dos provetes.

Finalmente, as características de todas as amostras apresentam-se na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Características da montagem de todos os provetes ensaiados.

Provete	Índice de vazios inicial	$\gamma_d$ (kN/m <sup>3</sup> )	Observações
Água	0,68	15,5	Referência
Solução de alimento	0,62	16,1	Controlo
Provete 1	0,66	15,7	Ensaída após 0 dias de tratamento
Provete 2	0,60	16,3	Ensaída após 3 dias de tratamento
Provete 3	0,64	15,9	Ensaída após 8 dias de tratamento
Provete 4	0,63	15,8	Ensaída após 14 dias de tratamento

## 4. ENSAIOS E RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os ensaios realizados nos diversos provetes tratados e os respectivos resultados. Trata-se de ensaios para a avaliação da rigidez conseguida com o tratamento em função da sua duração, e ainda para a confirmação da formação de precipitado e sua mineralogia.

Foram feitas análises para quantificar a presença de  $\text{CaCO}_3$  através de ensaios de lixiviação, análise de imagens de microscópio de varrimento de eletrões (SEM), caracterização química por espectroscopia de difração de raios-x e porosimetrias por intrusão de mercúrio (MIP).

### 4.1. Análise por Difração de Raios-X, XRD

O carbonato de cálcio existe na natureza sob a forma mineral de calcite, vaterite e aragonite. A sua formação depende das condições ambientais de precipitação, nomeadamente do pH e da temperatura. A calcite é a forma mais estável de carbonato de cálcio porque é insolúvel, e é portanto a que se pretende que precipite no solo para efeitos de durabilidade do tratamento. Para averiguar a presença de cristais de carbonato de cálcio e a sua forma mineral procedeu-se a uma análise de difração de raios-x, XRD. Esta análise foi realizada no Laboratório de Minas e Georrecursos.

A difração de raios-x 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. Pela sua análise, é obtido um *score* relativo à sobreposição dos picos característicos das amostras com os picos característicos dos minerais contidos em bases de dados referenciadas. Estes valores dão a conhecer a presença dos determinados minerais presentes.

Na Tabela 4.1, encontra-se o quadro resumo com os minerais identificados em cada provete estudado. Os materiais predominantes têm maiores valores de "Mineral score".

Em todas as amostras verificou-se a predominância de minerais silicatos, provenientes da areia, seja sob a forma de quartzo, microcline ou muscovite.

As amostras de água e de solução de alimento serviram como referência para avaliar a eficiência do tratamento com bactérias. Essa avaliação foi determinada pela presença dos minerais de carbonato de cálcio, sendo a calcite e a vaterite as formas mais e menos estáveis, respetivamente. Pelos valores da tabela, consegue perceber-se que os valores de vaterite são maiores nos provetes 1 e 2 que nos provetes 3 e 4, e que existe um crescente *score* de calcite do provete 1 para o provete 4. A explicação para este fenómeno assenta no número de dias de

alimentação e as suas respectivas quantidades. Quanto maior for a quantidade de solução de alimento providenciada, mais tempo o carbonato de cálcio tem para se precipitar, o que leva à formação de minerais mais estáveis tais como a calcite.

Tabela 4.1 - Minerais identificados em cada provete.

Mineral/ Score	Água	Alimento	Provete 1	Provete 2	Provete 3	Provete 4
Quartzo	80	67	56	59	59	66
Microcline	47	25	27	27	16	21
Muscovite	17	-	-	11	-	10
Calcite	-	5	32	41	51	57
Vaterite	-	-	28	28	22	12
Albite	41	13	25	20	-	10
Ilite	-	15	12	-	-	-

## 4.2. Microscopia de Varrimento de Eletrões (SEM)

Para confirmar a existência de cristais de bio-cimento nos espaços vazios do solo recorreu-se ao microscópio de varrimento de eletrões (SEM) e à técnica de espectroscopia de raios-x por dispersão de energia (EDS).

O SEM é um tipo de microscópio que produz imagens de uma amostra através de digitalização utilizando um feixe de eletrões. Estes interagem com os átomos existentes produzindo assim vários sinais que contêm informações sobre a topografia da superfície e a sua composição química. Para que esta técnica seja possível de aplicar, as amostras tem de ser eletricamente condutoras, pelo menos à superfície, por esse motivo, todas as amostras ensaiadas foram previamente banhadas com uma solução composta por ouro e paládio.

O sistema de EDS, em que a caracterização química resulta da interação do feixe de raios-x com amostra, baseia-se no princípio de que cada elemento tem uma estrutura única, o que vai permitir a existência de apenas um pico no espectro de emissão eletromagnética. Este sistema encontra-se incorporado no SEM. Com a técnica EDS não se detetam minerais, mas apenas elementos. Assim, deteta-se a presença de cálcio mas não se sabe se é porque é calcite, vaterite ou cloreto de cálcio da solução de alimento. Na Figura 4.1, encontra-se uma representação do processo de análise EDS, onde o retângulo amarelo da figura corresponde ao local escolhido para ser feita a investigação.

A partir desta técnica, foi possível comparar as imagens obtidas nas amostras de solo não tratado com as imagens das amostras de solo com presença de bactérias, representadas na Figura 4.2 (a) e (b), respetivamente.

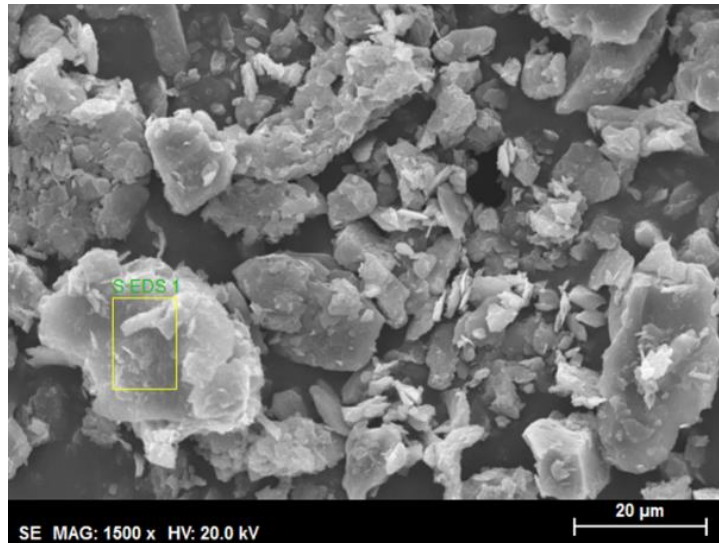


Figura 4.1 - Representação da análise EDS.

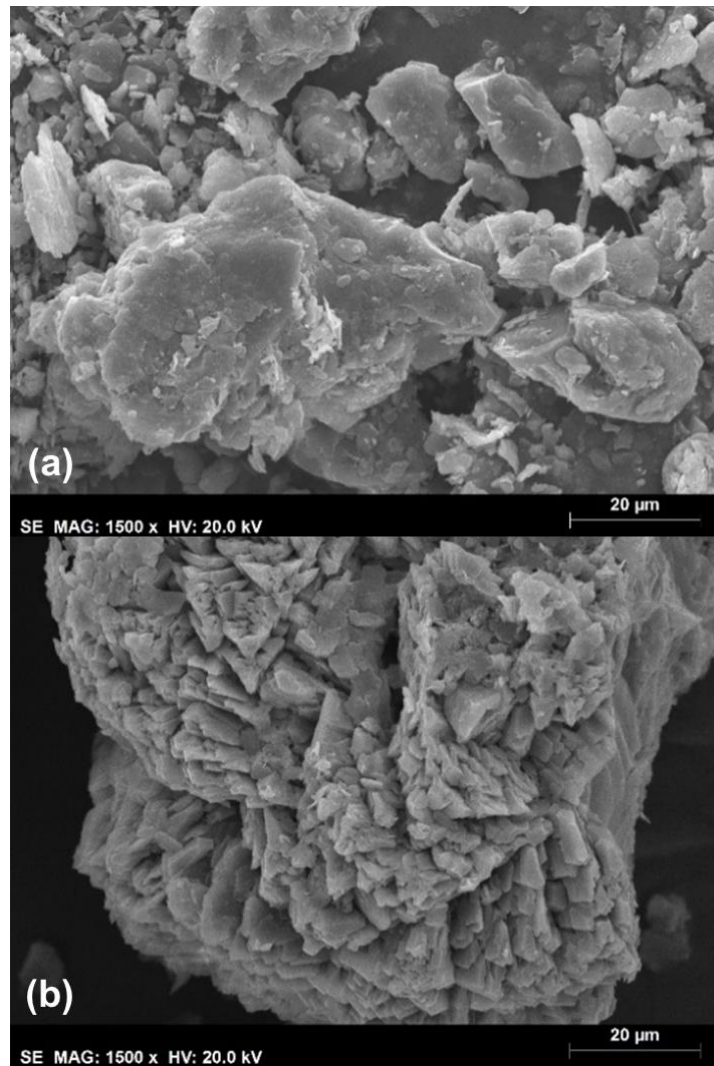


Figura 4.2 – Imagens SEM de solo não tratado (a) e solo tratado (b).

Em todas as amostras, verificou-se uma predominância de silício (Si), presente no quartzo da areia, alumínio (Al), presente na argila, e outros elementos químicos tais como, oxigênio (O), potássio (K), ferro (Fe), ouro (Au) e paládio (Pd). Sendo os últimos dois elementos provenientes da cobertura condutora utilizada na preparação das amostras. Na Figura 4.3 aparece a ilustração do dito acima.

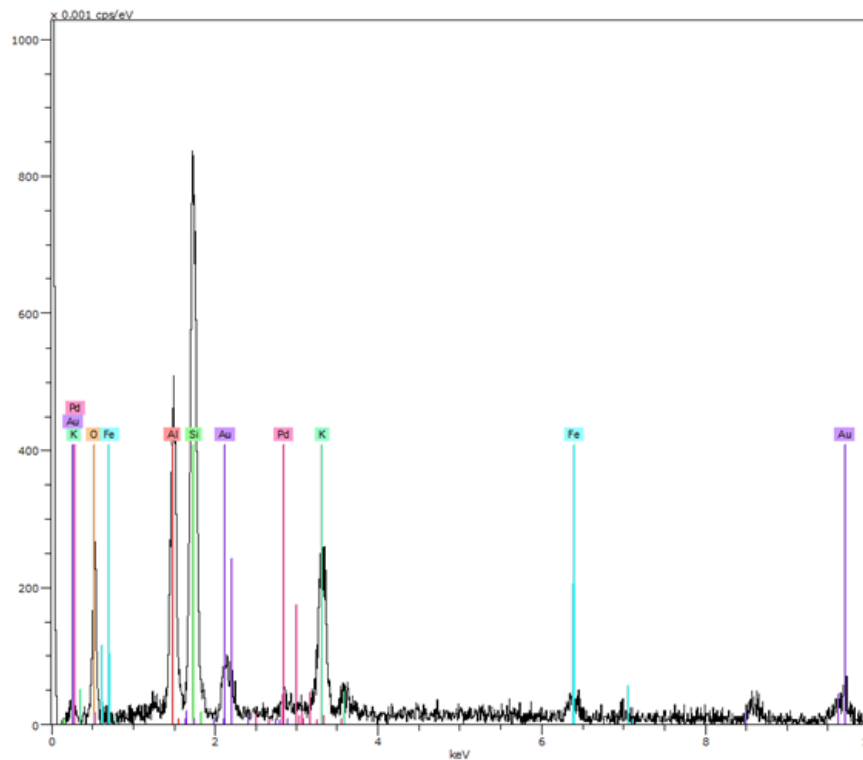


Figura 4.3 - Resultados da análise EDS.

No provete 1, onde não foi fornecida solução de alimento após a conclusão da primeira etapa de tratamento, conseguiu observar-se a formação de um precipitado de carbonato de cálcio sob uma forma esférica (Figura 4.4). No provete 2, onde foi dada a solução de alimento durante 3 dias, os resultados assemelharam-se aos do provete 1, como se pode ver pela estrutura cristalina esférica representada na Figura 4.5. Ambas as análises EDS dos provetes constataram um valor aumentado de cálcio em comparação com os valores das amostras não tratadas.

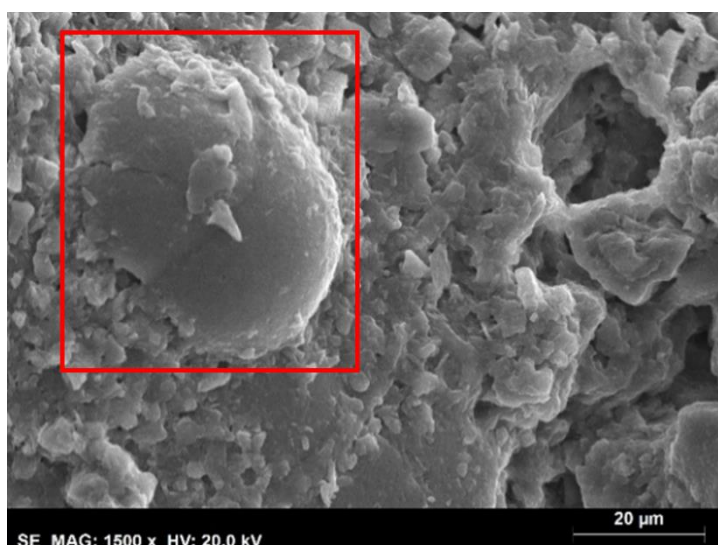


Figura 4.4 - Imagem SEM provete 1.

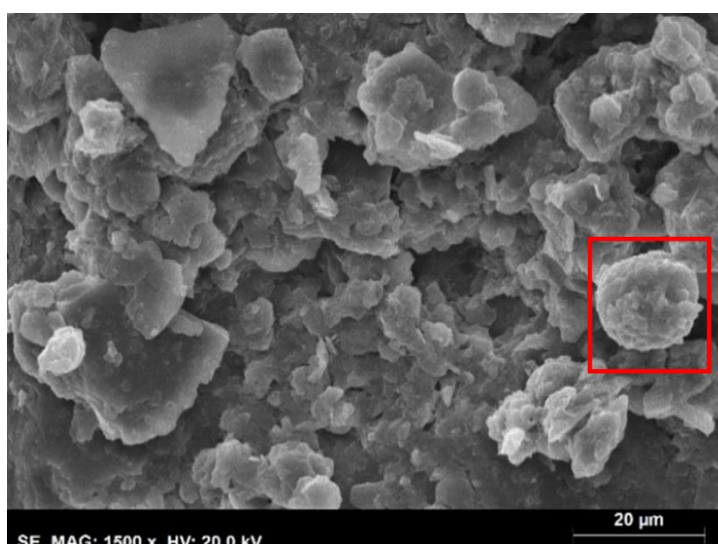


Figura 4.5 - Imagem SEM provete 2.

No provete 3, onde foi aplicada a solução de alimento durante 8 dias, encontrou-se um arranjo de precipitado de  $\text{CaCO}_3$  diferente dos anteriores. Este apresentava uma estrutura laminar com sobreposição de camadas (Figura 4.6), forma que se assemelhava ao descrito por Terzis (Terzis 2016) e representado na Figura 4.7. Ainda na Figura 4.6, nas setas a vermelho, são visíveis os locais onde as bactérias se alojaram. Na análise EDS, para além dos elementos esperados, também foram detetados vestígios de cloro que são explicados pela não saturação da solução de alimento.

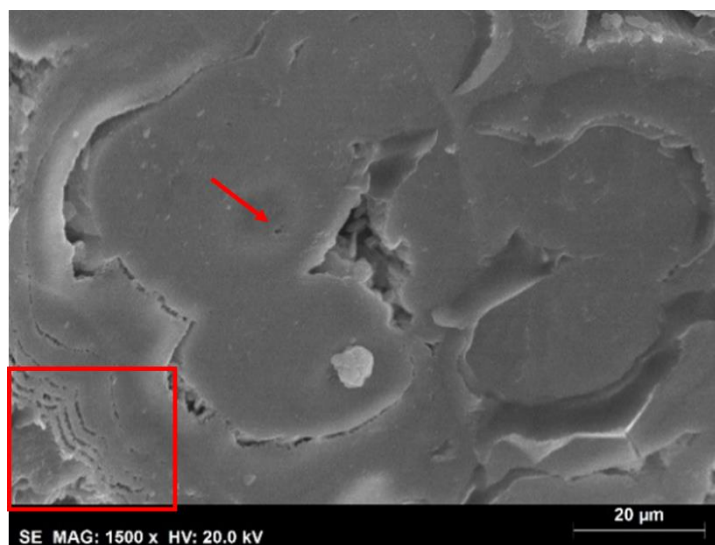


Figura 4.6 - Imagem SEM provete 3.

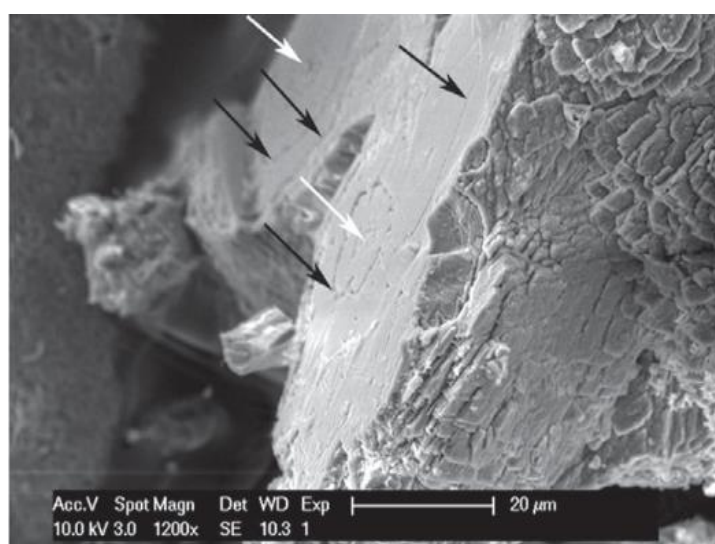


Figura 4.7 - Imagem SEM Terzis.

No provete 4, onde a solução de alimento foi fornecida durante 14 dias, conseguiram-se observar estruturas cúbicas de carbonato de cálcio, um dos arranjos mais favoráveis e estáveis (Figura 4.8). Por tal fato e sendo corroborado pela análise EDS, o provete 4 foi a amostra que maior quantidade do elemento químico Ca apresentava. Neste provete, foi visível a formação de cristais com estrutura cúbica, que são semelhantes aos cristais de calcite. Esta informação, juntamente com os dados da análise XRD, confirma que se formou calcite neste provete.



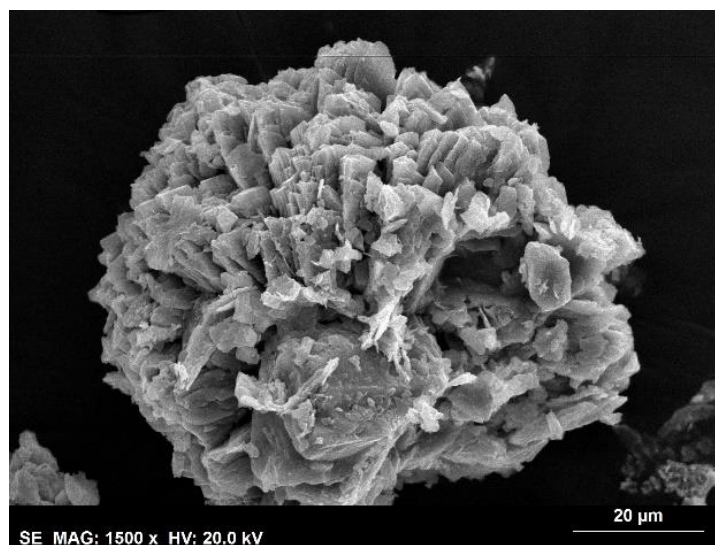


Figura 4.8 - Imagem SEM provete 4.

Relacionando todas as informações do microscópio de varrimento com a sua respectiva análise EDS pôde-se aferir que todas as amostras tratadas apresentaram carbonato de cálcio sob alguma forma de arranjo. Tratar-se de calcite ou de outra forma cristalina de carbonato de cálcio parece estar ligada ao tempo despendido nos ensaios, formando-se calcite apenas nos ensaios com maior duração de tratamento (Provetes 3 e 4).

### 4.3. Porosimetria por intrusão de mercúrio (MIP)

Para perceber a evolução do tamanho dos poros do solo ao longo do tempo, foram realizados testes de porosimetria por intrusão de mercúrio (MIP) a todas as amostras.

A porosimetria por intrusão de mercúrio funciona a partir da injeção de um dado volume de mercúrio com determinada pressão. Este é um fluido não molhante, ou seja, não provoca qualquer tipo de reação físico e/ou química, o que permite preencher os poros e extrair uma curva de distribuição do tamanho dos vazios em relação ao volume total dos vazios nas amostras testadas.

Explorando as amostras dos provetes tratados com água e alimento, presentes na Figura 4.9, verifica-se que possuem uma curva de distribuição de dimensão de vazios muito semelhante, o que era o esperado. A curva apresenta-se bastante deslocada para a direita, o que significa que existe uma grande quantidade de vazios com uma grande dimensão (cerca de  $100000 \text{ nm} = 100 \mu\text{m} = 0,1 \text{ mm}$ ). As diferenças ao nível das menores dimensões eventualmente poderão ser explicadas por alguma reação química entre a solução de alimentação e minerais argilosos (illite, ver Tabela 4.1) presentes no solo.

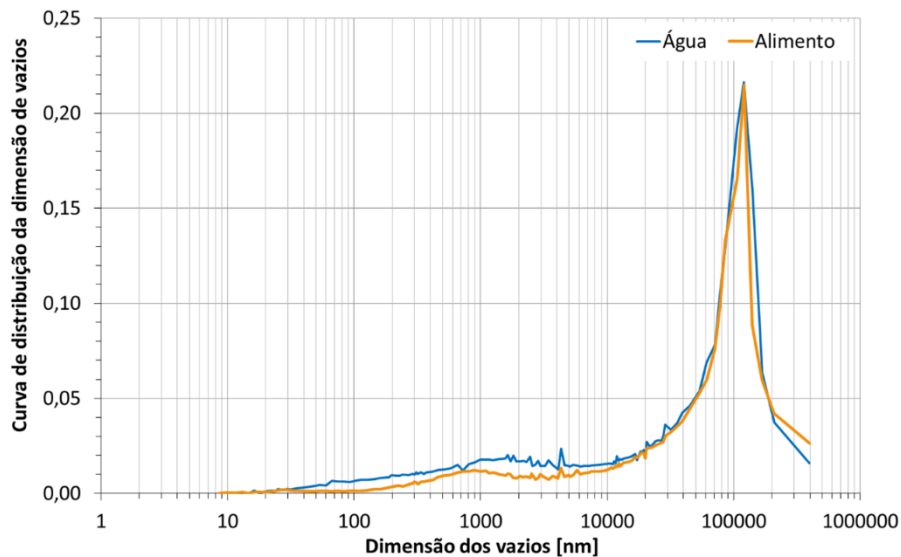


Figura 4.9 - Curva de distribuição da dimensão dos poros para as amostras de água e solução de alimento.

Avaliando as curvas para os 4 provetes tratados com bio-cimento, apresentadas na Figura 4.10, percebe-se que com o aumento de número de dias de tratamento, existe uma diminuição clara na dimensão dos vazios de maiores dimensões. Esta conclusão é retirada pelo fato de que para o provete 4 a curva se situar ligeiramente mais para a esquerda do que todas as outras amostras (as dimensões predominantes identificadas pelos picos passaram de 85000 nm no provete 1 para 70000 nm no provete 4). O provete 4 apresenta uma proporção de vazios com tamanhos menores, que faz dele o mais rico em bio-cimento. Em rigor pode afirmar-se que para todos os provetes tratados houve uma redução do tamanho dos poros pois ocorreu a sua colmatção com carbonato de cálcio, que parece ter sido tanto maior quanto maior a duração do tratamento.

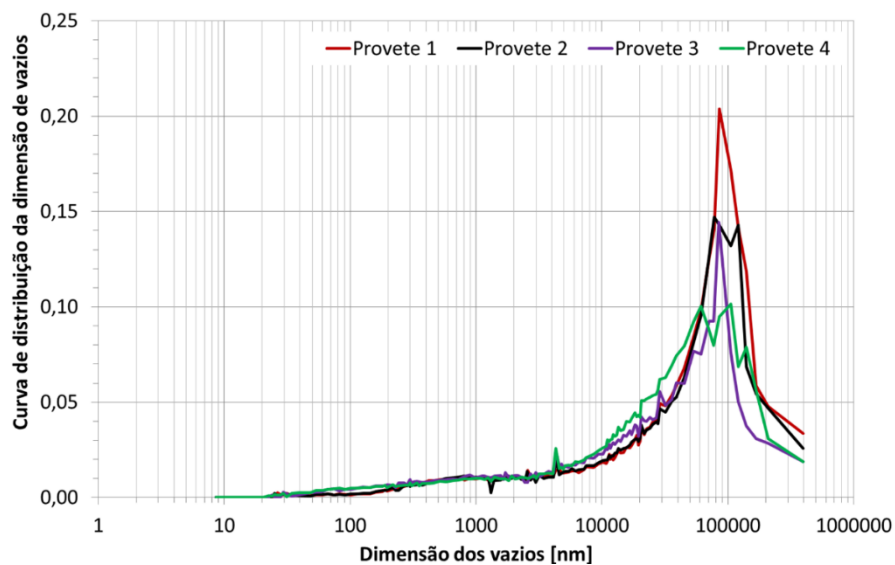
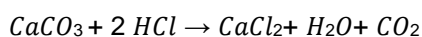


Figura 4.10 - Curva de distribuição da dimensão dos poros para os provetes 1, 2, 3 e 4.

#### 4.4. Quantificação do carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>)

Para a quantificação do carbonato de cálcio presente nas amostras, foi realizado o ensaio de lixiviação com recurso ao ácido clorídrico 0.5M. A utilização deste ácido permitiu que ocorresse a decomposição do carbonato de cálcio, que se encontra traduzido na Equação 4-1.



Equação 4-1

Como ponto de partida para o ensaio, foi necessário a secagem em estufa, de todas as amostras a serem ensaiadas e a medição do peso seco das mesmas. Após esse passo, procedeu-se à dissolução de precipitado com quantidade suficiente de ácido até que as amostras não demonstrassem mais libertação de gás. De seguida, e para a remoção dos sais cálcio (CaCl<sub>2</sub>), fez-se a lavagem do solo com água destilada. Por fim, as amostras foram secas em estufa e pesadas após a secagem, Figura 4.11.

Para os cálculos foi assumido que o teor em carbonato de cálcio seria correspondente à Equação 4-2:

$$\% \text{CaCO}_3 = \frac{m_f - m_i}{m_i}$$

Equação 4-2



Figura 4.11 - Secagem das amostras.

Sendo  $m_i$  e  $m_f$ , respetivamente, a massa da amostra antes e depois do tratamento com o ensaio de lixiviação. Na Tabela 4.2, apresenta-se o quadro resumo com os valores do teor em carbonato de cálcio das várias amostras.

Tabela 4.2 - Quantificação do carbonato de cálcio.

	% $CaCO_3$
Água	2,165
Alimento	1,841
Provete 1	2,604
Provete 2	1,853
Provete 3	4,776
Provete 4	7,422

Numa primeira observação dos valores pode verificar-se que não existiu uma crescente subida nos valores da percentagem de carbonato de cálcio, o que seria de esperar. Isso deve-se ao fato de este processo ser heterogéneo e de a amostra recolhida pode não ter representatividade suficiente.

Relativamente aos provetes tratados com bactérias houve um aumento significativo de precipitação de  $CaCO_3$ . Quando comparados com a água, houve um aumento de precipitado de carbonato de cálcio de cerca de 3,4 vezes para o provete 4 e 1,2 vezes para o provete 1. Quanto ao provete 2 este apresenta uma quantidade inferior ao de referência, o que não era de esperar, no entanto isso pode dever-se ao fato de a parte do provete analisado ter menos bio-cimento, o que comprova a heterogeneidade deste processo. Apesar deste resultado, ainda se pode concluir que com o aumento de número de dias de tratamento, a percentagem de carbonato de cálcio aumenta.

Outro valor que destoa dos restantes é o da solução de alimento, pois era de esperar que a quantidade detetada fosse maior que o da solução de referência, com a água. Uma possível resposta para esta anomalia está no fato de a solução de alimento não possibilitar por si só a ocorrência de precipitado de carbonato de cálcio, o que reforça a importância das bactérias e da sua existência no processo de MICP.

No geral, pode dizer-se que houve um eficácia no tratamento dos provetes.

#### 4.5. Ensaio Edométrico

Para avaliar a compressibilidade (ou rigidez) do solo recorreu-se ao ensaio edométrico. Esta compressibilidade deverá diminuir para quantidades crescentes de bio-cimento, já que a presença deste mineral corresponde à presença de ligações entre as partículas.

O ensaio edométrico consiste em submeter um provete a carregamentos crescentes estando este confinado lateralmente e sujeito a drenagem livre. Com esta técnica, é possível prever os assentamentos que o solo sofre na sequência de variações volumétricas.

Neste trabalho, todos os provetes foram saturados, quer com água, quer com solução de alimento dependendo do tipo de tratamento, e a sua drenagem foi feita através de pedras porosas, colocadas no interior do edómetro no topo e na base dos provetes. Mantiveram-se as 24 horas como tempo entre cada incremento de tensão e cada carregamento duplicava o que se encontrava aplicado anteriormente. Na fase de descarga, foram retirados todos os carregamentos prévios. O carregamento foi idêntico em todos os provetes, tendo a duração total de 11 dias.

Com os ensaios edométricos, foram obtidas as leituras da altura da amostra ao longo do tempo para cada carregamento, tal como ilustrado na Figura 4.12.

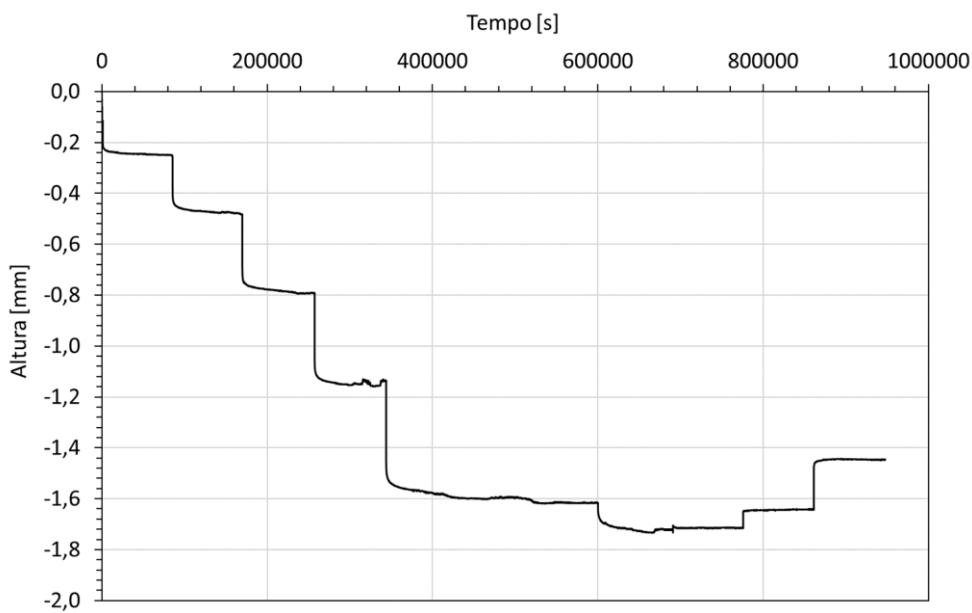


Figura 4.12 - Carregamentos e descargas feitas no provete que continha a solução de alimento.

As deformações calculadas troço a troço ( $\varepsilon_{vert}$ ) foram obtidas pela Equação 4-3, a partir da qual se conseguiu obter a Equação 4-4, que permitiu estimar a variação do índice de vazios ( $\Delta e$ ), em cada instante. Nas equações,  $H_0$  corresponde à altura inicial do provete e  $e_0$  ao valor inicial do índice de vazios.

$$\varepsilon_{vert} = \frac{\Delta h}{H_0}$$

Equação 4-3

$$\Delta e = \frac{\Delta h}{H_0} (1 + e_0)$$

Equação 4-4

Manteve-se o índice de vazios inicial após a montagem para todas as amostras, pois não foram medidos após o tratamento. Pela análise dos resultados dos ensaios MIP pensa-se que não terá havido colmatção dos vazios que tenha afetado o valor de  $e$  inicial.

Com estas informações, conseguiu traçar-se os resultados do ensaio no plano  $e - \sigma'$  e  $e - \log \sigma'$ . A partir dos mesmos foi possível obter o índice de compressibilidade  $C_c$  e o índice de expansibilidade  $C_s$  representados na Equação 4-5 e Equação 4-6, respetivamente, bem como a tensão de cedência, recorrendo para tal ao método de Casagrande.  $\sigma'_y$ ,

$$C_c = - \frac{\Delta e}{\Delta \log \sigma}$$

Equação 4-5

$$C_s = - \frac{\Delta e}{\Delta \log \sigma}$$

Equação 4-6

Como ponto de partida para a análise da rigidez das amostras, vale a pena analisar a trajetória  $e - \log \sigma'$  das amostras de referência e de controlo apresentadas na Figura 4.13. É de notar que para todas as curvas de compressibilidade apresentadas, o índice de vazios corresponde ao índice de vazios normalizado, isto serviu para poder comparar as várias amostras, uma vez que os índices iniciais são diferentes. No anexo 4 encontram-se as curvas de compressibilidade com o índice de vazios sem ser normalizado.

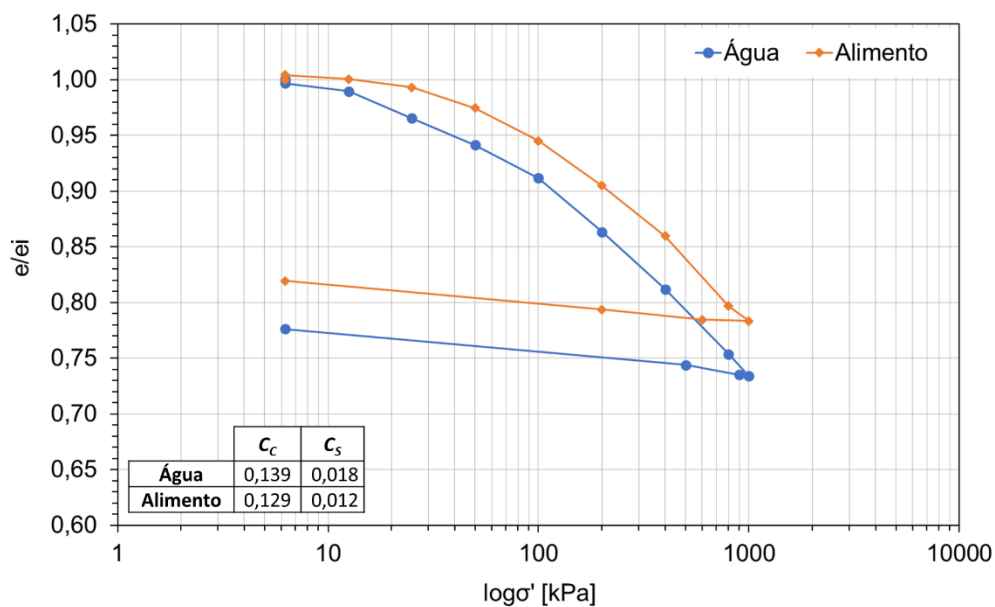


Figura 4.13 - Trajetórias  $e - \log \sigma'$  do solo obtidas a partir do ensaio edométrico das amostras de água e de alimento.

Começando com os valores do índice de compressibilidade, verifica-se que para a amostra com solução de alimento este valor foi superior ao da amostra com água (respetivamente,  $C_c=0,139$  e  $C_c=0,129$ ). Isto significa que para a solução de água a sua rigidez foi menor. Este resultado não correspondeu ao esperado, uma vez que por serem ambas amostras de um solo arenoso silicioso, por sua vez pouco reativo, deveriam apresentar valores similares. Uma possível explicação para o sucedido pode ser a sensibilidade que os minerais do solo apresentam ao pH, ou por poder ter havido a formação de bio-cimento produzido por bactérias naturalmente existentes no solo. Pode também ser apenas erro experimental.

Explorando as duas primeiras amostras tratadas, e comparando com a amostra de água (Figura 4.14), verificou-se que os valores para o índice de compressibilidade se apresentaram muito semelhantes, sem uma diferença significativa (0,119 e 0,115, valor médio 0,117). De facto, o valor do  $C_c$  diminui progressivamente, o que confirma um aumento de rigidez progressiva quando comparado com a amostra da água. Uma explicação para este acontecimento pode ser o tempo de tratamento. Por haver pouca diferença entre os provetes 1 e 2 poder ser que o tratamento estivesse a ser mais lento do que o previsto inicialmente. No entanto, verifica-se que há um ligeiro aumento da tensão de cedência com o tempo de tratamento, mas tal está associado a este provete ter um índice de vazios ligeiramente menor na montagem (ver anexo 4).

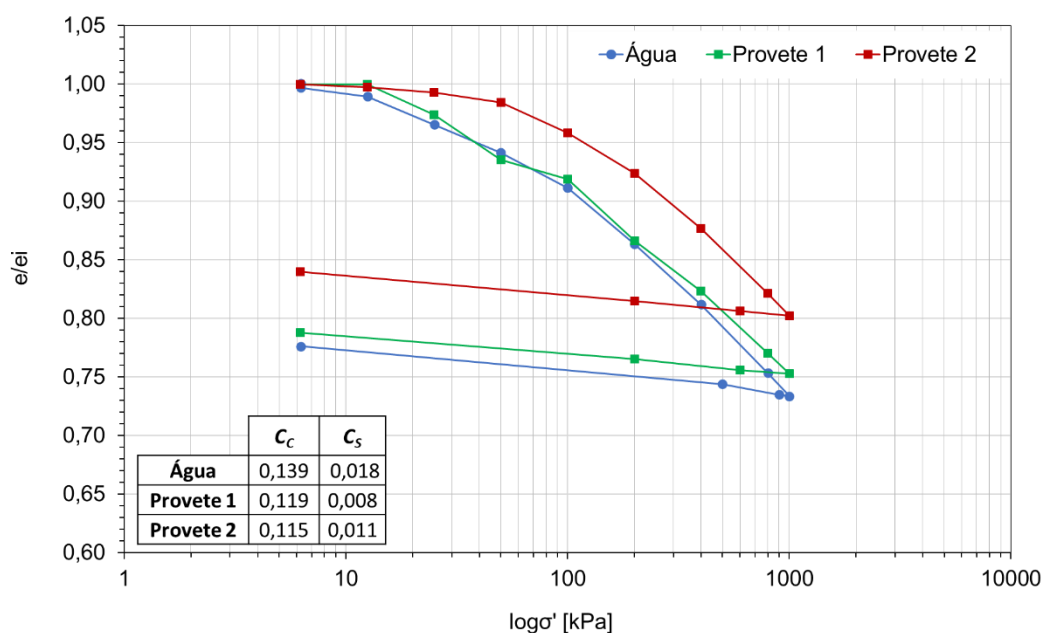


Figura 4.14 - Trajetórias  $e - \log \sigma'$  do solo obtidas a partir do ensaio edométrico das amostras de água e os provetes 1 e 2.

A comparação entre a trajetória  $e - \log \sigma'$  do provete 3 com a trajetória da água, não se apresenta porque o ensaio do provete 3 sofreu algumas perturbações. Para o provete 4, este não se alinha com as curvas apresentadas na Figura 4.14 provavelmente também devido a erro experimental.

A comparação entre a curva obtida para o provete 4 e o provete com água apresenta-se em seguida. Pela Figura 4.15, observa-se que as curvas da trajetória  $e - \log \sigma'$  são muito semelhantes, mas tal acontecimento não era o esperado. Examinando os valores de  $C_c$  verifica-se que não diferem muito. O resultado ligeiramente mais elevado do provete 4 podia ser justificado pelo fato de o bio-cimento ser em quantidade insuficiente, no entanto, pelas informações da análise por difração de raios-x, o provete 4 foi a amostra que mais calcite precipitou.

No entanto, vê-se que a tensão de cedência no provete 4 aumentou, tal como se verificou para os restantes provetes, o que pode ser explicado pela presença das ligações, que teve um efeito de sobreconsolidação do solo.

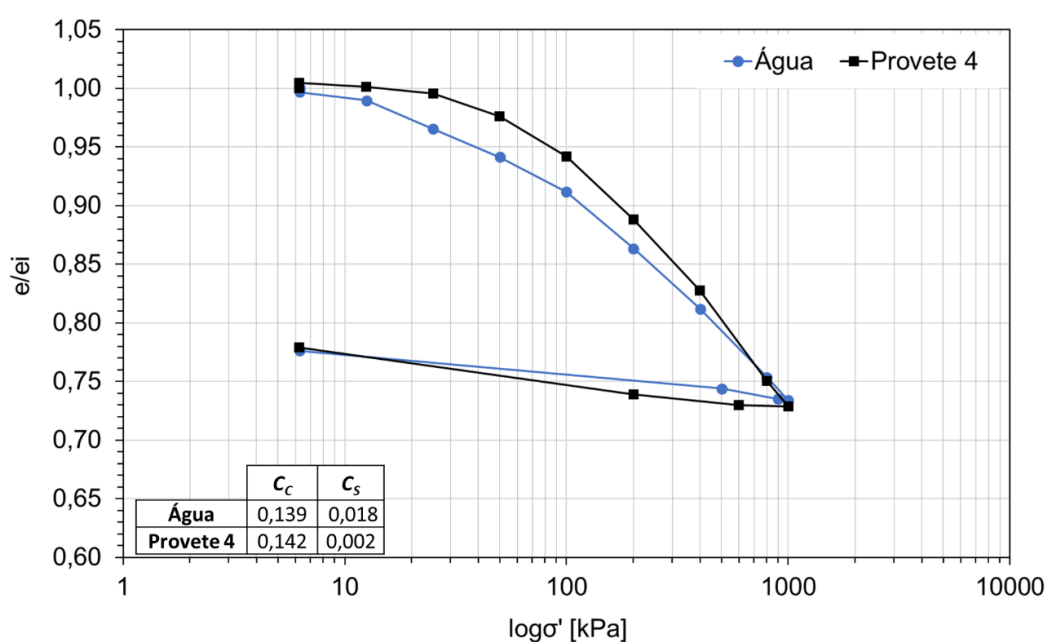


Figura 4.15 - Trajetórias  $e - \log \sigma'$  do solo obtidas a partir do ensaio edométrico das amostras de água e o provete 4.

A partir da Tabela 4.3 podem-se retirar as os valores correspondentes aos principais parâmetros na análise dos ensaios edométricos. Começando pelo valor de índice de expansibilidade ( $C_c$ ), verifica-se que este não se mantém constante ao longo dos vários ensaios, o que significa que poderá estar a haver interferência do bio-cimento, e eventualmente poderá querer dizer que as ligações estruturais se estão a romper devido ao efeito do carregamento. O valor de um  $C_c$  elevando neste provete 4 pode indicar a quebra de ligações entre as partículas, ou simplesmente erro experimental. Se se considerarem que todos os valores medidos para  $C_c$  estão muito próximos, descarta-se a ideia de haver ligações a afetar a compressibilidade do material. Neste caso, tal pode ser explicado pela sua rotura durante o processo de injeção da solução de alimento, ou serem descontínuas por ter havido interferência das partículas finas.



Estas 3 explicações podem ser usadas também para interpretar os valores medidos para  $C_s$  em todos os ensaios.

Tabela 4.3 - Quadro resumo dos principais parâmetros a analisar no ensaio edométrico.

	$C_c$	$C_s$	$\sigma'_y$
Água	0,139	0,018	80
Solução de alimento	0,129	0,012	69
Provete 1	0,119	0,008	58
Provete 2	0,115	0,011	83
Provete 4	0,142	0,002	67

#### 4.6. Resumo dos ensaios

Avaliando esta investigação em termos globais, verificou-se que existiram resultados interessantes e reveladores sobre a técnica.

Tendo o trabalho experimental sido iniciado pela realização dos ensaios edométricos, as suas conclusões foram algo inconclusivas. A rigidez não foi crescente com o aumento de número de dias de tratamento, o que se indicaria não ter ocorrido precipitação da calcite. No entanto, os ensaios de lixiviação mostraram a presença de carbonato de cálcio em todos os provetes, e em maior quantidade no provete 4. Para corroborar os conhecimentos adquiridos até aqui, através da porosimetria por intrusão de mercúrio (MIP) foi possível perceber a evolução do tamanho dos poros ao longo do tempo, o que para o provete 4, se traduziu numa diminuição clara na dimensão dos vazios de maiores dimensões. Tal confirmava um bom tratamento. Como prova final, pela microscopia de varrimento de elétrons foi possível averiguar a forma dos cristais de bio-cimento e confirmar a forma mais estável, presente no provete 4.

Cada ensaio realizado completou a informação que faltava ao anterior e confirmou várias informações. Do ponto de vista da compressibilidade, o tratamento aumentou a rigidez com o tratamento para os provetes 1 e 2, que foram os que tiveram menos tempo de tratamento, e portanto onde foram efetuadas menos injeções da solução de alimento com seringa no interior do solo. Seria de esperar um aumento de rigidez progressivo também para a amostra 4, como referido. Há várias explicações possíveis para tal não ter acontecido:

(i) Pode estar relacionado com o procedimento adotado para a injeção do alimento, com seringa no interior do provete, podendo este ser demasiado agressivo e levar à quebra de ligações entre as partículas.

(ii) Poderá ter havido rotura das ligações durante o carregamento, o que acontece em materiais cimentados artificialmente, mas será pouco provável porque as cargas aplicadas não foram muito elevadas.

(iii) Ou porque as ligações formadas não serem contínuas porque as partículas finas estariam a interferir com a fixação do bio-cimento nas partículas de areia.

Das três causas, julga-se que o mais provável é que estas injeções tenham sido demasiado agressivas e por isso terem rompido as ligações de bio-cimento entre as partículas, e daí não ter havido aumento de rigidez com os provetes 3 e 4. A rotura das ligações afetou a rigidez mas não a presença do bio-cimento que as compõe. Isto porque a precipitação de bio-cimento aumentou com o tempo de tratamento, tendo sido o provete 4 o provete com melhores resultados.

O aumento do tempo de tratamento e conseqüentemente o aumento da quantidade de solução de alimento levam a resultados melhores.

## 5. CONCLUSÕES E ESTUDOS FUTUROS

No decorrer da presente investigação realizaram-se estudos laboratoriais dos quais se retiraram as principais conclusões desta tese.

O presente capítulo constata essas mesmas conclusões e apresenta um conjunto de ideias para estudos futuros que poderiam complementar esta investigação e levar a resultados ainda mais promissores.

### 5.1. Conclusões

O objetivo principal deste estudo foi averiguar como é que a variação do tempo de tratamento dos provetes iria influenciar o comportamento mecânico dos solos e, indiretamente, a sua durabilidade. Para tal, no decorrer da presente investigação, realizaram-se estudos laboratoriais de modo a conhecer as diferenças que surgem quando aplicados os 3 tipos de tratamentos. Os 3 tipos de tratamento consistiram em provetes de referência, tratados com água, provetes de controlo, tratados com solução de alimento e, por fim, provetes tratados com bactérias. A posterior comparação entre os resultados obtidos entre os provetes permitiu compreender a importância da atividade bacteriana e como ela é fundamental para o processo.

Foram realizados ensaios edométricos, que permitiram avaliar a compressibilidade e, por consequente, o aumento da rigidez devido à formação de ligações entre as partículas devidas à precipitação de bio-cimento. Para os provetes tratados, o que seria de esperar era uma diminuição progressiva da sua compressibilidade, no entanto não foi o encontrado. Este resultado pode ser justificado pelo fato de terem ocorrido alterações estruturais durante o processo de alimentação (efetuado por injeção no interior do solo), ou por estas ligações se terem rompido durante o carregamento, ou porque as ligações formadas não eram contínuas porque as partículas finas estariam a interferir com a fixação do bio-cimento nas partículas de areia. Esta rotura levou a uma redução da rigidez, visível pelo aumento do índice de compressibilidade.

Das justificações apresentadas, há a forte possibilidade de a mais provável de ter ocorrido ter sido a rotura ainda durante a alimentação. O processo de alimentação foi definido por injeção para procurar uma homogeneização no interior da amostra, mas deverá ser melhorado no futuro.

Outro ensaio que foi executado foi o de lixiviação, que possibilitou a determinação dos conteúdos em  $CaCO_3$  e confirmar que houve formação de bio-cimento com aumento do tempo de tratamento, mesmo com os resultados inesperados obtidos nos ensaios de compressibilidade. Embora nem todos os valores dos provetes tratados com bactérias apresentem um crescente aumento de precipitado, as conclusões a serem retiradas foram que com o aumento de dias de tratamento, a percentagem de carbonato de cálcio aumenta. Alguma discrepância sentida nos valores deve-se ao fato de este ser um ensaio com pouca representatividade na amostragem.

Tal também mostra que ainda não se conseguiu obter um processo de tratamento e alimentação fiável.

Para comprovar os resultados anteriores e para averiguar a presença de cristais de carbonato de cálcio foi feita uma análise de difração de raios-x, XRD e uma análise com microscópio de varrimento de eletrões (SEM). Conjugando as informações destes dois ensaios, verificou-se que em todas as amostras tratadas com bactérias existia a presença de elemento de cálcio e de carbonato de cálcio, sob algum tipo de forma mineral: calcite ou vaterite. A partir das mesmas, pôde-se concluir que quanto maior a quantidade de solução de alimento providenciada, mais tempo o carbonato de cálcio tem para se precipitar e para atingir a formação de minerais mais estáveis, tais como a calcite.

Como análise final, foram realizados testes de porosimetria por intrusão de mercúrio (MIP). Através destes foi possível confirmar todas as informações anteriores e verificar que de fato, houve uma redução do tamanho dos poros de todas as amostras tratadas com bactérias pois houve colmatação com carbonato de cálcio.

Depois da análise de todos os resultados de todos os ensaios realizados, pôde-se concluir que a bio-cimentação é uma técnica inovadora que altera de fato as características mecânicas do solo. Esta tem um enorme potencial, no entanto é necessário otimizar o processo para obter distribuições homogêneas ao longo do tratamento para que se possam atingir valores de resistência, rigidez e permeabilidade favoráveis. Por enquanto ainda não se atingiu esse equilíbrio, porém existe uma forte investigação científica no tema e não tardará a ser colmatada toda essa ineficiência. No futuro, a bio-cimentação será uma alternativa sustentável e viável às outras técnicas de melhoramento de solos que constituem um problema ambiental global.

## **5.2. Estudos futuros**

Este estudo teve o seu valor pois procurou obter conclusões válidas na investigação do processo da bio-cimentação e na sua evolução. De seguida, apresentam-se alguns pontos que poderão ser seguidos por forma a completar alguns dos conhecimentos já adquiridos sobre a técnica mas que não foram analisados neste trabalho por não fazerem parte dos objetivos propostos.

- Como ponto de partida, é necessário encontrar as melhores condições para que as bactérias consigam produzir a maior quantidade de calcite possível no solo. É preciso compreender melhor a forma como certos parâmetros como o pH, a temperatura, entre outros influenciam a bio-cimentação;
- Um dos principais problemas desta técnica é a falta de homogeneidade dos provetes tratados. Tal está associado essencialmente ao processo de injeção de bactérias e da solução de alimento. Neste trabalho ainda não foi possível obter uma técnica eficiente para esta injeção, e em particular da solução de alimento.

- É necessária uma investigação sobre como se pode garantir um aumento significativo e constante da rigidez e de outras características mecânicas dos solos tratados, como a resistência. Tal poderá ser devidamente avaliado através de ensaios triaxiais.
- Avaliar a durabilidade deste procedimento é um objetivo fundamental para que se possa avaliar o bom comportamento da técnica. Ciclos de molhagem e secagem aplicados aos provetes podem ser um forma breve de investigar, assim como ciclos de carga-descarga.
- A aplicabilidade em obra é um tema ainda pouco estudado mas de grande importância pois os condicionamentos são grandes e os custos possivelmente também, é necessário agilizar o processo para que possa ser melhor aceite pela indústria.

Concluindo, existem múltiplas vantagens, apresentadas ao longo desta tese, face às técnicas correntes de melhoramento de solos. Com o tempo e a devida otimização, a bio-cimentação deixará de ser apenas uma hipótese académica e passará a ser uma alternativa tecnológica e economicamente viável no mundo da construção.

*(Página deixada em branco intencionalmente)*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al Qabany, A., & Soga, K. (2013). Effect of chemical treatment used in MICP on engineering properties of cemented soils. *Bio- and Chemo- Mechanical Processes in Geotechnical Engineering - Geotechnique Symposium in Print 2013*, 4, 107–115. <https://doi.org/10.1680/geot.SIP13.P.022>
- Al Qabany, Ahmed, Soga, K., & Santamarina, C. (2012). Factors Affecting Efficiency of Microbially Induced Calcite Precipitation. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 138(8), 992–1001. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)GT.1943-5606.0000666](https://doi.org/10.1061/(ASCE)GT.1943-5606.0000666)
- Brito, J. (2002). Técnicas de Melhoramento de Solos. *Technical Report, December*, 51. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4648.4966>
- Cheng, L., Shahin, M. A., & Mujah, D. (2017). Influence of key environmental conditions on microbially induced cementation for soil stabilization. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 143(1). [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)GT.1943-5606.0001586](https://doi.org/10.1061/(ASCE)GT.1943-5606.0001586)
- Esnault Filet, A., Gutjahr, I., Garandet, A., Viglino, A., Béguin, R., Monier, J., Oxarango, L., Emeriault, F., & Castanier Perthuisot, S. (2020). BOREAL, Bio-reinforcement of embankments by biocalcification. *E3S Web of Conferences*, 195, 05001. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202019505001>
- 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(3), 206–216. <https://doi.org/10.1680/grim.13.00052>
- Mitchell, J. K., & Santamarina, J. C. (2005). Biological considerations in geotechnical engineering. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 131(10), 1222–1233. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)1090-0241\(2005\)131:10\(1222\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)1090-0241(2005)131:10(1222))
- Mujah, D., Shahin, M. A., & Cheng, L. (2017). State-of-the-Art Review of Biocementation by Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP) for Soil Stabilization. *Geomicrobiology Journal*, 34(6), 524–537. <https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1225866>
- Ng, W., Lee, M., & Hii, S. (2012). An Overview of the Factors Affecting Microbial-Induced Calcite Precipitation and its Potential Application in Soil Improvement. *International Journal of Civil and Environmental Engineering*, 6(2), 188–194.
- Suer, P., Hallberg, N., Carlsson, C., Bendz, D., & Holm, G. (2009). Biogrouting compared to jet grouting: Environmental (LCA) and economical assessment. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*,

44(4), 346–353. <https://doi.org/10.1080/10934520802659679>

Terzis, D., & Laloui, L. (2019). A decade of progress and turning points in the understanding of bio-improved soils: A review. *Geomechanics for Energy and the Environment*, 19(March), 100116. <https://doi.org/10.1016/j.gete.2019.03.001>

Terzis, D., Lyessse Laloui, L., Dornberger, S. and Harran, R. (2020). A Full-Scale Application of Slope Stabilization via Calcite Bio-Mineralization Followed by Long-Term GIS Surveillance. Proc Geo-Congress 2020, USA. <https://doi.org/10.1061/9780784482834.008>

van Paassen, L. A., Ghose, R., van der Linden, T. J. M., van der Star, W. R. L., & van Loosdrecht, M. C. M. (2010). Quantifying biomediated ground improvement by ureolysis: Large-scale biogrout experiment. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 136(12), 1721–1728. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)GT.1943-5606.0000382](https://doi.org/10.1061/(ASCE)GT.1943-5606.0000382)

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(3), 539–549. <https://doi.org/10.1016/j.sandf.2012.05.011>



## ANEXOS

### Anexo 1 – Liofilização das bactérias

1. Cálculo das quantidades de reagentes para perfazer os respetivos meios de cultura

$$50 * V_i = 20 * 20 \rightarrow V_i = 8ml \text{ de YE}$$

$$50 * V_i = 10 * 20 \rightarrow V_i = 4ml \text{ de AS}$$

$$1 * V_i = 0,13 * 20 \rightarrow V_i = 2,6ml \text{ de TRIS}$$

$$V_i = 20 - 8 - 4 - 2,6 \rightarrow V_i = 5,4ml \text{ de dH}_2\text{O}$$

---

$$V_f = 20ml$$

$$50 * V_i = 20 * 200 \rightarrow V_i = 80ml \text{ de YE}$$

$$50 * V_i = 10 * 200 \rightarrow V_i = 40ml \text{ de AS}$$

$$1 * V_i = 0,13 * 200 \rightarrow V_i = 26ml \text{ de TRIS}$$

$$V_i = 200 - 80 - 40 - 26 \rightarrow V_i = 54ml \text{ de dH}_2\text{O}$$

---

$$V_f = 200ml$$

2. Medições de  $DO_{600}$  dos quatro pré-inóculos de 5 ml

	$DO_{600}$ inicial	$DO_{600}$ dia seguinte
1	0,13	4,12
2	0,19	1,86
3	0,19	1,82
4	0,09	1,63

3. Cálculo do número de células do pré-inóculo a introduzir no balão de 20 ml.

$$1,79 * V_i = 0,1 * 20 \rightarrow V_i = 1,120ml$$

$$1,75 * V_i = 0,1 * 20 \rightarrow V_i = 1,140ml$$

$$1,55 * V_i = 0,1 * 20 \rightarrow V_i = 1,290ml$$

4. Medições de  $DO_{600}$  dos quatro pré-inóculos de 200 ml

	$DO_{600}$
1	1,06
2	1,03
3	1,09

5. Cálculo do volume final

$$1,06 * V_i = 1 * 210 \rightarrow V_i = 198,1ml$$

$$1,03 * V_i = 1 * 205 \rightarrow V_i = 199,0ml$$

$$1,09 * V_i = 1 * 215 \rightarrow V_i = 197,2ml$$

---

$$V_f = 630ml$$

6. Concentração de Sacarose

$$c = \frac{m}{V} \leftrightarrow 100 = \frac{m}{0,063} \leftrightarrow m = 6,3g \text{ de Sacarose e } NH_4Cl$$

## Anexo 2 – Solução de Alimento

- Ureia:

$$C = \frac{n}{V} \leftrightarrow 0,5 = \frac{n}{1} \leftrightarrow n = 0,5 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \leftrightarrow 0,5 = \frac{n}{60,06} \leftrightarrow m = 30,03 \text{ g}$$

- Cloreto de Cálcio:

$$C = \frac{n}{V} \leftrightarrow 0,5 = \frac{n}{1} \leftrightarrow n = 0,5 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \leftrightarrow 0,5 = \frac{n}{110,98} \leftrightarrow m = 55,40 \text{ g}$$

- Meio de Cultura:

Yeast Extract, m=2g

Sulfato de Amónio, m=1g

Cloreto de Amónio, m=10g

Bicarbonato de Sódio, m=2,12g

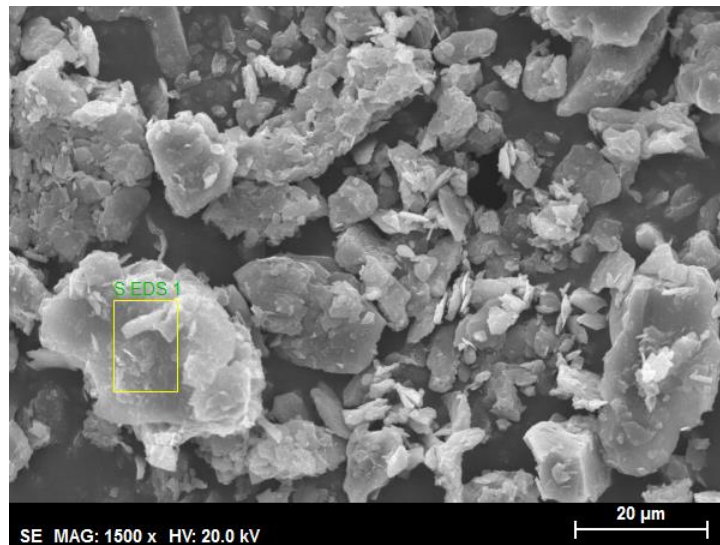
### Anexo 3 – Imagens SEM e correspondentes análises EDS

Elementos químicos identificados nas análises EDS:

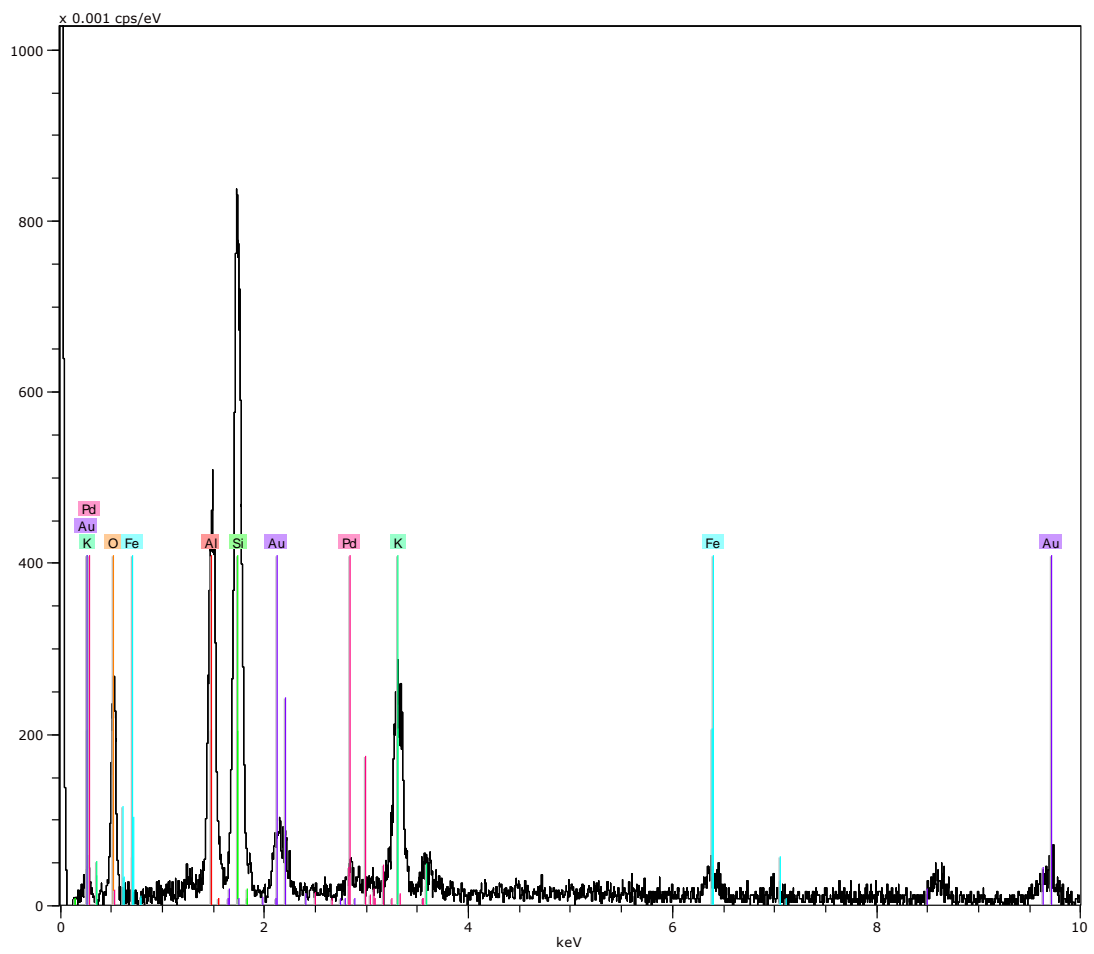
Elemento	Símbolo
Alumínio	Al
Cálcio	Ca
Cloro	Cl
Ferro	Fe
Magnésio	Mg
Ouro	Au
Oxigénio	O
Paládio	Pd
Potássio	K
Silício	Si

- Provete tratado com água (EDS1)

Imagem SEM provete tratado com água.

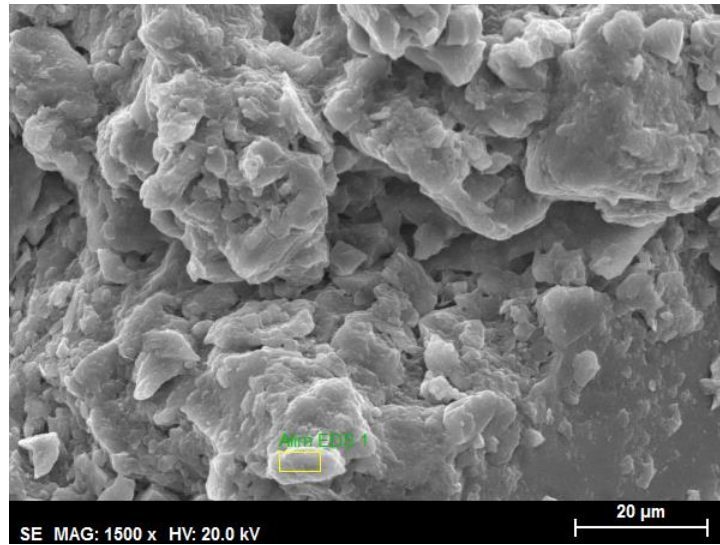


Representação EDS do provete tratado com água.

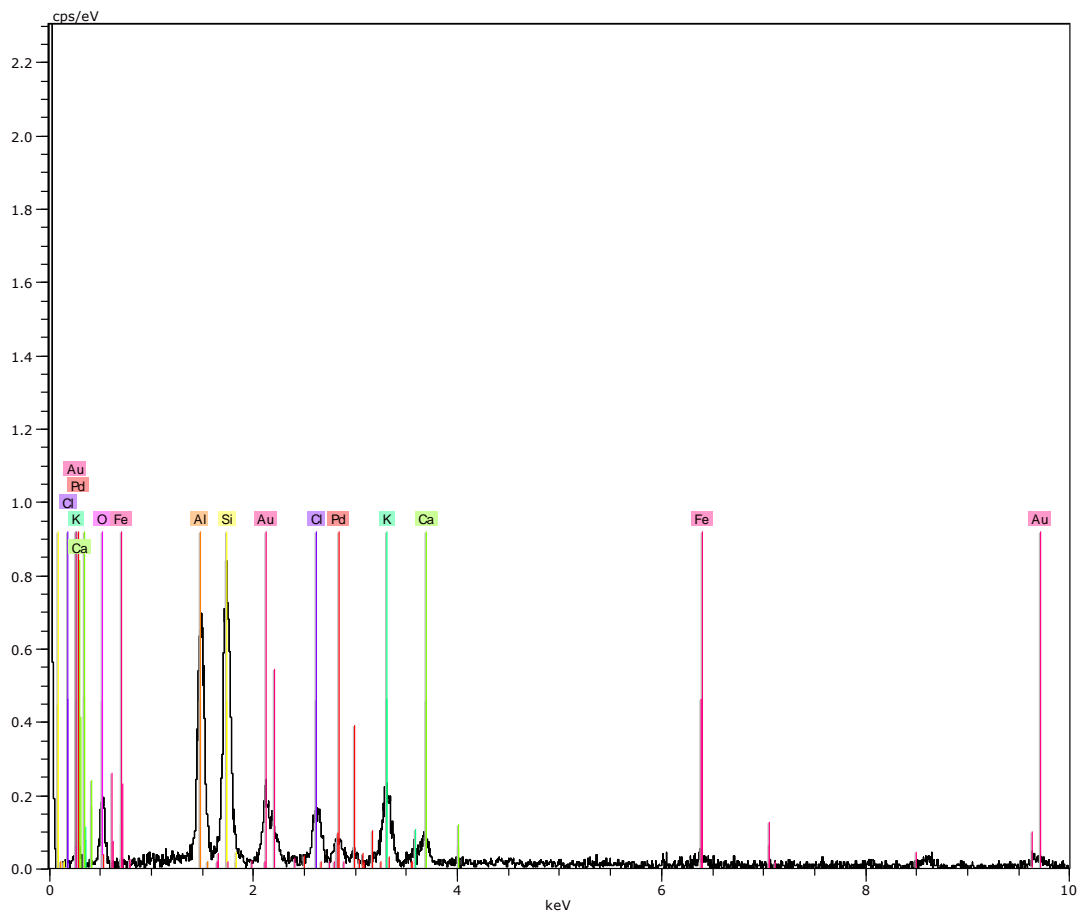


- Provete tratado com solução de alimento (Alim EDS1)

Imagem SEM provete tratado com solução de alimento.

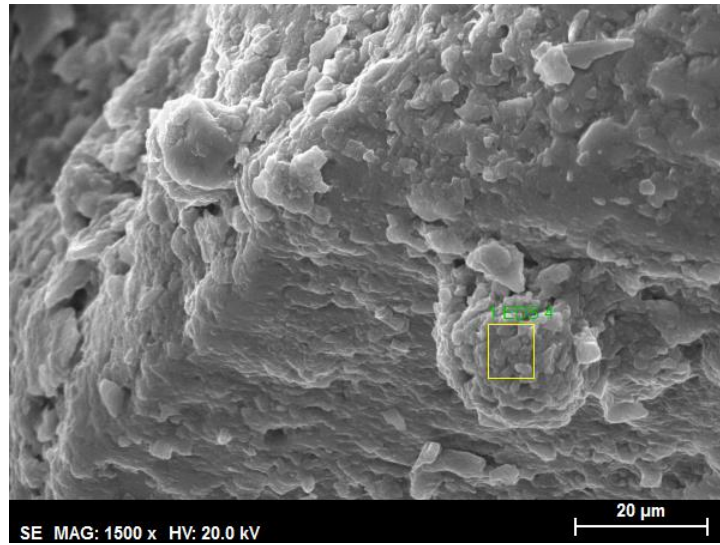


Representação EDS do provete tratado com solução de alimento.

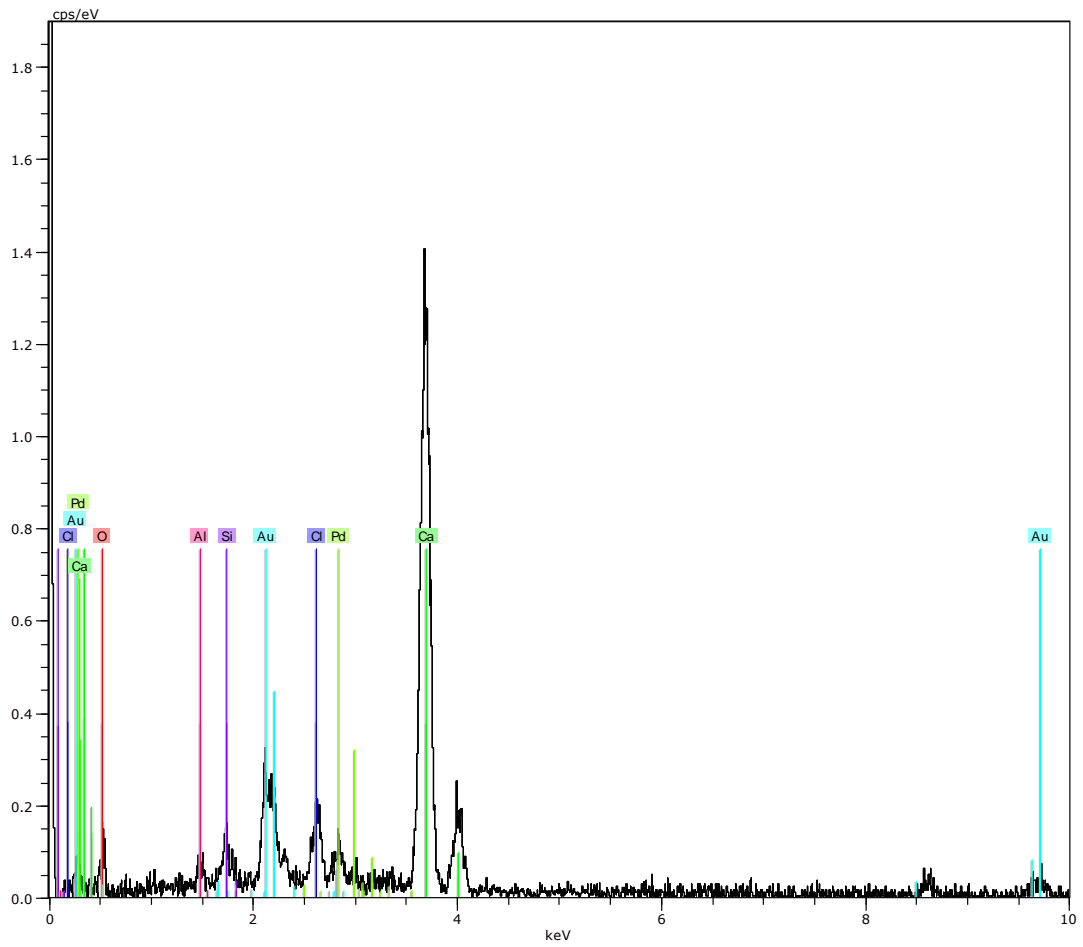


- Provete tratado com bactérias – Provete 1 (1 EDS4)

Imagem SEM provete 1.

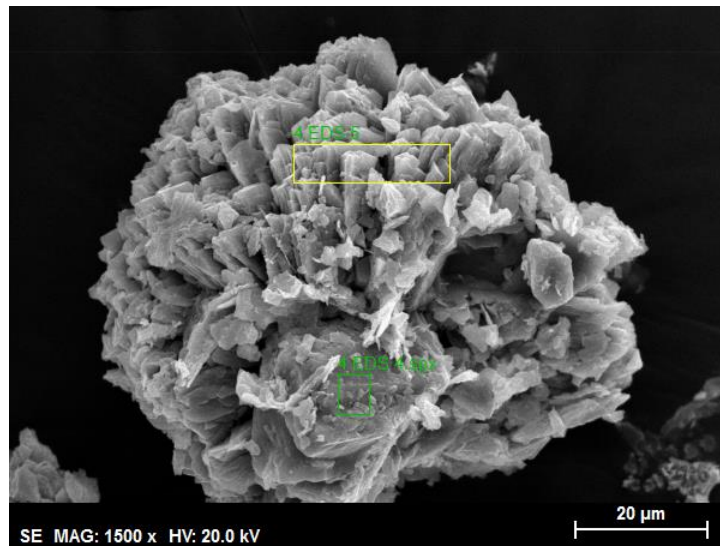


Representação EDS do provete 1.

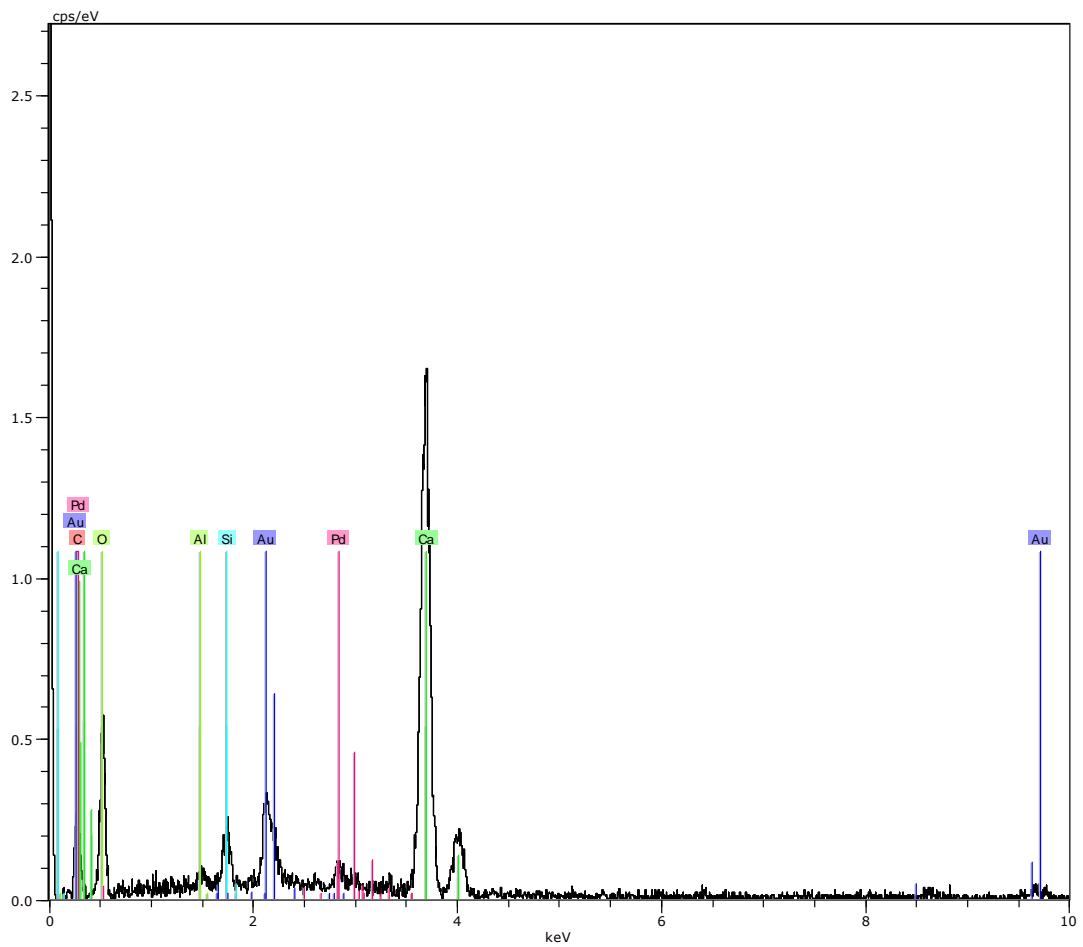


- Provete tratado com bactérias – Provete 4 (4 EDS5)

Imagem SEM provete 4.



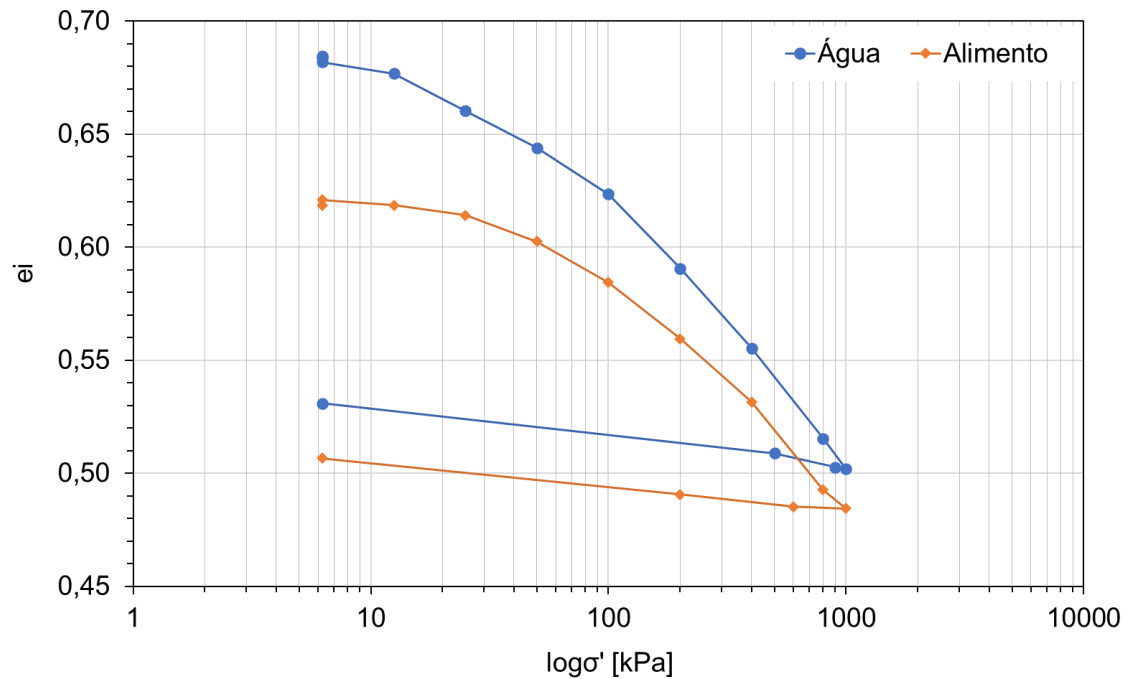
Representação EDS do provete 4.



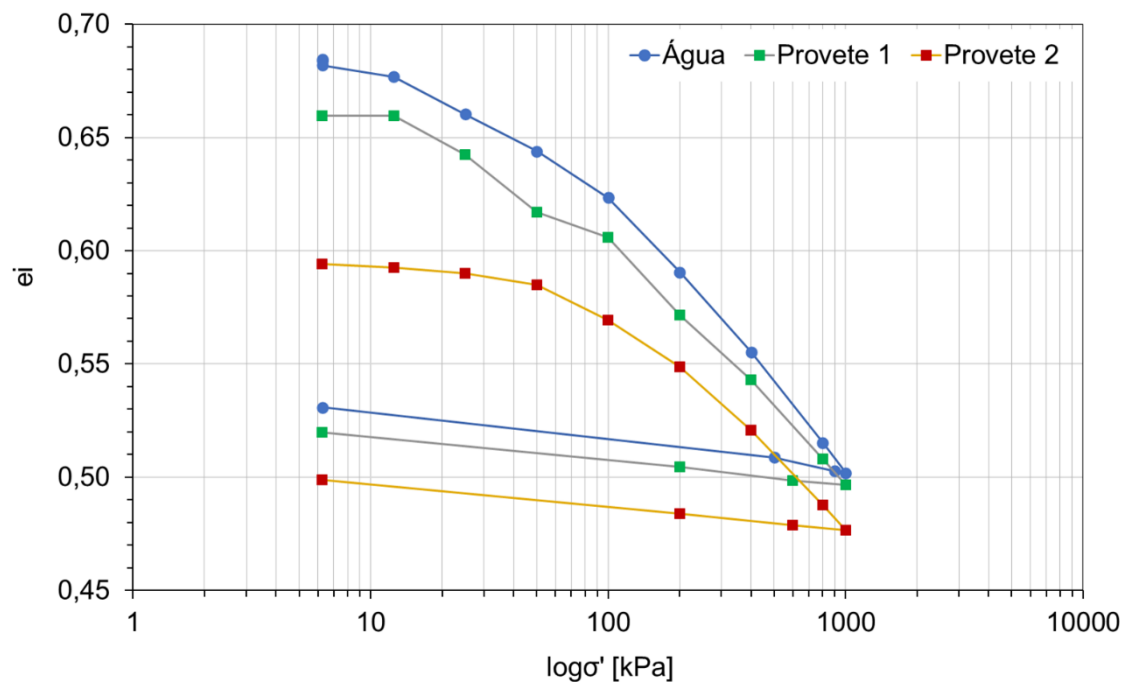


## Anexo 4 – Curvas de compressibilidade para os vários provetes

1 - Trajetórias e  $-\log \sigma'$  do solo obtidas a partir do ensaio edométrico das amostras de água e de solução de alimento.



2 - Trajetórias e  $-\log \sigma'$  do solo obtidas a partir do ensaio edométrico das amostras de água e os provetes 1 e 2.



3 - Trajetórias e  $e - \log \sigma'$  do solo obtidas a partir do ensaio edométrico das amostras de água e o provete 4.

