

ARIANE MARIA RIZZOLI MORENO

**PRODUÇÃO DE UREASE POR *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859 EM
RESPOSTA A CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E SEU POTENCIAL
PARA A ESTABILIZAÇÃO DE SOLOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Marcos Rogério Tótola

Coorientador: Roberto Lopes Ferraz

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2020**

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

T

M843p
2020
Moreno, Ariane Maria Rizzoli, 1993-
Produção de urease por *Sporosarcina pasteurii* ATCC
11859 em resposta a condições de crescimento e seu potencial
para estabilização de solos / Ariane Maria Rizzoli Moreno. –
Viçosa, MG, 2020.
75 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Marcos Rogério Tótola.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.67-73.

1. *Sporosarcina pasteurii*. 2. Urease. 3. Biomineralização.
4. Estabilização de solo. 5. Carbonato de cálcio. 6. Microscopia
eletrônica de varredura. 7. Espectroscopia de raio X.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

CDD 22 ed. 572.51

ARIANE MARIA RIZZOLI MORENO

**PRODUÇÃO DE UREASE POR *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859 EM
RESPOSTA A CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E SEU POTENCIAL
PARA A ESTABILIZAÇÃO DE SOLOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Ariane Maria Rizzoli Moreno
Autora



Marcos Rogério Tótola
Orientador

*Dedico esse trabalho aos meus avós
Ermelinda e Affonso (in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

ARIANE MARIA RIZZOLI MORENO, filha de Affonso Francisco Moreno e Eliana Rizzoli Moreno, nasceu em Araraquara, São Paulo, no dia 2 de fevereiro de 1993.

Em janeiro de 2017, graduou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas, e em janeiro de 2018 em Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 2018 iniciou o curso de mestrado em Microbiologia Agrícola na mesma universidade, na área de microbiologia ambiental.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)

RESUMO

MORENO, Ariane Maria Rizzoli, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Produção de urease por *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859 em resposta a condições de crescimento e seu potencial para a estabilização de solos.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientador: Roberto Lopes Ferraz.

O crescente consumo de materiais de construção, acelerado pelo crescimento populacional global e pela urbanização, resulta em efeitos negativos sobre o meio ambiente. Conseqüentemente, o desenvolvimento de alternativas sustentáveis e que propiciem o progresso da construção civil tornou-se uma demanda urgente. A bactéria *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859 é capaz de realizar a hidrólise de ureia e induzir, em presença de íons cálcio, a precipitação de carbonato de cálcio (CaCO_3), que funciona como um agente cimentante de partículas minerais. Este trabalho teve como objetivos (1) investigar os efeitos da concentração de ureia, pH, temperatura e tempo de cultivo sobre a produção e a cinética da enzima urease de *S. pasteurii* ATCC 11859, e (2) desenvolver um modelo experimental para aplicação do *bio-grout*, com a finalidade de aumentar sua estabilidade mecânica e reduzir sua permeabilidade. Para isso, avaliou-se o efeito de diferentes níveis de concentrações de ureia, pH, temperatura e tempo de cultivo sobre a produção da enzima urease por *S. pasteurii* ATCC 11859, bem como sobre a cinética aparente da enzima, a fim de se determinarem as condições ótimas de produção e aplicação da enzima. A cultura bacteriana obtida nas condições previamente estabelecidas como ótimas foi aplicada em um solo típico da região de Viçosa/MG, Brasil, com textura de areia fina a média (silto-argilosa) e pH ácido (5,14). Íons cálcio, na forma de cloreto de cálcio (CaCl_2), além de ureia, foram adicionados para propiciar a precipitação de CaCO_3 a partir da hidrólise da ureia por *S. pasteurii* ATCC 11859. As propriedades geotécnicas do solo foram avaliadas pelas análises de cisalhamento direto, resistência à compressão simples e permeabilidade. A formação de cristais de CaCO_3 sob forma de calcita foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva de raio X (MEV/EDS). A condição determinada como ótima para a produção da urease foi a combinação de pH

8,5, temperatura de 35 °C, 80 g L⁻¹ de ureia e cultivo por 16 horas. A enzima urease apresentou atividade aparente máxima em pH 6,5, sendo que na faixa de pH 5,5 a 8,5, pelo menos 80% da atividade máxima foi mantida. A temperatura ótima para a atividade da enzima foi 45 °C. Os ensaios de cisalhamento direto e resistência à compressão simples mostraram que não houve ganho de resistência mecânica pelo solo. Esse fato foi atribuído à ocorrência da biocimentação somente no topo dos corpos de prova. O ensaio de permeabilidade apresentou resultados promissores, com redução da permeabilidade do solo em 99,56%. As imagens de MEV/EDS confirmaram a precipitação de calcita, pela ação biológica, apenas na camada superior do solo. Esse resultado sugere que a técnica de *bio-grout* otimizada no presente estudo pode ser aplicada para redução da permeabilidade de solos com textura de areia fina a média e pH ácido, atenuando processos de erosão marginal.

Palavras-chave: *Sporosarcina pasteurii*. *Bio-grout*. MICP. Cimentação microbiologicamente induzida. Biocimentação. MEV/EDS.

ABSTRACT

MORENO, Ariane Maria Rizzoli, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Urease production by *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859 in response to growing conditions and its potential for soil stabilization.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-adviser: Roberto Lopes Ferraz.

The growing consumption of construction materials accelerated by population growth and urbanization has resulted in negative effects on the environment. Thus, the development of sustainable alternatives that enable progress on civil construction has become an urgent demand. The bacterium *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859 is able to hydrolyze urea and, in the presence of calcium ions, induce the precipitation of calcium carbonate (CaCO_3), which acts as a cementing agent. The aims of this work were (1) to investigate the effects of urea concentration, pH, temperature and cultivation time on the production and urease kinetics of *S. pasteurii* ATCC 11859; (2) to develop an experimental model for the application of bio-grout, in order to increase mechanical stability and reduce permeability. For this purpose, we evaluated the effects of different urea concentrations, pH, temperature and cultivation time on urease enzyme production of *S. pasteurii* ATCC 11859, as well as on the apparent kinetics of the enzyme, in order to determine the optimal conditions for production and enzyme application. The bacterial culture obtained under the conditions previously established as optimal was applied in a typical soil of the region of Viçosa/ MG, Brazil, characterized as fine to medium sand texture (silty - clayey soil) and acid pH (5,14). Calcium ions were added in the form of calcium chloride (CaCl_2) to induce CaCO_3 precipitation. The soil geotechnical properties were evaluated by direct shear, unconfined compression and permeability test. The CaCO_3 crystals formation in the form of calcite was confirmed by scanning electron microscopy and X ray energy dispersive spectroscopy (SEM/EDS). The optimal condition for the urease production was determined as a combination of pH 8.5, temperature 35 °C, 80 g L⁻¹ urea and cultivation time of 16 hours. The urease enzyme showed maximum activity at pH 6.5, and in the pH range 5.5 to 8.5 at least 80% of the maximum activity was maintained. The optimum temperature for enzyme activity was 45 °C. The

direct shear and unconfined compression tests showed that there was no improvement of mechanical soil resistance. This result was related to the occurrence of biocimentation only at the top of the soil columns, not allowing the solution penetration into the soil. The results of the permeability test were inspiring. The soil permeability was reduced in 99,56%. The SEM / EDS images confirmed biological calcite precipitation only on the upper layer of the soil columns. These results suggest that the optimized bio-grout technique developed in this research can be applied efficiently reducing soil permeability characterized as fine to medium sand texture and acid pH, attenuating marginal erosion processes.

Keywords: *Sporosarcina pasteurii*. Bio-grout. MICP. Microbial induced cementation. Biocimentation. SEM/EDS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações de precipitação de CaCO_3 realizadas por <i>S. pasteurii</i>	22
Figura 2. Vista aérea do local (seta em vermelho) de coleta do solo para a montagem do experimento.	38
Figura 3. Montagem dos corpos de prova utilizados nos experimentos de <i>bio-grout</i>	39
Figura 4. Esquema do protocolo de aplicação da suspensão bacteriana e cimentante.	40
Figura 5. Médias das concentrações de ureia sobre a atividade ureolítica de <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859.	44
Figura 6. Médias dos pHs iniciais (6,5 a 9,5) sobre atividade ureolítica de <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859 cultivada em meio TSB-ureia (80 g L^{-1}).	46
Figura 7. Média das temperaturas (25 a $35 \text{ }^\circ\text{C}$) sobre atividade ureolítica de <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859 cultivada em meio TSB-ureia (80 g L^{-1}) e pH 8,5.	48
Figura 8. Médias dos tempos de cultivo (6 a 40 horas) sobre atividade ureolítica de <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859 cultivada em meio TSB-ureia (80 g L^{-1}), pH 8,5 e $35 \text{ }^\circ\text{C}$	49
Figura 9. Efeito do pH (2,5 a 10,5) sobre a atividade da urease de <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859 sob temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$	51
Figura 10. Efeito da temperatura sobre a atividade da urease de <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859 cultivada em meio TSB-ureia (80 g L^{-1}), pH 8,5 a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ por 16 horas.	52
Figura 11. Curva granulométrica do solo utilizado nos experimentos de <i>bio-grout</i>	53
Figura 12. Resistência ao cisalhamento das amostras de solo tratado com a suspensão de <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859 e solução cimentante quando adotadas as tensões normais de 50, 100 e 200 KPa.	54
Figura 13. Resistência ao cisalhamento das amostras de solo não tratadas com a suspensão de <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859 (controle) quando adotadas as tensões normais de 50, 100 e 200 KPa.	55
Figura 14. Comparação das envoltórias de resistência das amostras tratadas e não tratadas (controle) pela aplicação de suspensão de <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859.	56

Figura 15. Resultados dos ensaios de resistência à compressão simples. ..	57
Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do topo do corpo de prova tratado com <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859.....	60
Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do topo do corpo de prova.....	61
Figura 18. Espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) do corpo de prova submetido ao tratamento com <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859.	62
Figura 19. Espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) do corpo de prova controle.	64
Figura 20. Microscopia eletrônica de varredura do controle (MEV). Imagens de MEV da região do topo das amostras controle.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização física do solo utilizado nos experimentos de <i>bio-grout</i>	53
Tabela 2. Coeficientes de permeabilidade a 20 °C	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Biomineralização	19
2.2. Precipitação de carbonato de cálcio induzida microbiologicamente (MICP, <i>microbially induced calcium carbonate precipitation</i>)	20
2.3. Fatores que influenciam a MICP associada a bactérias ureolíticas.....	22
2.4. Formação dos cristais.....	23
2.5. Aplicações da MICP	24
2.5.1. Biocimento ou bioconcreto.....	24
2.5.2. <i>Bio-grout</i> : bio-estabilização de solos	25
2.6. <i>Sporosarcina pasteurii</i>	26
2.6.1. Características.....	26
2.7. Atividade ureolítica e crescimento em função da temperatura e do pH	27
2.7.1. Atividade ureolítica e o crescimento em função da temperatura	27
2.7.2. Atividade ureolítica e crescimento em função do pH	28
2.8. Condições para a precipitação de carbonato de cálcio	29
2.8.1. Bactéria.....	29
2.8.2. Fatores físico-químicos.....	30
2.9. Desafios e perspectivas.....	31
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo Geral.....	33
3.1.1. Objetivos específicos	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Microrganismo e condições de cultivo	34
4.2. Cinética de crescimento e produção de urease.....	34
4.2.1. Cinética de crescimento e produção de urease em função de diferentes concentrações de ureia	34
4.2.2. Cinética de crescimento e produção de urease em função do pH...34	
4.2.3. Cinética de crescimento e produção de urease em função de diferentes temperaturas	35
4.2.4. Determinação do crescimento e da atividade ureolítica.....	35

4.3. Avaliação do comportamento da urease em resposta à temperatura e ao pH	36
4.3.1. Efeito da temperatura sobre a atividade ureolítica	36
4.3.2. Efeito do pH sobre a atividade da enzima	36
4.4. Preparo do corpo de prova e tratamento	37
4.4.1. Coleta e caracterização do solo	37
4.4.2. Montagem do corpo de prova	38
4.5. Tratamento do solo	39
4.5.1. Cultivo de <i>S. pasteurii</i> para aplicação no solo	39
4.5.2. Metodologia de tratamento do solo	39
4.6. Análises físicas da eficiência da MICP	41
4.6.1. Ensaio de cisalhamento direto	41
4.6.2. Ensaio de resistência à compressão simples	41
4.6.3. Ensaio de permeabilidade	42
4.6.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)	42
4.7. Delineamento Estatístico	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Fatores que afetam a produção da enzima urease por <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859	44
5.1.1. Efeito da concentração de ureia sobre a produção de urease de <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859	44
5.1.2. Efeito do pH inicial do meio de cultura sobre a produção de urease de <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859	45
5.1.3. Efeito da temperatura sobre a produção de urease de <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859	47
5.1.4. Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de urease por <i>S. pasteurii</i> ATCC 11859	49
5.2. Cinética aparente da enzima urease	50
5.2.1. Efeito do pH sobre a atividade da urease	50
5.2.2. Efeito da temperatura sobre a atividade da urease	51
5.3. Caracterização do solo	53
5.4. Ensaio de cisalhamento direto	54
5.5. Ensaio de resistência à compressão simples	57

5.6. Ensaio de permeabilidade	58
5.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)	59
6. CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÊNDICES	74

1. INTRODUÇÃO

O constante crescimento da população mundial e da urbanização têm provocado um aumento consistente no consumo de materiais de construção. Esse aumento da demanda global traz consigo reflexos ambientais relevantes. O setor de construção consome até 40% da energia global e emite até 20% de gases de efeito estufa antropogênicos (ACHAL et al., 2015). A produção de cimento, incluída nesse setor, responde por um consumo de aproximadamente 10-15% da energia global e é responsável por gerar cerca de 5 a 8% do CO₂ emitido pela atividade humana (REIS et al., 2017). Diante disso, é fundamental o desenvolvimento de métodos alternativos de construção que propiciem tanto o progresso da infraestrutura quanto uma redução nos impactos ambientais derivados da atividade de construção civil.

Em condições naturais, alguns microrganismos atuam na formação de agregados de solo por meio de reações que provocam a cimentação de partículas. Um exemplo é a precipitação de carbonato de cálcio induzida microbiologicamente (MICP), processo pelo qual bactérias ureolíticas, como *Sporosarcina pasteurii*, induzem a precipitação de carbonato de cálcio (CaCO₃) durante a hidrólise de ureia. Na reação catalisada pela urease, a ureia é hidrolisada a ácido carbâmico (NH₂COOH) e amônia (NH₃). O ácido carbâmico é hidrolisado espontaneamente a outra molécula de amônia (NH₃) e dióxido de carbono (CO₂). O CO₂ é convertido a ácido carbônico (H₂CO₃). Esses produtos, em equilíbrio com o meio, geram amônio (NH₄⁺), íons hidróxido (OH⁻) e bicarbonato (HCO₃⁻). Com a elevação do pH, o bicarbonato transforma-se em íons carbonato (CO₃²⁻), que na presença de íons cálcio (Ca²⁺) precipitam na forma de CaCO₃ (Figura 1) (REIS et al., 2017; CHENG; SHAHIN; CHU, 2018).

A atividade da enzima urease e a precipitação de CaCO₃ são influenciadas por vários fatores ambientais. Dentre eles, destacam-se a temperatura, o pH e o tempo de reação. A temperatura influencia a taxa de crescimento da bactéria ureolítica, a nucleação dos cristais de CaCO₃, a solubilidade de íons e sais, a forma e o tamanho dos cristais e a atividade da urease. A máxima atividade de ureases derivadas de microrganismos distintos é alcançada em temperaturas diferentes, e varia também com outras condições ambientais, como pH, e com a composição do meio em que o microrganismo é cultivado (OKWADHA; LI, 2010).

O pH pode afetar o crescimento do microrganismo ureolítico, o transporte e a adesão das bactérias a superfícies do meio em que se encontra e a precipitação de CaCO_3 . A atividade ureolítica também é dependente do pH, pois a enzima apresenta uma atividade máxima em uma faixa de pH específica, relatada entre 7 e 9. No entanto, assim como ocorre em resposta à temperatura, a atividade ureolítica pode ser observada além desses valores de pH.

Portanto, fatores físico-químicos, como a temperatura e o pH, desempenham papel importante no processo de MICP. Estudos que abordam a otimização desses fatores podem fornecer informações sobre as condições que favorecem o crescimento da bactéria e a atividade da enzima, contribuindo assim para a implementação da produção em larga escala de bactérias ureolíticas e aplicação da técnica de biomineralização na construção civil.

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo investigar o efeito da temperatura, do pH, do tempo de cultivo e da composição química do meio sobre o crescimento e produção da enzima urease pela bactéria *S. pasteurii* ATCC 11859, bem como determinar os efeitos da temperatura e do pH sobre a atividade ureolítica, visando aplicar a cultura obtida nas condições estabelecidas em solo, a fim de melhorar suas propriedades geotécnicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biomineralização

O processo de biomineralização ocorre a partir de reações entre compostos do ambiente e produtos do metabolismo de organismos, que resultam na produção de diferentes minerais (DHAMI; REDDY; MUKHERJEE, 2013; SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016). Três mecanismos de formação de minerais por bactérias são conhecidos: (1) a biomineralização **controlada** biologicamente, que consiste no controle específico para a formação do mineral. Nesse caso, a atividade celular específica controla a nucleação, formação e até mesmo o local de formação do mineral. Os minerais precipitam dentro ou sobre a célula. Como exemplo citam-se as bactérias que produzem os magnetossomos, conhecidas como bactérias magnetotáticas. (2) A biomineralização **influenciada** biologicamente ocorre quando o mineral é precipitado a partir de matéria orgânica acumulada na superfície da célula. Por fim, tem-se a (3) biomineralização **induzida** biologicamente, que corresponde à formação do mineral resultante de mudanças nas condições químicas, como a alteração do pH no ambiente. Nesse caso, a precipitação do cristal ocorre extracelularmente (BENZERARA et al., 2011; ANBU et al., 2016). A precipitação ocorre quando íons de cargas positivas são atraídos pelas cargas negativas presentes na parede celular do microrganismo (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016).

A biomineralização é o principal meio de formação de materiais biológicos, especialmente os que contêm carbonato. No entanto, outros minerais (como os silicatados e os fosfatados) podem ser formados por diferentes organismos, apresentando grande diversidade em relação à composição, morfologia, propriedades e função dos cristais (NUDELMAN; SOMMERDIJK, 2012; DHAMI; REDDY; MUKHERJEE, 2013). Esses minerais, especialmente os que contêm carbonato, são capazes de fornecer resistência mecânica ao material, inspirando engenheiros e cientistas a desenvolverem tecnologias baseadas nesse modo de construção da natureza (ACHAL et al., 2015).

Os minerais de carbonato de cálcio (CaCO_3) são os minerais biogênicos mais abundantes, considerando-se a distribuição entre os táxons e em relação à quantidade produzida (ACHAL et al., 2015). A maior parte dos reservatórios de carbono é formada por CaCO_3 , principalmente na forma de calcário e dolomito, que

correspondem a 41,9% (EHRlich; NEWMAN; KAPPLER, 2015). O CaCO_3 pode ser encontrado em três formas primárias diferentes (vaterita, calcita e aragonita), que possuem a mesma composição química, mas formas cristalinas distintas. A vaterita e a calcita são os polimorfos bacterianos mais comuns. A vaterita é uma forma transitória que ocorre durante a formação da calcita, sendo essa a forma mais estável (PHILLIPS et al., 2013; REIS et al., 2017).

A precipitação do carbonato de cálcio induzida por microrganismos tem despertado grande interesse. Esse mineral é um ligante eficiente e possui características que são compatíveis com as composições do cimento, fornecendo perspectivas mais ecológicas na área da construção civil (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016).

2.2. Precipitação de carbonato de cálcio induzida microbiologicamente (MICP, *microbially induced calcium carbonate precipitation*)

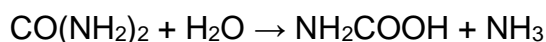
No processo de MICP, a precipitação do CaCO_3 ocorre extracelularmente, resultando na diminuição dos espaços de poro do solo e aumentando o conteúdo sólido. O modo como esses cristais distribuem-se ao redor das partículas de solo influencia a eficiência do processo de cimentação. Cristais que precipitam de forma uniforme formam uma camada fina em volta das partículas de solo, resultando em uma ligação fraca. A precipitação dos cristais apenas no local onde ocorre o contato entre as partículas seria o desejável. No entanto, ambos cenários são utópicos. Análises de microscopia mostram que, na prática, a distribuição dos cristais envolve um balanço das duas condições (DEJONG et al., 2010).

A MICP pode ocorrer por duas vias metabólicas, a autotrófica e a heterotrófica. Na via autotrófica, microrganismos convertem dióxido de carbono (CO_2) a carbonato. Na via heterotrófica, as bactérias utilizam diferentes compostos de carbono presentes no meio como fonte de energia e sintetizam o carbonato de cálcio (CaCO_3).

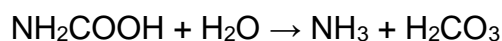
Uma das vias conhecidas de precipitação do carbonato de cálcio é a realizada por bactérias que possuem a enzima urease (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016; REIS et al., 2017). Essa enzima (hidrolase, EC 3.5.1.5) é distribuída entre diversos microrganismos, principalmente aqueles que habitam o solo. A bactéria *Sporosarcina pasteurii* (anteriormente classificada como *Bacillus pasteurii*) é um organismo comum

no solo, que precipita carbonato de cálcio por meio da hidrólise da ureia [CO(NH₂)₂] (PHILLIPS et al., 2013).

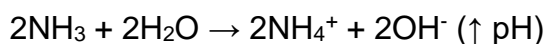
A reação de precipitação de CaCO₃ depende da ocorrência de uma série de reações e processos físico-químicos (Figura 1). Inicialmente, a urease hidrolisa a ureia [CO(NH₂)₂] em ácido carbâmico (NH₂COOH) e amônia (NH₃):



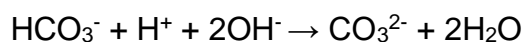
O ácido carbâmico hidrolisa espontaneamente a amônia e ácido carbônico (H₂CO₃):



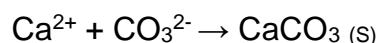
Em meio aquoso, os produtos da reação anterior equilibram-se, e bicarbonato (HCO₃⁻), amônio (NH₄⁺) e íons hidróxido (OH⁻) são formados, o que resulta na elevação do pH:



Em decorrência da elevação do pH, o equilíbrio do bicarbonato é alterado e íons carbonato (CO₃²⁻) são formados, aumentando a eletronegatividade da membrana celular:



Dessa forma, íons solúveis de cálcio são atraídos para a membrana, e a ligação com CO₃²⁻ resulta na precipitação de CaCO₃ (PHILLIPS et al., 2013; REIS et al., 2017):



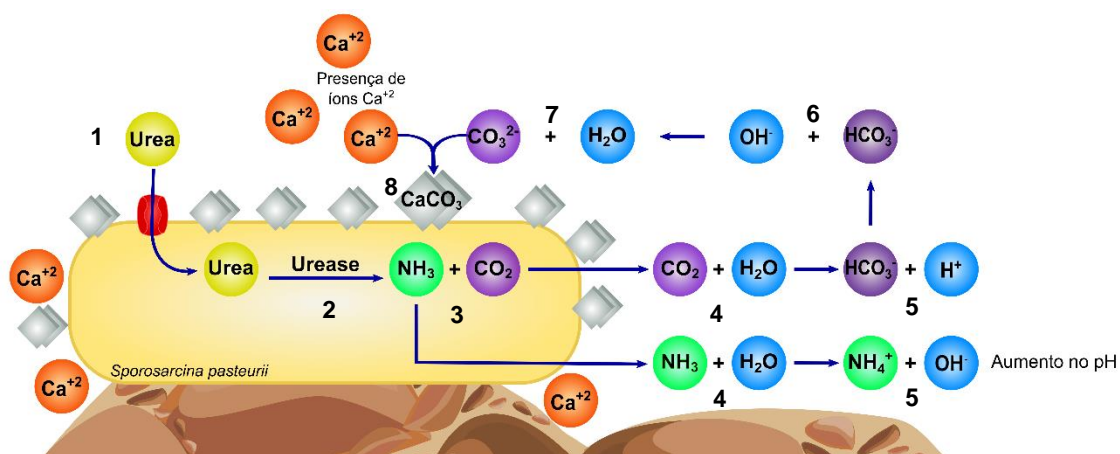


Figura 1. Reações de precipitação de CaCO_3 realizadas por *S. pasteurii*. (1) A ureia entra na célula a favor do gradiente de concentração (2); a urease hidrolisa a ureia em (3) amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2); (4) a NH_3 , em contato com a água, forma (5) amônio (NH_4^+) e íons hidróxido (OH^-); (5) o CO_2 , em contanto com a água, forma íons bicarbonato (HCO_3^-); (6) com a elevação do pH, o equilíbrio da reação é alterado, (7) levando à formação de íons carbonato (CO_3^{2-}); (8) a superfície da célula torna-se mais eletronegativa, atraindo íons de cálcio (Ca^{+2}) e resultando na precipitação de CaCO_3 . Fonte: O autor (2020).

2.3. Fatores que influenciam a MICP associada a bactérias ureolíticas

A atividade da enzima urease e a precipitação de CaCO_3 são influenciadas por vários fatores ambientais. Dentre eles, destacam-se a temperatura, o pH e o tempo de reação (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016). A influência da temperatura e do pH é complexa, pois pode afetar várias etapas no processo.

A temperatura influencia a taxa de crescimento da bactéria ureolítica, a nucleação e a solubilidade do CaCO_3 , a forma e o tamanho dos cristais e também a atividade da enzima urease que, assim como qualquer outra reação enzimática, é dependente da temperatura (MUJAH; SHAHIN; CHENG, 2016a). A máxima atividade de ureases derivadas de microrganismos distintos é alcançada em temperaturas diferentes, e varia também com outras condições ambientais, como o pH e a composição do meio em que o microrganismo é cultivado (OKWADHA; LI, 2010). A temperatura de maior atividade ureolítica já foi relatada em amplas faixas, que variam de 20 a 70 °C (WHIFFIN et al., 2007; OKWADHA; LI, 2010; HELMI et al., 2016).

O pH pode afetar o crescimento do microrganismo, a precipitação de CaCO_3 , o transporte da ureia (substrato da urease) e a adesão das bactérias a superfícies, fator importante para distribuição homogênea dos cristais. Os padrões de precipitação

dos cristais de carbonato de cálcio em condições de supersaturação e flutuação de pH ainda não são bem compreendidos e precisam ser melhor estudados (MUJAH; SHAHIN; CHENG, 2016a). A atividade da enzima urease é dependente do pH, sendo ativa em faixas específicas. Na literatura, estudos relatam que a faixa de maior atividade de urease encontra-se entre pH 7 e 9 (REIS et al., 2017). Esses valores podem ser variáveis, em decorrência dos efeitos de outros fatores ambientais e da linhagem da bactéria.

Outros fatores, como o sítio de nucleação, a concentração de carbono dissolvido e a quantidade e tipo de bactérias, também influenciam o sucesso da MICP (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016). Os sítios de nucleação são importantes para a precipitação contínua e estável do CaCO_3 . Na superfície celular bacteriana, encontram-se cargas negativas que captam os cátions divalentes (Ca^{2+}). Essa ligação forma sítios de nucleação – regiões de alta densidade iônica – ideais para que ocorra a precipitação do carbonato (ANBU et al., 2016).

A concentração de íons carbonato (CO_3^{2-}) é influenciada pelos seguintes fatores: pH, concentração de carbono inorgânico dissolvido e de cálcio (Ca^{2+}) presentes naturalmente no ambiente ou introduzidos. Além desses fatores, a concentração de células bacterianas também interfere no processo. Elevadas concentrações de células bacterianas (acima de 10^6 células mL^{-1}) aumentam a quantidade de carbonato precipitado, visto que a concentração de urease e, por consequência, a taxa de hidrólise da ureia, aumentam proporcionalmente (OKWADHA; LI, 2010).

2.4. Formação dos cristais

As diferentes fontes de cálcio e a composição do meio de cultura podem influenciar nas diferentes formas do cristal de carbonato de cálcio. Anbu et al. (2016) relataram que a utilização de cloreto (CaCl_2) como fonte de cálcio promove a síntese de cristais com formato romboédrico, sendo essa considerada a forma mais estável da calcita. Na mesma revisão, o acetato de cálcio ($\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$) foi associado à indução da formação de cristais com formato lamelar, composto por vaterita. Além disso, os autores também apontaram que o lactato de cálcio ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6$) e glucanato de cálcio ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{CaO}_{14}$) induzem o desenvolvimento de vaterita na forma esférica. O CaCl_2 é relatado como uma das melhores fontes para a precipitação de carbonato de cálcio.

Além das diferentes fontes de cálcio, os formatos dos cristais podem estar relacionados com linhagens bacterianas específicas, uma vez que elas apresentam diferenças na atividade da urease (ANBU et al., 2016; REIS et al., 2017). O número de células bacterianas, por sua vez, pode interferir no tamanho dos cristais, pois a formação de um cristal novo é favorecida sobre um cristal que já existe. O maior número de células representa novos sítios de nucleação, que resultam na formação de cristais novos e pequenos, e não no crescimento dos cristais preexistentes (CHENG; SHAHIN; MUJAH, 2017). Otterstedt e Brandreth (1998) relatam que o tamanho dos cristais é inversamente proporcional ao número de sítios de nucleação.

2.5. Aplicações da MICP

A MICP é uma técnica *eco-friendly* que apresenta diversas aplicações, incluindo a imobilização de metais pesados e radionuclídeos, remoção de cálcio de águas residuais e sequestro de dióxido de carbono (CO₂). Além disso, essa técnica tem sido amplamente estudada por apresentar melhora na durabilidade e resistência de materiais de construção. Pode ser aplicada na restauração de prédios históricos, em processos de biocimentação, assim como na remediação de fissuras. Outras áreas de estudo incluem a melhoria de propriedades do solo (como estabilização de taludes) e o aumento da recuperação de petróleo em reservatórios (DHAMI; REDDY; MUKHERJEE, 2012; REIS et al., 2017; KIM, G.; KIM, J.; YOUN, et al., 2018). Nessa revisão, a MICP aplicada à biocimentação e à estabilização de solos será descrita com mais detalhes.

2.5.1. Biocimento ou bioconcreto

O concreto é um material relativamente barato e, portanto, um dos materiais de construção mais utilizados em todo o mundo. No entanto, a produção de cimento, um dos componentes básicos do concreto, gera extensos impactos ambientais. Em escala global, essa atividade consome aproximadamente 10-15% da energia industrial total e é responsável pela emissão de 5-8% de CO₂ antropogênico (ACHAL et al., 2015; REIS et al., 2017).

Apesar de seu amplo uso, as estruturas de concreto são constantemente expostas a fatores que afetam sua integridade, como o intemperismo, que podem promover a formação de rachaduras e fissuras. Esses defeitos estruturais podem

agravar o processo de deterioração da estrutura metálica interna de reforço, pois permite que ocorra a entrada de substâncias potencialmente agressivas (como água, gases, líquidos não-aquosos e/ou íons), que em contato com o metal podem provocar reações físicas e/ou químicas que resultam em danos irreversíveis (DHAMI; REDDY; MUKHERJEE, 2012; OMOREGIE; GINJOM; NISSOM, 2018).

O reparo dos danos em estruturas de concreto é muito dispendioso. Apenas nos Estados Unidos, estimou-se um gasto anual de 4 bilhões de dólares (1999-2001) para o reparo e manutenção de pontes rodoviárias de concreto que apresentavam corrosão na estrutura de reforço (SIERRA-BELTRAN; JONKERS; SCHLANGEN, 2014). Na Europa, os gastos com manutenção e reparo em estruturas de concreto feitos por Alemanha, França, Itália e Reino Unido superaram 300 bilhões de reais por ano. Nesses países, os custos com reparo e manutenção equivalem aos gastos de novas construções (CUNHA; CASTRO, 2016).

Além de oneroso, o reparo tradicional também é desvantajoso por apresentar riscos ao ambiente e à saúde. Portanto, alternativas mais econômicas e sustentáveis são necessárias. A técnica de MICP, que por precipitação de carbonato de cálcio produz o biocimento, é uma alternativa *eco-friendly*, capaz de aumentar a durabilidade e resistência das estruturas de concreto, proporcionando a restauração de tais estruturas (DHAMI; REDDY; MUKHERJEE, 2012; ANBU et al., 2016).

2.5.2. *Bio-grout*: bio-estabilização de solos

As propriedades mecânicas do solo nem sempre são as adequadas para atender ao uso desejado da terra e necessitam ser aprimoradas, principalmente na área da construção civil. As propriedades do solo como resistência, rigidez, estabilidade e durabilidade são alvos constantes de estudos visando à sua otimização (KRAJEWSKA, 2018). As técnicas atualmente utilizadas para melhorar as propriedades geotécnicas do solo, como o rejunte químico, requerem energia e geram sérios problemas ambientais, pois envolvem a utilização de produtos tóxicos que interferem negativamente nos ecossistemas (NEUPANE et al., 2013; KRAJEWSKA, 2018).

Como consequência dos problemas destacados acima, tecnologias alternativas que resultem em menor impacto ao meio ambiente e que sejam capazes de suprir a demanda crescente de infraestrutura e urbanização têm sido exploradas.

A utilização de microrganismos para melhorar as propriedades geotécnicas, embora ainda recente, é uma proposta bastante inspiradora (MUJAH; SHAHIN; CHENG, 2016a)

O *bio-grout* é um novo método de estabilização de solos que melhora as propriedades mecânicas por meio da utilização de microrganismos que precipitam o CaCO_3 (LI et al., 2015). A precipitação de CaCO_3 induzida por microrganismos (MICP) pode ser utilizada como uma alternativa sustentável em relação às técnicas utilizadas, pois é capaz de melhorar as propriedades do solo, reduzindo a permeabilidade em aproximadamente 98% e aumentando a rigidez e a resistência do solo. Por fim, a principal vantagem da técnica é a não-utilização de cimento, cuja produção é responsável por emissões significativas de gases de efeito estufa (HAMED et al., 2017).

A maior dificuldade da aplicação do *bio-grout* está relacionada com a distribuição das células bacterianas no solo, pois isso depende dos tamanhos dos grãos, mineralogia, porosidade e da própria bactéria. O solo com granulação fina é particularmente um limitante para a distribuição espacial de células bacterianas (KAWASAKI, 2012). Dentre os microrganismos potencialmente aplicáveis ao processo de MICP, destacam-se *Bacillus sphaericus* (CHENG et al., 2014), *Bacillus licheniformis* (HELMI et al., 2016) e *Sporosarcina psychrophila* (DE MUYNCK et al., 2013). Contudo, a maioria dos estudos utiliza a bactéria ureolítica *Sporosarcina pasteurii* (KAWASAKI, 2012).

2.6. *Sporosarcina pasteurii*

2.6.1. Características

A bactéria *Sporosarcina pasteurii* pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli e ordem Bacillales. É uma bactéria Gram-positiva, aeróbica, alcalofílica, em forma de bastonete, capaz de formar endósporos esféricos ou moderadamente ovoides. Cresce na temperatura de 30 °C e apresenta crescimento reduzido em temperaturas mais elevadas (GIBSON, 1935; DE VOS et al., 2011; KAWASAKI, 2012; RAJASEKAR; MOY; WILKINSON, 2017).

S. pasteurii é o organismo mais utilizado para a precipitação de CaCO_3 , pois não é patogênico, produz elevada quantidade de precipitado em curtos períodos, apresenta alta atividade ureolítica, é resistente a altas concentrações de amônio e é

naturalmente encontrada no solo, mais precisamente na subsuperfície (HAMED et al., 2017; MUJAH; SHAHIN; CHENG et al., 2016a). Por ser uma espécie caracterizada por apresentar células que não se agregam e que, portanto, possuem alta relação entre superfície e volume da célula, proporciona condições ideais para o início eficiente da precipitação de CaCO_3 (WHIFFIN, 2004; DEJONG; FRITZGES; NÜSSLEIN, 2006).

As células de *S. pasteurii* possuem dimensões que variam de 0,5 a 1,2 μm de diâmetro por 1,3 a 4,0 μm de comprimento e geralmente apresentam motilidade (BUCHANAN; GIBBONS, 1974). Quando ocorre a precipitação de carbonato de cálcio, as células podem aumentar seu tamanho em aproximadamente vinte vezes, o que dificulta a locomoção das bactérias através da matriz do solo (O'LEARY, 1989; DEJONG; FRITZGES; NÜSSLEIN, 2006).

2.7. Atividade ureolítica e crescimento em função da temperatura e do pH

2.7.1. Atividade ureolítica e o crescimento em função da temperatura

Por ser um processo biológico catalisado enzimaticamente, a MICP é influenciada pela temperatura (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016). Como mencionado, o efeito da temperatura sobre a fisiologia dos microrganismos é complexo, mas sabe-se que há um efeito significativo sobre a atividade ureolítica e o crescimento.

Moyo, Kissel e Cabrera (1889) avaliaram os efeitos da temperatura sobre as taxas de hidrólise da ureia no solo, mantendo constantes outros fatores que interferem em tal processo. O efeito da temperatura foi avaliado no intervalo de 5 a 45 °C. Os pesquisadores constataram que o aumento da temperatura promoveu aumento na atividade ureolítica. De acordo com estudos de Nemati e Voordouw (2003), a temperatura também exerce papel importante sobre a enzima urease. Ensaios em que a temperatura foi elevada de 20 a 50 °C mostraram um aumento da atividade da enzima e, conseqüentemente, da taxa de precipitação de CaCO_3 , que foi aumentada de 0,038 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ para 0,34 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$.

Embora o processo de precipitação também ocorra em temperaturas mais baixas, sendo possível a aplicação da técnica em países de clima frio, a taxa de precipitação não é tão pronunciada como em temperaturas entre 25 e 35 °C (OGATA et al., 2009). Nemati e Voordouw (2003) relataram que, em temperaturas entre 30 e

50 °C, a conversão foi próxima de 100% após 120 horas. Sob temperatura de 20 °C, a máxima conversão foi de 70% após 300 horas. A temperatura também influenciou o tamanho e a forma dos cristais. De Muynck et al. (2013) estudaram o crescimento e atividade ureolítica de vários microrganismos ureolíticos, incluindo *S. pasteurii* (DSM 33) nas temperaturas de 10, 20, 28 e 37 °C, e demonstraram que a atividade ureolítica aumenta com o aumento da temperatura. Sun et al. (2018) também utilizaram *S. pasteurii* para avaliar a atividade enzimática e as taxas de produção de CaCO₃ nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C. Os autores observaram que a 30 °C a atividade ureolítica, assim como a precipitação de cálcio, foi mais acentuada.

A influência de aspectos físicos, como a temperatura, na estabilização de solos também foi abordada por Cheng et al. (2014). No estudo, colunas de areia foram montadas e submetidas à biocimentação em temperaturas de 25 °C e 50 °C. Na temperatura de 50 °C, observou-se maior atividade ureolítica e, portanto, maior quantidade de CaCO₃ do que a 25 °C. No entanto, apesar de uma quantidade maior de precipitado, os cristais formados foram menores (cerca de 2-5 µm de diâmetro) do que a 25 °C (15-20 µm). Os cristais formados a 50 °C precipitaram em torno do grão de areia, resultando em menor resistência à compressão simples (60% a menos), enquanto que os cristais maiores são capazes de preencher as lacunas entre os grãos, o que resulta em maior resistência. Portanto, não é a quantidade de CaCO₃ formada a responsável pela resistência, mas potencialmente o tamanho e a forma de distribuição dos cristais. Rebata-Landa (2007) mostrou que, em temperaturas maiores que 60 °C, não há precipitação de CaCO₃, pois ocorre a morte dos microrganismos.

2.7.2. Atividade ureolítica e crescimento em função do pH

Assim como a temperatura, o pH desempenha um papel importante no crescimento bacteriano, na atividade da enzima urease e, conseqüentemente, na mineralização. Assim, é um dos fatores-chave para a precipitação de CaCO₃. A hidrólise da ureia eleva o pH e permite que a precipitação de carbonato de cálcio ocorra. Desta forma, torna-se essencial investigar esse fator a fim de se otimizarem as condições ambientais para que o processo de biocimentação possa ser aplicado em larga escala.

Na literatura, encontramos a bactéria *S. pasteurii* amplamente relatada em estudos de MICP e, portanto, artigos sobre a influência do pH dessa bactéria foram apresentados com maior ênfase.

De acordo com Wiley e Stokes (1962), *S. pasteurii* cresce em meio alcalino (pH 8 ou superior). Whiffin (2004) também determinou que as condições ótimas de pH para o crescimento de *S. pasteurii* ATCC 11859 encontra-se em torno de 9. Seifan et al. (2017) investigaram a precipitação de CaCO_3 resultante da atividade ureolítica de *Bacillus licheniformis* (ATCC 9789) e *Bacillus sphaericus* (NZRM 4381). Os autores constataram que a precipitação de CaCO_3 aumenta quando o pH também aumenta. Stocks-Fischer et al. (1999) investigaram as propriedades físicas e químicas da precipitação de CaCO_3 induzida por *S. pasteurii* (ATCC 6453). Os resultados mostraram que a precipitação de cálcio iniciou em pH $8,3 \pm 1$ e foi completa (98%) em pH 9. Em relação à atividade ureolítica, os autores notaram rápido aumento do pH 6 ao 8, identificando o ótimo da atividade em torno de 8 (KRAJEWSKA, 2009). Após esse valor, a atividade ureolítica apresentou um leve decréscimo.

Omoriegie et al. (2017) investigaram a atividade da urease sob a influência de diversas condições de pH em quatro linhagens de *S. pasteurii*. O método de condutividade foi utilizado para medir a atividade da urease na faixa de pH de 6,0 a 8,5. Curiosamente, as quatro linhagens apresentaram valores ótimos de pH diferentes. A linhagem denominada NB33 apresentou a máxima atividade da urease no pH 6,5, enquanto a linhagem LPB21 e a linhagem (DSM 33) em pH 7,5. As outras duas linhagens, NB30 e NB28, apresentaram a máxima atividade da urease no pH 8.

2.8. Condições para a precipitação de carbonato de cálcio

Diversos estudos e técnicas foram desenvolvidos por diferentes grupos de pesquisas visando a obtenção de maiores eficiências no processo de precipitação de CaCO_3 . Nesta seção da revisão, serão abordados alguns alvos de otimização.

2.8.1. Bactéria

A concentração de bactérias entre 10^6 e 10^8 células mL^{-1} parece ser a mais favorável para o processo de biocimentação baseada na precipitação de CaCO_3 . De acordo com Okwadha e Li (2010), a concentração ótima encontrada em seu experimento foi de $2,3 \times 10^8$ células mL^{-1} . A taxa de hidrólise da ureia é dependente

da concentração de células. Quanto mais células, maior será a quantidade de urease no meio e, conseqüentemente, maior a quantidade de CaCO_3 precipitada (REIS et al., 2017).

Outros pesquisadores citam que, para uma elevada atividade ureolítica, a densidade óptica ($\text{D.O.}_{600 \text{ nm}}$) deve estar dentro da faixa de 0,8 a 2,5 (DE MUYNCK et al., 2013; CHENG et al., 2014; MUJAH; SHAHIN; CHENG, 2016b; OMOREGIE et al., 2017; SUN et al., 2018).

A $\text{D.O.}_{600 \text{ nm}}$ pode ser convertida para concentração de células de *S. pasteurii* ATCC 11859 utilizando-se a expressão (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; BANG, 2001):

$$Y = 8,59 \times 10^7 \times Z^{1,3627}$$

Y = concentração de células mL^{-1}

Z = densidade óptica ($\text{D.O.}_{600.}$)

2.8.2. Fatores físico-químicos

Os ensaios laboratoriais de biocimentação consistem na introdução de bactérias no solo e a injeção de nutrientes que permitam a sobrevivência do microrganismo e a precipitação de CaCO_3 . Alguns fatores podem variar entre os diversos ensaios relatados na literatura, como a granulação do solo, a fonte de cálcio, a concentração de ureia e de CaCl_2 , a quantidade de células bacterianas, o volume de solução utilizado, o intervalo entre as aplicações, o tempo de cura e o mecanismo de aplicação no solo (PEDREIRA, 2014).

Achal e Pan (2014) analisaram diferentes fontes de cálcio e concluíram que o CaCl_2 apresentou os melhores resultados para o processo de MICP. Quanto à concentração dos compostos na solução cimentante, a precipitação de CaCO_3 é mais eficiente quando as concentrações de ureia e CaCl_2 são menores que $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Soluções com alta salinidade promovem floculação e conseqüentemente retenção das bactérias no solo. Por outro lado, quando a solução apresenta baixa salinidade, uma distribuição mais homogênea das células bacterianas no meio poroso é alcançada, pois a baixa força iônica permite que as células sejam transportadas a maiores distâncias (SOON et al., 2013).

De acordo com a literatura, o método mais comum de implementação da MICP é o de injeção. A injeção interrompida (i.e., quando entre as aplicações se pausa por

algumas horas) proporciona distribuição mais uniforme dos cristais, pois o fluido cimentante distribui-se uniformemente. Quando a injeção é contínua, a precipitação de calcita acumula-se próximo ao ponto de injeção (SOON et al., 2013).

Mujah, Shahin e Cheng (2016b) utilizaram uma solução contendo 1 mol L⁻¹ de ureia e 1 mol L⁻¹ de CaCl₂. Seguindo a mesma metodologia de Cheng et al. (2014), o solo foi lavado com 1 volume de vazios (i.e., volume total dos poros no solo) de água deionizada 24 horas antes do início do tratamento, para que a amostra estivesse completamente saturada. Posteriormente, aplicou-se 0,5 volume de vazios de suspensão bacteriana e solução cimentante. É desejável que os volumes de suspensão bacteriana e solução cimentante sejam iguais (CHENG; CORD-RUWISCH; SHAHIN, 2013). O tempo de retenção entre os ciclos de aplicação foi de 24 horas. Após esse período, foi realizada nova aplicação de 1 volume vazio de solução cimentante, em intervalos de 24 horas. Intervalos entre a aplicação da suspensão bacteriana e solução cimentante podem ser adotados, a fim de se permitir fixação da bactéria e possivelmente uma cimentação mais homogênea (CHENG; CORD-RUWISCH; SHAHIN, 2013).

Cheng et al. (2014) recomendam vários ciclos de aplicação da solução cimentante, a fim de se otimizar o processo de cimentação. Diferentes propriedades mecânicas do solo podem ser alcançadas quando esses passos são realizados mais de uma vez. Geralmente, a solução cimentante contém 1 mol L⁻¹ de ureia e 1 mol L⁻¹ de CaCl₂ em água deionizada (CHENG; CORD-RUWISCH; SHAHIN, 2013; CHENG et al., 2014; MUJAH; SHAHIN; CHENG, 2016b).

2.9. Desafios e perspectivas

Embora a técnica de MICP apresente diversas vantagens e tenha elevado potencial de aplicações, estudos ainda precisam ser realizados para que as limitações sejam superadas e o processo de produção seja ampliado em escala industrial. Como trata-se de um processo microbiano, as reações são mais lentas e mais complexas do que os processos químicos. Isto se deve à interferência de alguns fatores sobre o processo, como a temperatura, o pH e nutrientes disponíveis. Portanto, estudos que se destinam à otimização do processo são muito importantes (ANBU et al., 2016; REIS et al., 2017).

Além do tempo da reação, os fatores citados podem interferir na homogeneidade da cimentação do solo, um dos maiores desafios a ser superado. Como já mencionado, durante a precipitação, a calcita tende a se acumular próximo ao ponto de injeção da solução e, para que a homogeneidade seja alcançada, as bactérias precisam ser uniformemente distribuídas na coluna de solo (MUJAH; SHAHIN; CHENG, 2016a). Outro aspecto importante diz respeito ao meio de cultura para o crescimento microbiano, que pode representar de 10 a 60% dos custos no processo de biocimentação (WHIFFIN, 2004). Recentes estudos têm apresentado o uso potencial de fontes alternativas mais baratas, embora ainda sejam necessárias mais pesquisas (OMOREGIE et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos da concentração de ureia, temperatura, pH e tempo sobre aspectos fisiológicos da bactéria *S. pasteurii* ATCC 11859 (crescimento, cinética de produção de urease e atividade específica da enzima urease), visando desenvolver um modelo experimental para aplicação em solo com a finalidade de modificar suas propriedades mecânicas e hidráulicas.

3.1.1. Objetivos específicos

- Determinar o crescimento de *S. pasteurii* ATCC 11859 em função da concentração de ureia, pH e da temperatura;
- Determinar a cinética de produção da urease por *S. pasteurii* ATCC 11859 em função da concentração de ureia, pH e da temperatura;
- Identificar a concentração de ureia, pH, temperatura e tempo de cultivo ótimos para a produção da urease por *S. pasteurii* ATCC 11859;
- Determinar o efeito do pH (2,5 a 10,5) e da temperatura (5 a 45 °C) sobre a atividade da urease de *S. pasteurii* ATCC 11859;
- Verificar se a bactéria *S. pasteurii* ATCC 11859, nas condições ótimas definidas de concentração de ureia, pH, temperatura e tempo de cultivo, melhora as propriedades geotécnicas de um solo do horizonte C, típico da região de viçosa, visando ao processo de estabilização.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo e condições de cultivo

A bactéria *S. pasteurii* ATCC 11859, obtida junto à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), foi utilizada para a produção e análise da atividade de urease e nos ensaios de MICP. O microrganismo foi mantido em estoque a -80 °C em meio Tryptic Soy Broth (TSB) (peptona de caseína 17 g L⁻¹; peptona de soja 3 g L⁻¹; cloreto de sódio 5 g L⁻¹; glicose 2,5 g L⁻¹; fostato dipotássico 2,5 g L⁻¹; ureia 20 g L⁻¹) adicionado de ureia (40 g L⁻¹) e glicerol (20% v/v).

S. pasteurii foi reativada a partir do estoque em meio sólido TSB-ureia-ágar (ureia 40 g L⁻¹ e ágar 15 g L⁻¹). O cultivo e a manutenção da linhagem foram realizados em caldo TSB-ureia (ureia 20 g L⁻¹) sob temperatura de 30 °C. A solução de ureia foi preparada separadamente e, após filtrada, adicionada ao meio de cultura previamente autoclavado.

4.2. Cinética de crescimento e produção de urease

4.2.1. Cinética de crescimento e produção de urease em função de diferentes concentrações de ureia

Para obtenção do inóculo, uma única colônia foi transferida para caldo TSB-ureia (20 g L⁻¹) e o cultivo foi realizado por 48 horas sob temperatura de 30° C e rotação de 200 RPM. As células foram então inoculadas a uma densidade óptica a 600 nm (D.O._{600 nm}) igual a 0,05 em caldo TSB contendo diferentes concentrações de ureia (20, 40, 60 e 80 g L⁻¹). Para determinação do efeito das diferentes concentrações de ureia sobre o crescimento e produção da urease, *S. pasteurii* ATCC 11859 foi cultivada sob condições de temperatura e agitação constantes (30 °C e 200 RPM) por 40 horas.

4.2.2. Cinética de crescimento e produção de urease em função do pH

Definida a condição ótima de concentração de ureia no meio de cultivo, avaliou-se o efeito de diferentes valores de pH. Para isso as células foram lavadas duas vezes com solução salina (NaCl 0,8% m/v) estéril e centrifugadas em uma centrífuga

Eppendorf Centrifuge 5418, por 4 minutos sob uma rotação de 9000 RPM. As células foram então inoculadas ($D.O_{600\text{ nm}}$ igual a 0,05) em caldo TSB contendo 80 g L^{-1} de ureia e com pH inicial de 6,5, 7,5, 8,5 e 9,5. Os valores de pH inicial dos meios de cultura foram ajustados utilizando-se solução de HCl (6 mol L^{-1}) ou NaOH (3 mol L^{-1}) com auxílio de pHmetro (Digimed DM-20). Após o ajuste do pH, o caldo TSB-ureia foi esterilizado por filtração (tamanho do poro $0,22\text{ }\mu\text{m}$). O cultivo foi realizado sob condições de temperatura e agitação constantes ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 200 RPM) por 40 horas (mais informações, consultar tópico 4.2.4).

4.2.3. Cinética de crescimento e produção de urease em função de diferentes temperaturas

Definidos os valores mais favoráveis de concentração de ureia e pH, avaliou-se o crescimento e produção de urease em diferentes temperaturas. As células foram lavadas duas vezes em solução salina (NaCl 0,8% m/v) e centrifugadas em uma centrífuga Eppendorf Centrifuge 5418 por 4 minutos sob rotação de 9.000RPM. Posteriormente foram inoculadas ($D.O_{600}$ igual a 0,05) em caldo TSB estéril a pH 8,5 contendo 80 g L^{-1} de ureia. O cultivo foi realizado sob agitação constante de 200 RPM por 40 horas nas temperaturas de 25, 30, 35 e $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (mais informações, consultar tópico 4.2.4).

4.2.4. Determinação do crescimento e da atividade ureolítica

Alíquotas de 1,0 mL das bactérias em cultivo foram coletadas a cada 6 horas para determinação da $D.O_{600\text{nm}}$, da atividade ureolítica e do pH. A $D.O_{600\text{ nm}}$ foi medida utilizando-se espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis) e cubetas de polietileno com caminho óptico igual a 10 mm.

A atividade ureolítica foi determinada utilizando-se o método de condutividade elétrica. Para isso, 1,0 mL da cultura foi adicionado a tubos de ensaio contendo 9,0 mL de solução de ureia (1,5 M), seguindo-se homogeneização vigorosa em agitador tipo Vortex. A condutividade elétrica foi medida a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando-se condutivímetro (Thermo Scientific Orion 5 Star). As medidas foram realizadas a cada minuto no intervalo de 5 minutos (OMOREGIE et al., 2017). A hidrólise da ureia forma produtos iônicos (amônio) cuja concentração é proporcional à condutividade da solução. Portanto, a taxa de aumento da condutividade (mS min^{-1}) é proporcional à

atividade da urease (WHIFFIN, 2004). Os valores da densidade óptica ($D.O_{600\text{ nm}}$) e da condutividade elétrica (mS cm^{-1}) foram plotados em gráficos em função do tempo. A variação da taxa de condutividade ($\text{mS cm}^{-1} \text{ min}^{-1}$) foi obtida a partir do ângulo de inclinação dos gráficos plotados. A taxa de condutividade de cada triplicata, foi dividida pela densidade óptica respectiva, para se determinar a produção da urease, identificando-se as condições mais favoráveis (concentração de ureia, pH, temperatura e tempo de cultivo) para a produção da enzima.

Esses valores foram então analisados utilizando a análise de variância seguido do teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

4.3. Avaliação do comportamento da urease em resposta à temperatura e ao pH

4.3.1. Efeito da temperatura sobre a atividade ureolítica

Para o estudo do efeito da temperatura sobre a atividade da urease, os ensaios de atividade foram realizados utilizando-se 1,0 mL da cultura bacteriana obtida nas condições previamente determinadas como mais adequadas para produção da enzima. A alíquota da cultura foi adicionada a tubos de ensaio contendo 9,0 mL de solução de ureia ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$). A reação foi incubada em banho ultra termostático (Ethik Technology) para temperaturas até 20 °C ou em banho termostático (Marconi MA159/BB) para temperaturas a partir de 25 °C. A faixa de temperatura avaliada foi de 5 °C a 45 °C. Durante a incubação, a temperatura foi monitorada e a atividade enzimática foi avaliada por meio da medição da taxa de aumento da condutividade elétrica, conforme descrito anteriormente (item 4.2.4).

4.3.2. Efeito do pH sobre a atividade da enzima

Para o estudo do efeito do pH sobre a atividade da enzima urease, os ensaios foram realizados utilizando-se 1,0 mL da cultura bacteriana obtida nas condições previamente determinadas como ótimas para produção da enzima. Alíquotas de 1,0 mL da cultura foram centrifugadas em uma centrífuga Eppendorf Centrifuge 5418 por 4 minutos a 9.000 RPM e as células foram ressuspensas em solução salina ($\text{NaCl } 8 \text{ g L}^{-1}$). A suspensão celular foi adicionada a tubos de ensaio contendo 9,0 mL de solução de ureia (1,5 M) com valores de pH entre 2,5 e 10,5. A mistura foi então

incubada sob temperatura ambiente (25 °C) e a atividade enzimática foi avaliada por meio da medição da taxa de aumento da condutividade elétrica, conforme descrito no item 4.2.4.

Os tampões glicina-HCl (pH 2,5 e 3,5), citrato (pH 4,5), ácido cítrico/citrato de sódio (pH 5,5), fosfato de sódio (pH 6,5), tris-HCl/tris-base (pH 7,5), HEPES (pH 8,5), glicina-NaOH (pH 9,5) e carbonato de sódio/bicarbonato de sódio (pH 10,5) foram utilizados no preparo da solução de ureia (1,5 M) para o ensaio de atividade enzimática.

4.4. Preparo do corpo de prova e tratamento

4.4.1. Coleta e caracterização do solo

O material utilizado para a moldagem dos corpos de prova (CPs) para os ensaios de cimentação compõe-se de um solo do horizonte C, de cor rósea, muito comum nos taludes da região de Viçosa-MG. Esse solo, nos períodos chuvosos, geralmente ocasiona problemas de escorregamentos decorrentes de sua acentuada queda de resistência com o aumento do teor de umidade.

Para o presente estudo, o solo foi coletado no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa/MG, em um talude situado próximo ao Departamento de Educação Física (Figura 2). Após a coleta, uma amostra de solo foi encaminhada ao Laboratório de Engenharia Civil (LEC) da UFV para realização dos ensaios de granulometria, limite de liquidez (LL), limite de plasticidade (LP), massa específica natural do solo e teor de umidade natural. Análises químicas do solo foram realizadas no Laboratório de Análise de Solos, Tecido Vegetal e Fertilizantes do Departamento de Solos da UFV. Foram determinados o pH, a presença de Mg^{2+} , Al^{3+} , a capacidade de troca catiônica, presença de fósforo e o índice de saturação de alumínio (apêndice A).



Figura 2. Vista aérea do local (seta em vermelho) de coleta do solo para a montagem do experimento. Fonte: Google Earth (acesso em 05 de fevereiro de 2020).

4.4.2. Montagem do corpo de prova

Os corpos de prova (CPs) foram montados em moldes de polivinil cloreto (PVC) com 7,48 cm de diâmetro interno e 12 cm de altura. A altura dos CPs para a realização dos experimentos foi definida em 10 cm. Para facilitar a retirada e minimizar perturbações nos CPs, os moldes de PVC foram bipartidos ao longo da altura. Durante o processo de moldagem, as duas metades dos moldes foram mantidas unidas por meio de duas abraçadeiras de metal de 76-89 mm de diâmetro. O solo foi compactado por compressão estática em três camadas, procurando-se atingir os valores da massa específica natural do campo ($1,586 \text{ g cm}^{-3}$) e do teor de umidade natural do solo (13,8 %), determinados na época da coleta. Esses parâmetros foram definidos para que todos CPs utilizados no experimento apresentassem a mesma densidade e o mesmo índice de volume vazios do campo.

Esponjas de fibra de 1,0 cm de altura foram colocadas na superfície do solo compactado, com a finalidade de reduzir movimentações ocasionadas pela adição das soluções bacteriana e cimentante. Antes da compactação, foi colocado na base de cada molde de PVC um papel filtro o qual, após a moldagem do corpo de prova, foi envolvido por um tecido fino, a fim de se evitar o arraste de solo durante o tratamento (Figura 3).

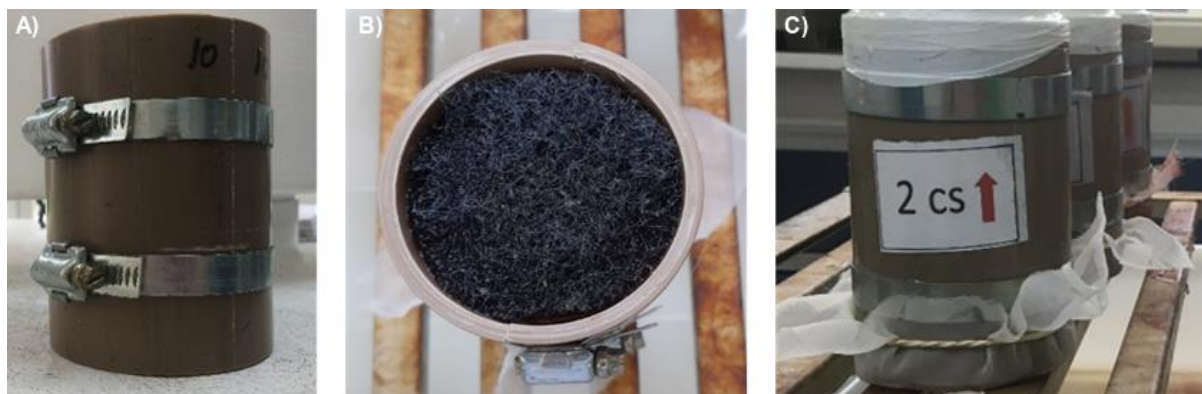


Figura 3. Montagem dos corpos de prova utilizados nos experimentos de *bio-grout*. (A) Molde de PVC utilizado na montagem dos corpos de prova; (B) esponja de fibra (1 cm) utilizada sobre a superfície do solo; (C) tecido utilizado na porção inferior dos corpos de prova. Fonte: O autor (2020).

4.5. Tratamento do solo

4.5.1. Cultivo de *S. pasteurii* para aplicação no solo

S. pasteurii ATCC 11859, previamente cultivada em caldo TSB-ureia (20 g L^{-1}), após ser lavada em solução salina ($\text{NaCl } 0,8\% \text{ m/v}$) e centrifugada duas vezes em uma centrífuga Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3R, foi inoculada a uma $D.O_{600\text{nm}}$ inicial de 0,05 em meio de cultura TSB-ureia (80 g L^{-1}). As condições previamente definidas como ótimas foram usadas para o cultivo. O pH do meio foi ajustado com solução de NaOH (6 mol L^{-1}) para 8,5. Após 16 horas de incubação a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 RPM, a massa de células foi sedimentada por centrifugação e suspensa em meio para uma densidade óptica entre 0,8 e 1,2. A cultura foi centrifugada em uma centrífuga Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3R (utilizando o rotor Fiberlite™ F14-6 x 250LE Fixed Angle Rotor) sob rotação de 10.000 RPM por 10 minutos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ para sedimentar as células. O sedimento foi ressuspendido em meio TSB-ureia (20 g L^{-1}) não autoclavado para aplicação no solo (tratamento).

4.5.2. Metodologia de tratamento do solo

O tratamento do solo foi definido com base em estudos prévios, com algumas modificações (WHIFFIN, 2004; CHENG; CORD-RUWISCH; SHAHIN, 2013; MUJAH; SHAHIN; CHENG, 2016b; MUJAH; CHENG; SHAHIN, 2019; OMOREGIE et al., 2019).

O volume de vazios do solo em estudo nos corpos de prova acima descritos (item 4.4.2) é $211,18 \text{ cm}^3$ e, para fins práticos, definiu-se que 1 volume de vazios

corresponde a 210 mL. Dois grupos foram definidos, o controle e o tratamento. O grupo controle foi composto por réplicas de meio TSB-ureia (20 g L^{-1}) sem inóculo. A bactéria *S. pasteurii* ATCC 11859 foi utilizada apenas no grupo tratamento a uma $D.O_{600\text{nm}}$ entre 0,8-1,2. A solução cimentante constituiu-se de ureia e CaCl_2 , não estéril, sendo que a concentração de cada composto químico nos ciclos 1 e 2 foi $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e, no ciclo 4, $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Ambos os grupos foram submetidos a condições iguais de incubação e aplicação no solo. O sistema de percolação foi adotado em todas as aplicações realizadas no solo. Cerca de 24 horas antes do início do tratamento, os corpos de prova foram saturados com água destilada com 1 volume de vazios. O esquema do protocolo de cimentação é apresentado na figura 4.

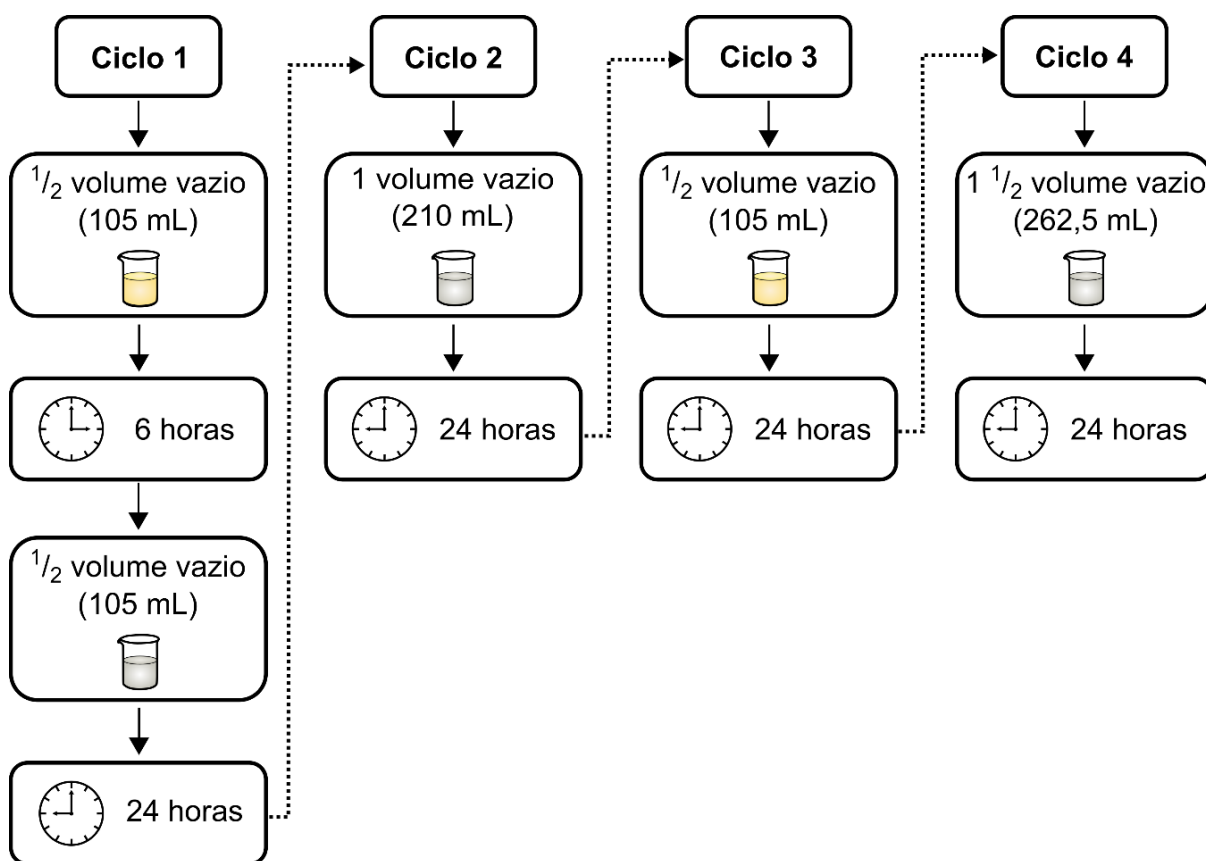


Figura 4. Esquema do protocolo de aplicação da suspensão bacteriana e cimentante. Após o ciclo 1, definiu-se um intervalo de 24 horas a partir da aplicação da suspensão bacteriana para o início do ciclo 2. Nos ciclos seguintes, o intervalo de 24 horas foi definido a partir da aplicação da única suspensão realizada no dia. Os béqueres na cor amarela indicam suspensão bacteriana enquanto que os na cor cinza, indicam solução cimentante. Fonte: O autor (2020).

Após o tratamento, os corpos de prova foram mantidos por 18 dias (tempo de cura) sob temperatura controlada de 25 °C (± 1 °C). As análises físicas da eficiência da MICP foram realizadas no Laboratório de Engenharia Civil (LEC) localizado no campus da UFV.

4.6. Análises físicas da eficiência da MICP

4.6.1. Ensaio de cisalhamento direto

Os blocos de solo dos corpos de prova tratados ou não com a suspensão bacteriana e solução cimentante (item 4.5.2) foram talhados em blocos quadrados com lados iguais a 5 cm e altura de 2 cm (5x5x2 cm) que, após montados em uma caixa de cisalhamento bipartida horizontalmente, foram adensados sob um carregamento vertical e em seguida submetidos ao cisalhamento. Para adensamento dos CPs, foram adotadas as tensões normais de 50 kPa, 100 kPa e 200 kPa.

Durante a etapa de cisalhamento, a metade inferior da caixa se desloca com velocidade constante e a metade superior se apoia em um dispositivo (anel dinamométrico) que registra a força horizontal atuante no plano horizontal médio do corpo de prova (CP). A força horizontal em um dado instante do ensaio, dividida pela área do CP, fornece o valor da tensão de cisalhamento atuante no solo naquele instante. O critério de ruptura adotado foi o recomendado pela norma D3080 (ASTM, 2011), segundo a qual essa condição pode ser adotada como a correspondente à tensão de cisalhamento máxima atingida no ensaio ou, em caso de aumento contínuo desta, a condição referente a uma deformação horizontal igual a 10%. Como resultados práticos do ensaio de cisalhamento direto, são obtidos os valores do intercepto de coesão (c) e do ângulo de atrito interno efetivo (f') do material ensaiado, os quais constituem os parâmetros de resistência ao cisalhamento.

4.6.2. Ensaio de resistência à compressão simples

A resistência à compressão simples (RCS) corresponde ao valor da tensão normal axial aplicada a um corpo de prova, sem confinamento lateral, capaz de ocasionar sua ruptura. Conforme a NBR 12770 (ABNT, 1992), nos ensaios de RCS é aplicada uma força axial no corpo de prova a uma velocidade constante, até sua ruptura.

Para os ensaios de RCS foram utilizadas amostras de solo com 7,48 cm de diâmetro interno x 10 cm de altura, tratadas e não tratadas com a suspensão de *S. pasteurii* ATCC 11859 e solução cimentante.

4.6.3. Ensaio de permeabilidade

A determinação dos valores dos coeficientes de permeabilidade (k) das amostras foi realizada em permeômetros de carga variável, conforme recomenda a norma brasileira NBR 14545 (ABNT, 2000), para solos com valores de k inferiores a 10^{-5} m s^{-1} ($10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$).

Nesse ensaio, o corpo de prova é submetido a uma carga hidráulica variável, e mede-se o intervalo de tempo (Dt) que a água na bureta leva para baixar de uma altura inicial (h_i) até uma altura final (h_f). Como todos os valores de k são referenciados a uma temperatura padrão de 20 °C, durante o ensaio deve também ser medida a temperatura da água, para que possa ser feita a conversão para a temperatura padrão.

4.6.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Para a visualização dos cristais de CaCO_3 formados no solo tratado com a suspensão de *S. pasteurii* ATCC 11859 e solução cimentante, mostrando sua localização e ligação entre as partículas do solo e análise da composição dos elementos distribuídos na superfície do material, amostras do solo controle e tratado foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e espectrometria de energia dispersiva (MEV/EDS). Utilizou-se um microscópio de varredura modelo Leo 1430VP acoplado a uma sonda de raio-X (EDS). Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Microscopia do Departamento de Física da UFV.

4.7. Delineamento Estatístico

Os experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com número de tratamentos previamente descrito, com pelo menos 3 repetições. Os dados dos ensaios de cinética de crescimento e produção de urease foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de nível de significância. O teste-t a 5% de

nível de significância foi utilizado para comparação de duas médias nos ensaios de resistência à compressão simples e permeabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Fatores que afetam a produção da enzima urease por *S. pasteurii* ATCC 11859

5.1.1. Efeito da concentração de ureia sobre a produção de urease de *S. pasteurii* ATCC 11859

Diferentes concentrações de ureia (20, 40, 60 e 80 g L⁻¹) foram utilizadas em meio de cultura TSB a fim de se determinar a concentração que proporciona a maior produção de urease por *S. pasteurii* ATCC 11859.

A atividade específica de urease aumentou com o aumento da concentração de ureia no meio de cultivo (Figura 5) a partir de 40 g L⁻¹. A maior atividade específica (0,1983 mS cm⁻¹ min⁻¹ D.O._{600nm}⁻¹) foi observada no tratamento com a maior concentração de ureia avaliada. Essa condição de cultivo apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada com os meios de cultura de concentrações menores de ureia. Omoregie et al. (2017) também observaram que a concentração de 80 g L⁻¹ de ureia permitiu a máxima atividade específica de urease em culturas de *S. pasteurii* DSM 33. Essa concentração de ureia foi mantida nos demais experimentos em que se avaliaram os efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade ureolítica de *S. pasteurii* ATCC 11859.

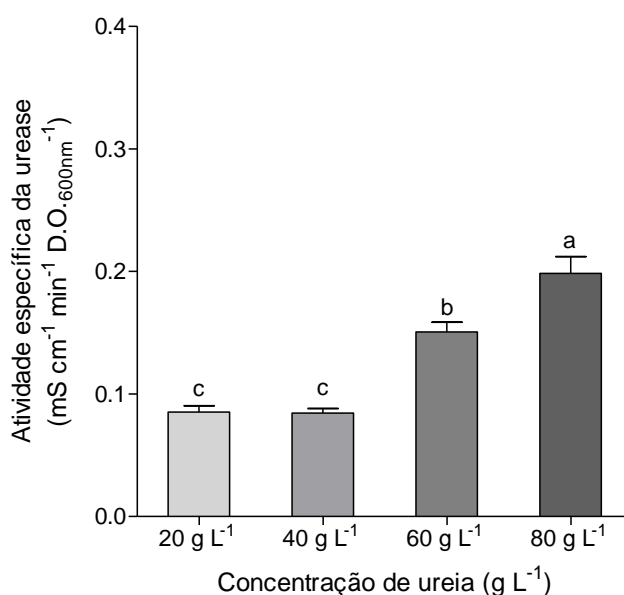


Figura 5. Médias das concentrações de ureia sobre a atividade ureolítica de *S. pasteurii* ATCC 11859. Traços acima das barras indicam média + desvio padrão. Tratamentos com a mesma letra (parte superior das barras) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A capacidade de produzir urease parece estar relacionada com o meio de cultura. É possível obter-se uma atividade específica de urease mais elevada, quando a composição do meio de cultivo é acrescida apenas de ureia (meio de cultivo - ureia) (ZHAO et al., 2019).

Todas as bactérias necessitam de fonte de nitrogênio para formar proteínas, enzimas e ácidos nucleicos durante seu crescimento (HAMZAH et al., 2013). *S. pasteurii*, quando cultivada em meio contendo ureia, exibe maior quantidade de cargas negativas superficiais e conseqüentemente maior capacidade de precipitação de calcita (MA et al., 2020). Elevadas concentrações de ureia parecem ser uma vantagem para bactérias ureolíticas, pois proporcionam mais energia para as atividades metabólicas e enzimáticas (OMOREGIE et al., 2017). Altas concentrações de ureia são capazes de proporcionar um aumento líquido do potencial eletroquímico de prótons (Δp) e da síntese de ATP. Isso sugere que a síntese de ATP da bactéria *S. pasteurii* ATCC 11859 está acoplada à hidrólise da ureia (JAHNS, 1996).

Lauchnor et al. (2015) demonstraram que a taxa de hidrólise da ureia por *S. pasteurii* é dependente da concentração de ureia no meio, de modo que taxas mais altas de ureólise estão relacionadas com concentrações mais elevadas de ureia.

O aumento da concentração de ureia no meio de cultivo, contudo, promoveu uma redução na produção de biomassa de *S. pasteurii* ATCC 11859. A D.O._{600 nm} média após 40 horas de cultivo em meio contendo 20 g L⁻¹ de ureia foi 2,26, decrescendo para 0,453 em meio de cultivo contendo 80 g L⁻¹ de ureia (apêndice B). Essa redução da biomassa pode estar relacionada com o direcionamento da energia (ATP) para as atividades de homeostase, e não para a replicação e crescimento microbiano (OMOREGIE et al., 2017).

5.1.2. Efeito do pH inicial do meio de cultura sobre a produção de urease de *S. pasteurii* ATCC 11859

A atividade ureolítica de *S. pasteurii* ATCC 11859 foi significativamente afetada pelo pH inicial do meio de cultivo, sendo que os tratamentos com pH inicial 8,5 e 9,5 apresentaram atividade específica de urease significativamente superior ($p < 0,05$) aos obtidos em pH 6,5 e 7,5 (Figura 6; apêndice C). Os valores de atividade específica da urease nos valores iniciais de pH 8,5 ($0,2395 \text{ mS cm}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ D.O.}_{600 \text{ nm}}^{-1}$) e 9,5 ($0,2764 \text{ mS cm}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ D.O.}_{600 \text{ nm}}^{-1}$) não apresentaram diferença estatística entre si.

Embora a maioria dos microrganismos ureolíticos requeiram pH próximo à neutralidade, algumas bactérias, como a *S. pasteurii*, requerem pH alcalino para seu crescimento (SOON et al., 2014; MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995). De acordo com Omoregie et al. (2017) o pH ótimo para a produção da enzima urease varia de acordo com a linhagem da bactéria. Os autores investigaram o pH ótimo para produção de urease em diversas linhagens de *S. pasteurii* cultivadas em caldo nutritivo e ureia (40 g L⁻¹) e concluíram que a produção máxima em linhagens distintas ocorreu nos pHs 6,5, 7,5 e 8. Por outro lado, a literatura relata uma faixa de pH entre 7 e 9 como ótima para a atividade da urease de *S. pasteurii* (LAUCHNOR et al., 2015; SOON et al., 2014; KUMAR; PRABHAKARA; PRUSHPA, 2013; DE VOS et al., 2011; WHIFFIN, 2004).

Para a linhagem *S. pasteurii* ATCC 11859 cultivada em meio TSB-ureia (80 g L⁻¹), o pH 8,5 mostra ser a condição que proporciona a obtenção de máxima produção de urease. O pH definido como ótimo é compatível com os estudos supracitados. Assim, esse valor de pH foi o adotado nos demais ensaios ao longo do trabalho.

Os valores iniciais de pH 6,5 e 7,5 resultaram nos menores valores de atividade específica da urease, 0,1990 mS cm⁻¹ min⁻¹ D.O._{600 nm}⁻¹ e 0,1448 mS cm⁻¹ min⁻¹ D.O._{600 nm}⁻¹, respectivamente.

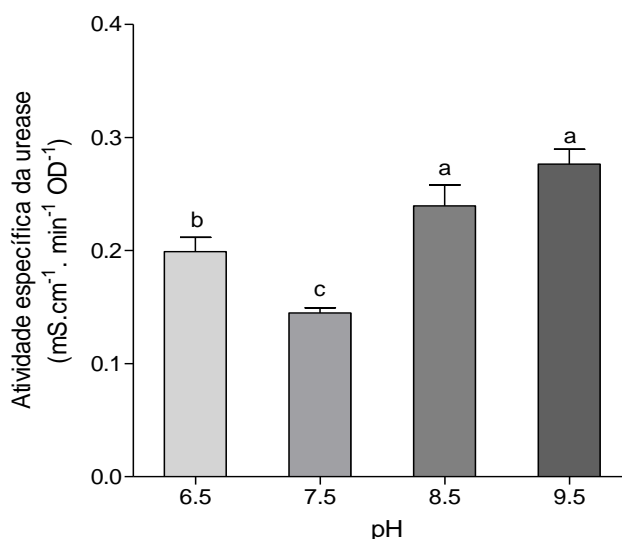


Figura 6. Médias dos pHs iniciais (6,5 a 9,5) sobre atividade ureolítica de *S. pasteurii* ATCC 11859 cultivada em meio TSB-ureia (80 g L⁻¹). Traços acima das barras indicam média + desvio padrão. Tratamentos com a mesma letra (parte superior das barras) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Durante o cultivo de *S. pasteurii* ATCC 11859, observou-se um aumento rápido do pH logo nas primeiras 6 horas de crescimento. O pH inicial do meio de cultura aumentou de 6,5, 7,5, ou 8,5 para 9,5 ($\pm 0,1$), enquanto o pH inicial de 9,5 permaneceu constante. Ma et al. (2020) estudando uma outra linhagem da mesma espécie, também observaram aumento do pH inicial do cultivo de 7,4 para 9,4 em 5 horas. O aumento do pH é consequência da produção de amônio no meio proveniente da hidrólise da ureia (GAT et al., 2014), cuja reação libera íons OH^- . O ambiente alcalino é adequado para a proliferação da *S. pasteurii*, relatada como uma bactéria alcalofílica (MA et al., 2020).

5.1.3. Efeito da temperatura sobre a produção de urease de *S. pasteurii* ATCC 11859

S. pasteurii ATCC 11859 foi capaz de crescer e apresentar atividade ureolítica em temperaturas entre 25 e 35 °C (Figura 7). A linhagem não apresentou crescimento a 40 °C (apêndice D). A temperatura de cultivo teve efeito significativo sobre a atividade específica de urease nas culturas de *S. pasteurii* ATCC 11859 (Figura 7). A maior atividade específica foi obtida sob temperatura de incubação de 35 °C, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos valores encontrados nas culturas obtidas a 25 ou 30 °C. Não houve diferença estatística entre esses dois últimos tratamentos ($p > 0,05$). A cultura obtida a 25 °C apresentou atividade específica da urease de $0,31 \text{ mS cm}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ D.O.}_{600 \text{ nm}}^{-1}$. Esse valor é cerca de 57 % o valor máximo encontrado a 35 °C ($0,54 \text{ mS cm}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ D.O.}_{600 \text{ nm}}^{-1}$). A atividade específica da enzima urease em células cultivadas a 30 °C foi o menor valor encontrado ($0,24 \text{ mS cm}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ D.O.}_{600 \text{ nm}}^{-1}$).

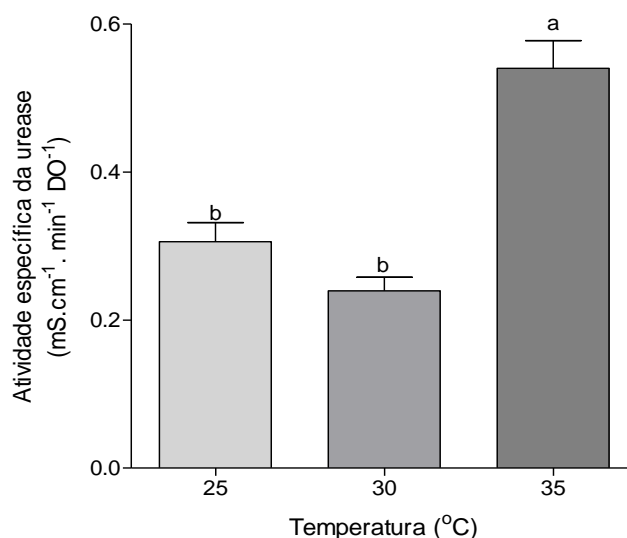


Figura 7. Média das temperaturas (25 a 35 °C) sobre atividade ureolítica de *S. pasteurii* ATCC 11859 cultivada em meio TSB-ureia (80 g L⁻¹) e pH 8,5. Na temperatura de 40 °C, não foi observado crescimento e, portanto, o resultado foi rejeitado nas análises estatísticas. Traços acima das barras indicam média + desvio padrão. Tratamentos com a mesma letra (parte superior das barras) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A temperatura de cultivo, assim como o pH, desempenha papel importante no crescimento e metabolismo dos microrganismos. A produção de enzimas, incluindo a urease, é afetada até mesmo por pequenas alterações na temperatura (SETHI; GUPTA, 2014).

A temperatura ótima de produção de enzimas varia entre as linhagens das bactérias. Omogerie et al. (2017) reportaram que as linhagens de *S. pasteurii* DSM 33, NB30 e NB33 cultivadas a 30 °C apresentaram a maior atividade específica da urease. Por outro lado, as linhagens LPB21 e NB28 exibiram o máximo de atividade específica a 25 °C.

O aumento da atividade enzimática comumente está relacionado com o aumento da temperatura. Whiffin (2004) reportou aumento da atividade da urease com a elevação da temperatura entre 25 e 60 °C. Embora a atividade ureolítica de *S. pasteurii* seja relatada como sendo proporcional ao aumento da temperatura, é importante considerar os aspectos fisiológicos da célula (SOON et al., 2013).

Neste trabalho, *S. pasteurii* ATCC 11859 não apresentou crescimento sob temperatura de 40 °C. De acordo com a literatura, o crescimento a 40 °C é debilitado (DE VOS et al., 2011). Por ter um efeito direto sobre a taxa de crescimento, a

temperatura influencia significativamente a produção de biomassa (SUN et al., 2018). Conclui-se, portanto, que a temperatura mais adequada para a obtenção de biomassa de *S. pasteurii* ATCC 11859, nas condições avaliadas, é 35 °C (apêndice D).

5.1.4. Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de urease por *S. pasteurii* ATCC 11859

Após a determinação da concentração de ureia, pH e temperatura mais adequados para obtenção de biomassa de *S. pasteurii* ATCC 11859 com elevada atividade específica de urease, definiu-se o tempo de cultivo necessário para se obter a máxima atividade específica da enzima, uma vez que o tempo de cultivo apresenta uma relação direta com a produção de enzimas (GAUTAM et al., 2011).

A atividade específica de urease de *S. pasteurii* ATCC 11859 aumenta com o aumento do tempo de incubação até 16 horas ($p < 0,05$). A partir desse tempo, não há diferença significativa da atividade específica da urease entre os tempos de cultivo até 40 horas (Figura 8).

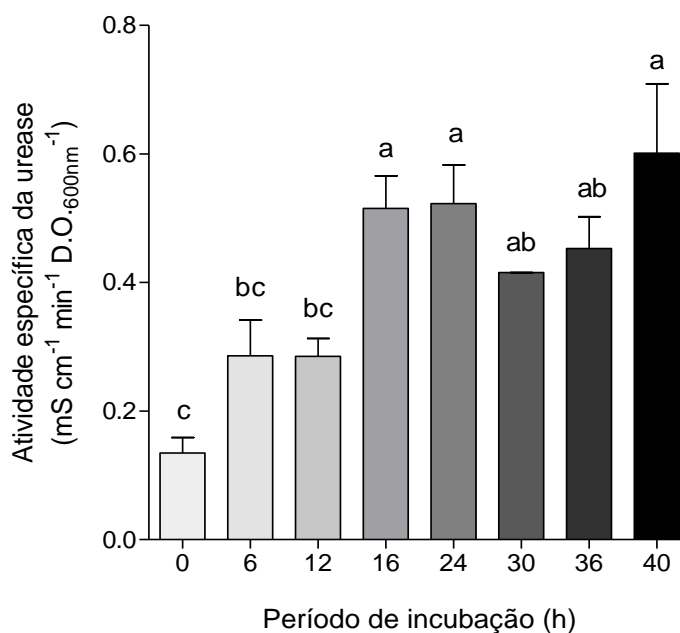


Figura 8. Médias dos tempos de cultivo (6 a 40 horas) sobre atividade ureolítica de *S. pasteurii* ATCC 11859 cultivada em meio TSB-ureia (80 g L⁻¹), pH 8,5 e 35 °C. Traços acima das barras indicam média + desvio padrão. Tratamentos com a mesma letra (parte superior das barras) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Omoregie et al. (2017) analisaram a atividade específica de urease em cinco linhagens de *S. pasteurii* entre 24 e 96 horas, identificando que todas elas atingiram os valores máximos em 24 horas.

De acordo com os resultados (Figura 8), o tempo de 16 horas foi definido como o tempo ótimo de cultivo, pois apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparado com os valores encontrados nas primeiras 12 horas, mas não com os valores encontrados entre 24 e 40 horas, refletindo em custos menores de produção de células de *S. pasteurii* ATCC 11859 com elevada atividade ureolítica.

De acordo com Omoregie et al. (2017), tempos de incubação maiores que 40 horas apresentam redução drástica na atividade específica da urease. Essa redução parece estar relacionada à redução da atividade celular, decorrente, dentre outras coisas, da diminuição da disponibilidade de nutrientes essenciais, incluindo a ureia, a qual é fonte de nitrogênio e energia (BURNE; CHEN, 2000; ACHAL et al., 2009; ALI et al., 2016). A redução da atividade específica de urease também pode ser explicada pelo acúmulo de amônio no meio de crescimento, o qual é um dos produtos da atividade de hidrólise da ureia pela urease. Algumas enzimas podem ser inibidas por altas concentrações do produto da reação enzimática (ROBINSON, 2015).

5.2. Cinética aparente da enzima urease

5.2.1. Efeito do pH sobre a atividade da urease

O perfil do gráfico de atividade da urease de *S. pasteurii* ATCC 11859 em função do pH do meio de reação apresenta forma de sino (Figura 9). Essa forma é também relatada na literatura (KRAJEWSKA, 2009). A atividade ureolítica aumenta até o pH 6,5, sofre um pequeno declínio até o pH 7,5 e permanece praticamente constante até o pH 8,5. Os resultados mostram que valores acima de 80% da atividade máxima (alcançada em pH 6,5) são mantidos na faixa de pH entre 5,5 a 8,5. Alguns autores relatam que as enzimas ureolíticas de *S. pasteurii* apresentam um ótimo de atividade entre o pH 7 e 8, sugerindo uma redução no pH 9 (CIURLI et al., 1996; WHIFFIN, 2004).

A atividade da enzima decresce abruptamente para 50,5% do valor máximo no pH 9,5 e 44,2% no pH 10,5.

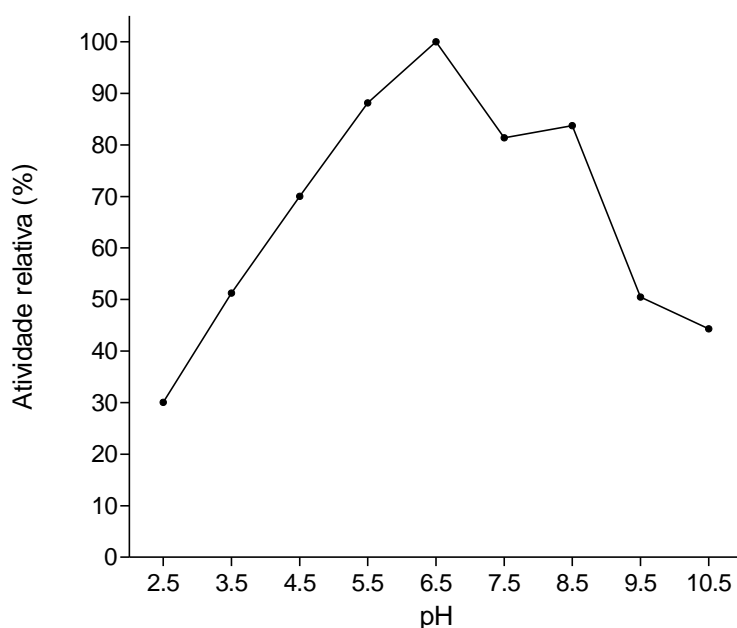


Figura 9. Efeito do pH (2,5 a 10,5) sobre a atividade da urease de *S. pasteurii* ATCC 11859 sob temperatura de 25 °C. A bactéria *S. pasteurii* ATCC 11859 foi cultivada em meio TSB-ureia (80 g L⁻¹), pH 8,5 e 35 °C por 16 horas.

Os resultados obtidos em nosso trabalho são similares aos encontrados na literatura, com a ressalva de que a atividade enzimática foi mantida em valores de pH menores que 4,5, ainda que reduzida. A capacidade da urease de *S. pasteurii* ATCC 11859 ser ativa em pH ácido é altamente desejável e reflete um potencial para aplicação em solos brasileiros, já que esses, em sua maioria, apresentam caráter ácido (FAGERIA; STONE, 1999).

5.2.2. Efeito da temperatura sobre a atividade da urease

Dentro da faixa de temperatura avaliada (5 a 45 °C), a urease de *S. pasteurii* ATCC 11859 começa a apresentar atividade a 15 °C, a qual se mantém praticamente inalterada até 20 °C. A partir dessa temperatura, a atividade aumenta linearmente com a temperatura até o limite estabelecido no ensaio (45 °C) (Figura 10). Sun et al. (2018) reportaram resultados semelhantes para a urease de *S. pasteurii* ATCC 11859. Ciurli et al. (1996) relataram que a urease isolada de *S. pasteurii* DSM 33 apresenta maior atividade na faixa de temperatura de 30 a 50 °C e Moyo et al. (1989) determinaram como sendo de 50 °C a temperatura ótima para a urease pura em solução e as temperaturas entre 60 a 70 °C como ótimas para a atividade da enzima no solo. Whiffin

(2004) avaliou uma faixa mais ampla de temperatura, demonstrando que a atividade da urease de *S. pasteurii* ATCC 11859 alcança o máximo a 70 °C. O aumento da temperatura proporciona maior taxa de agitação das moléculas e conseqüentemente aumento da taxa de reação. No entanto, altas temperaturas podem levar à desnaturação das enzimas (ROBINSON, 2015). De acordo com a literatura, temperaturas superiores a 50 °C podem ocasionar a desnaturação da urease e a morte dos microrganismos ureolíticos (CIURLI et al., 1996; WHIFFIN, 2004; REBATALLANDA, 2007).

Nas temperaturas abaixo de 15 °C, a urease de *S. pasteurii* ATCC 11859 não apresenta atividade. Os resultados indicam que a utilização dessa linhagem como agente de biocimentação ou *bio-grout* em regiões de clima frio pode ser ineficiente.

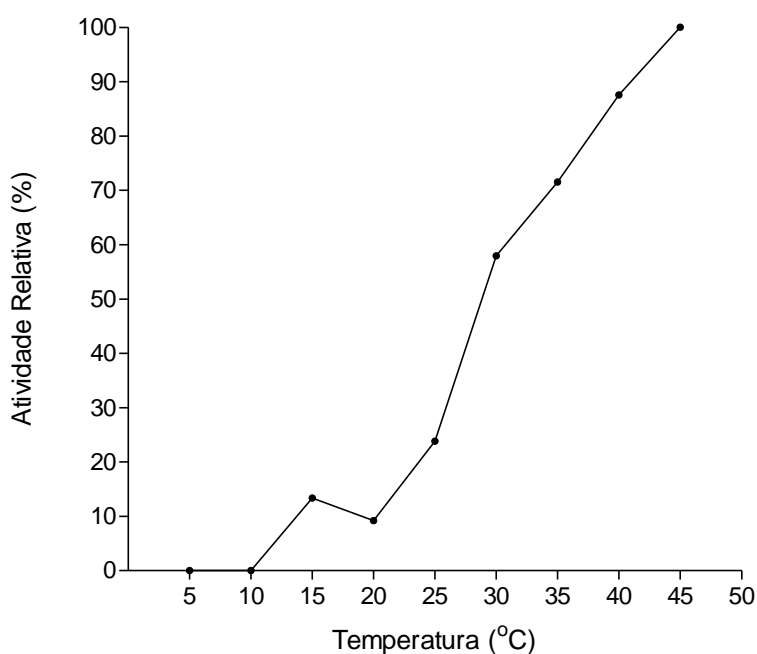


Figura 10. Efeito da temperatura sobre a atividade da urease de *S. pasteurii* ATCC 11859 cultivada em meio TSB-ureia (80 g L⁻¹), pH 8,5 a 35 °C por 16 horas. O ensaio de condutividade foi realizado na faixa de temperatura de 5 a 45 °C, com intervalos de 5 °C.

5.3. Caracterização do solo

Na Figura 11 é apresentada a curva granulométrica do solo utilizado na pesquisa. Na tabela 1 são apresentados os resultados dos ensaios de caracterização.

Considerando-se somente a textura, o solo utilizado pode ser classificado como uma areia silto-argilosa. Porém, como o solo possui a porcentagem em massa seca de partículas com tamanho inferior a 0,075 mm menor que 50%, limite de liquidez (LL) igual a 37% e índice de plasticidade (IP) igual a 14%, segundo o sistema universal de classificação de solos (Unified Soil Classification System - USCS), seu comportamento para aplicação em engenharia se enquadraria no grupo CL (Loam Clay), ou seja, de argilas de baixa plasticidade (ASTM, 2006).

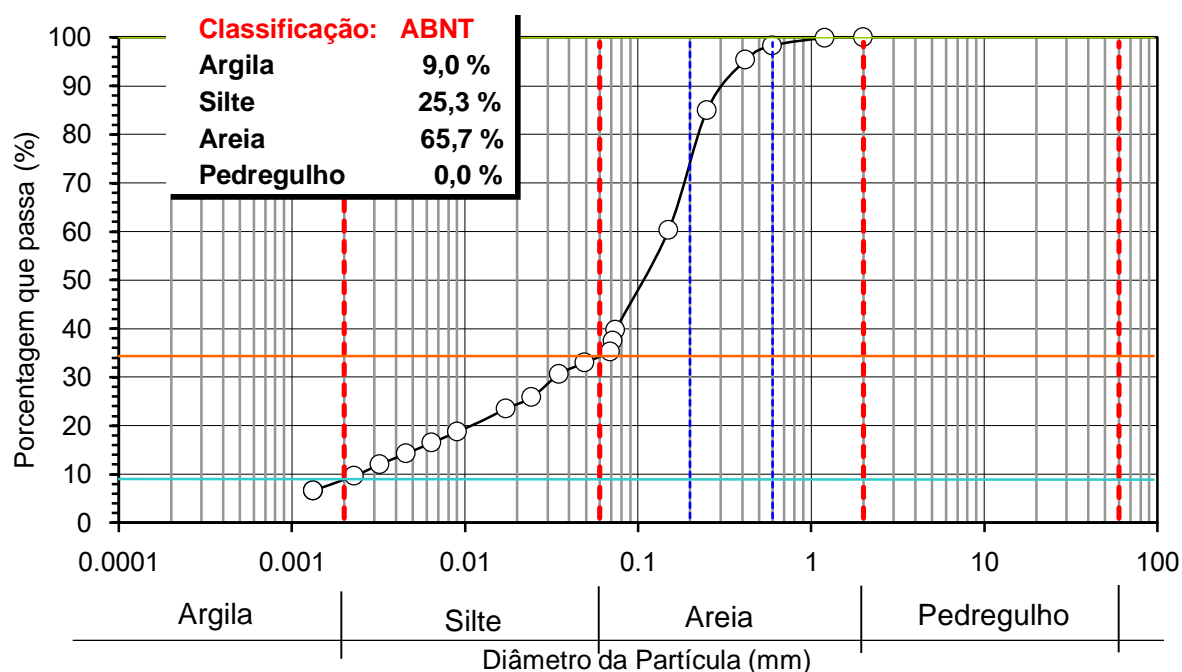


Figura 11. Curva granulométrica do solo utilizado nos experimentos de *bio-grout*.

Tabela 1. Caracterização física do solo utilizado nos experimentos de *bio-grout*.

Sólidos	Granulometria (%)				Limites			No campo	
	Argila	Silte	Areia	Pedregulho	LL (%)	LP (%)	IP (%)	ρ_{nat} (g cm ⁻³)	W _n (%)
ρ_s (g cm ⁻³)	9,0	25,3	65,7	0,0	37	23	14	1,586	13,8

w_n = Teor de umidade natural; ρ_s = Massa específica dos sólidos (grãos); LL = Limite de liquidez; LP = Limite de Plasticidade; IP = LL - LP = Índice de Plasticidade; ρ_{nat} = Massa específica natural (campo).

5.4. Ensaio de cisalhamento direto

O ensaio de cisalhamento direto foi realizado com as seções topo, meio e base dos corpos de prova tratados e não tratados (controle) com suspensão de *S. pasteurii* ATCC 11859.

Não houve diferença entre as tensões de cisalhamento das seções em ambos os grupos e, portanto, nos gráficos (Figuras 12 e 13) são mostrados os resultados sem distinção da seção de origem.

Na Figura 12 são apresentados os resultados dos ensaios de cisalhamento direto das amostras de solo tratado com a suspensão de *S. pasteurii* ATCC 11859 e solução cimentante, para as quais foi obtida uma envoltória de resistência ao cisalhamento média com um intercepto de coesão (c) igual a 10 kPa e um ângulo de atrito interno efetivo (ϕ') igual a 32° .

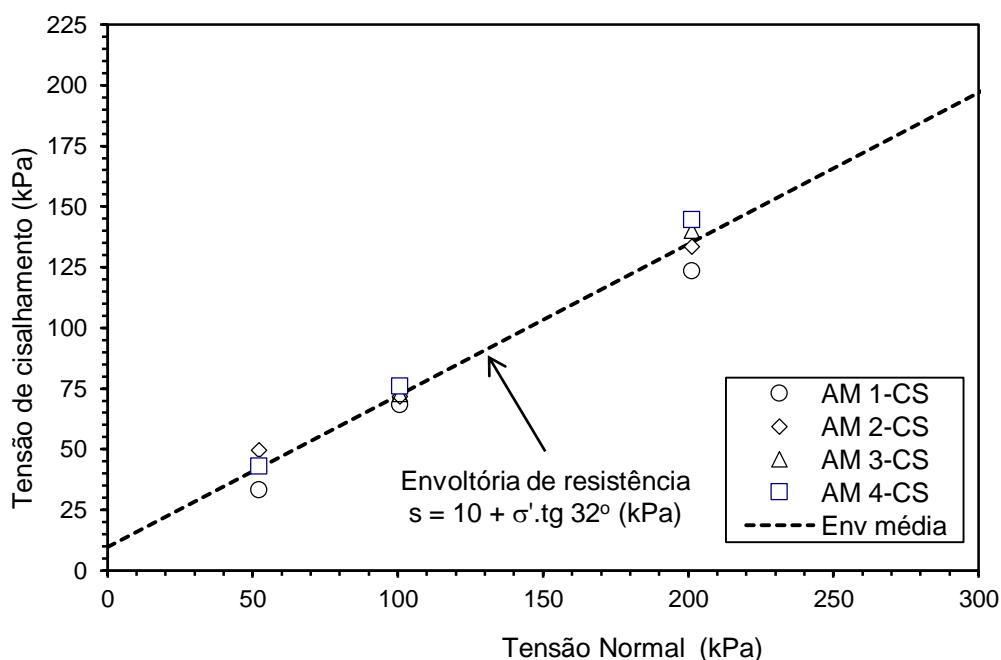


Figura 12. Resistência ao cisalhamento das amostras de solo tratado com a suspensão de *S. pasteurii* ATCC 11859 e solução cimentante quando adotadas as tensões normais de 50, 100 e 200 KPa. As repetições do solo tratado são indicadas por AM nº-CS. A envoltória média de resistência (--) é a reta que se aproxima dos pontos de ruptura dos ensaios.

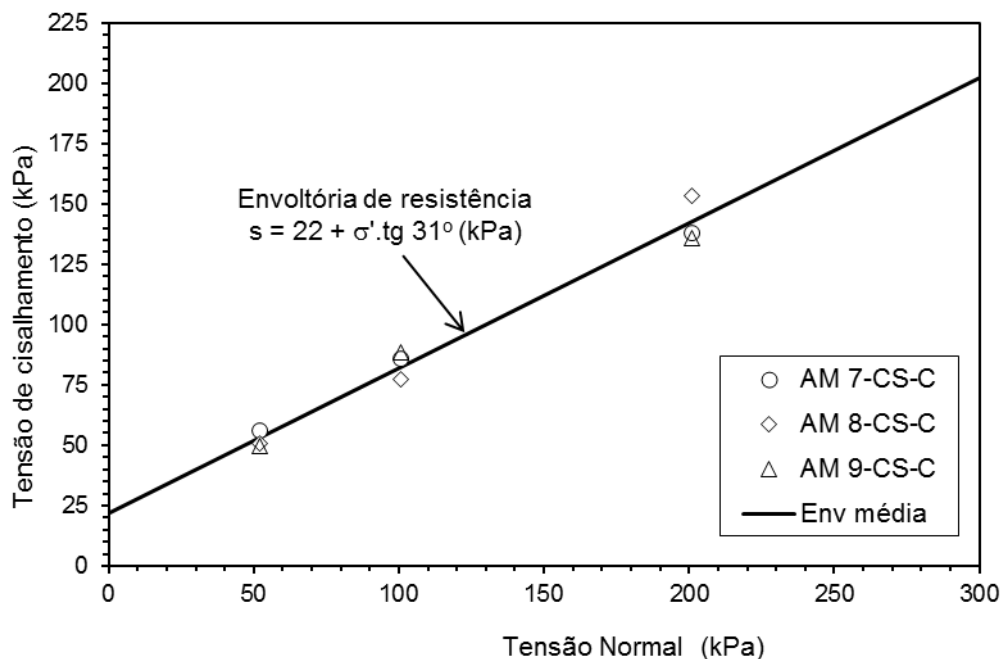


Figura 13. Resistência ao cisalhamento das amostras de solo não tratadas com a suspensão de *S. pasteurii* ATCC 11859 (controle) quando adotadas as tensões normais de 50, 100 e 200 KPa. As repetições do controle são indicadas por AM n°-CS. A envoltória média de resistência (-) é a reta que se aproxima dos pontos de ruptura dos ensaios.

Na Figura 13 são apresentados os resultados dos ensaios de cisalhamento direto das amostras de solo que não receberam a aplicação da suspensão de *S. pasteurii* ATCC 11859 (Controle), cuja envoltória de resistência ao cisalhamento média apresentou um intercepto de coesão (c) igual a 22 kPa e um ângulo de atrito interno efetivo (ϕ') igual a 31° .

Para efeito de comparação, são apresentadas na Figura 14 as duas envoltórias médias, onde se observa um sutil ganho de resistência das amostras não tratadas em relação às tratadas. O valor obtido do ângulo de atrito interno efetivo foi maior nas amostras tratadas com *S. pasteurii* ATCC11859 (32°) do que no controle (31°). No entanto, o intercepto de coesão foi maior no controle (22 kPa) do que nas amostras tratadas (10 kPa). Os resultados observados podem ser parcialmente explicados com base no fato de que, durante o período de tratamento, observou-se que houve uma dificuldade de penetração da solução cimentante no solo após as primeiras etapas do tratamento. A partir de uma certa etapa, observou-se que não houve mais penetração, acumulado a solução cimentante na superfície dos corpos de prova. Em função disso,

depreende-se que a solução cimentante nos corpos de prova tratados com a suspensão de *S. pasteurii* ATCC 11859 não chegou a atingir as profundidades cujos planos foram submetidos ao cisalhamento nos ensaios de cisalhamento direto. Portanto, não foi possível registrar ganhos de resistência em função do tratamento com *S. pasteurii* ATCC 11859.

O acúmulo de bactérias durante as etapas de aplicação e a rápida precipitação de cristais de calcita na superfície refletem a dificuldade da execução da técnica (CHENG et al., 2014). Apesar de o método de percolação ser simples e não exigir o uso de maquinaria pesada, este não é o mais adequado para solos classificados como silte ou argila (granulação fina), pois não permite uma distribuição homogênea das células bacterianas e a consequente precipitação de carbonato de cálcio entre partículas de todo o volume de solo que se deseja tratar. Solos de granulação fina apresentam baixa taxa de infiltração e permeabilidade quando comparados com a areia grossa, o que resulta em uma cimentação não uniforme, com cimentação apenas superficial. Uma alternativa proposta para tentar evitar-se o entupimento da superfície é a realização de enriquecimento de bactérias ureolíticas *in situ* (CHENG; SHAHIN, 2019).

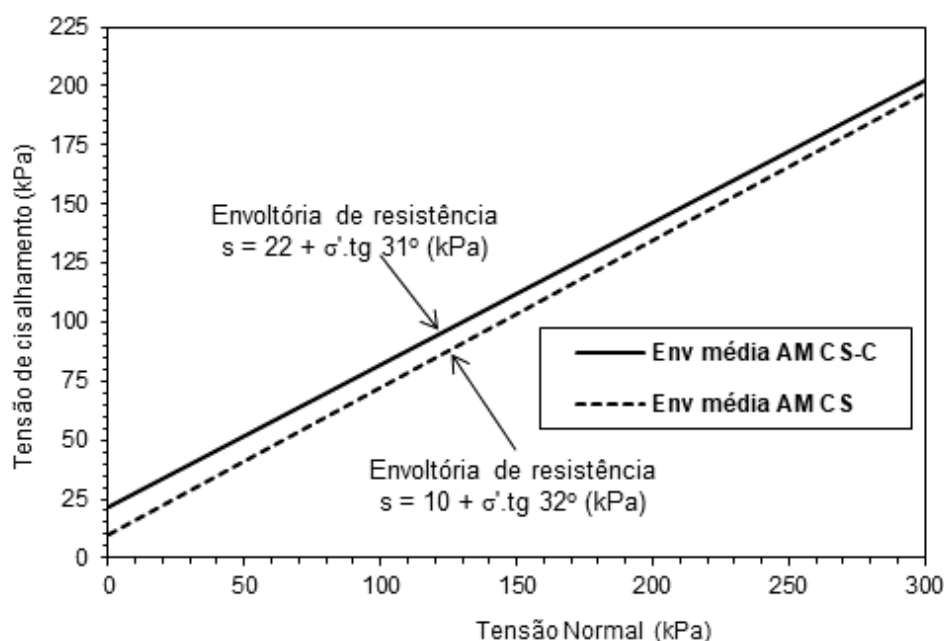


Figura 14. Comparação das envoltórias de resistência das amostras tratadas e não tratadas (controle) pela aplicação de suspensão de *S. pasteurii* ATCC 11859. A envoltória média de resistência do solo tratado é indicada por AM CS (--) e a do solo controle é indicada por AM CS-C (-). A envoltória média de resistência é a reta que se aproxima dos pontos de ruptura dos ensaios.

5.5. Ensaio de resistência à compressão simples

Os resultados dos ensaios de resistência à compressão simples são apresentados na Figura 15.

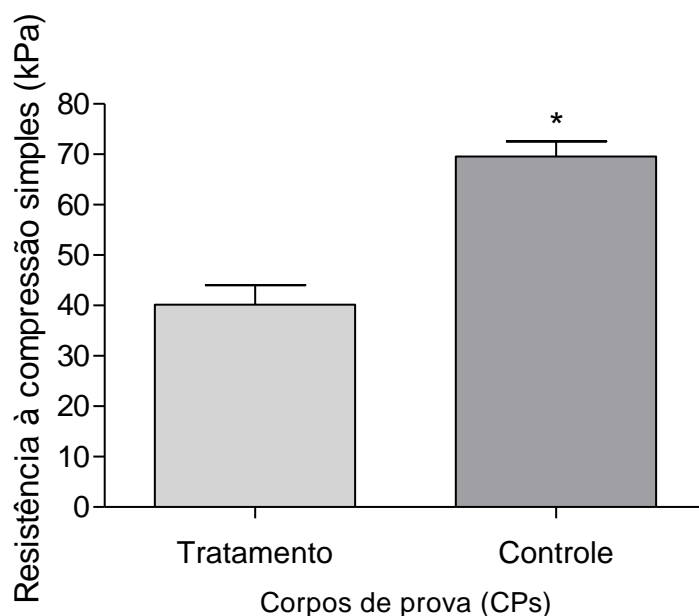


Figura 15. Resultados dos ensaios de resistência à compressão simples. As amostras de solo tratadas com suspensão bacteriana de *S.pasteurii* ATCC 11859 apresentaram menor resistência (40,17 kPa) em relação ao solo sem tratamento (69,53 kPa). Traços acima das barras indicam média + desvio padrão. A análise estatística foi feita pela comparação de duas médias pelo teste t. (*) equivale a p-valor < 0,05.

O grupo controle apresentou maior resistência média (69,53 kPa) do que o grupo tratado com a suspensão de *S. pasteurii* ATCC11859 (40,17 kPa). A explicação para esse resultado pode ser a mesma apresentada anteriormente para os dados de cisalhamento direto. As amostras de solo tratadas com suspensão bacteriana podem ter sofrido redução da porosidade na superfície do corpo de prova, o que levou à redução da permeabilidade, impedindo a percolação da solução cimentante e das células bacterianas. Para contornar este problema, Zhao et al. (2014a) sugerem a utilização de um método de “pré-mistura”, do solo com solução bacteriana, para se obterem amostras cimentadas mais homogêneas.

A permeabilidade do solo utilizado em nosso estudo é naturalmente baixa quando comparada com a de solos classificados como areia, o que pode explicar a ineficácia do tratamento em termos de ganho de resistência à compressão simples,

comparativamente aos resultados obtidos por Cheng et al. (2014), Zhao et al. (2014b) e Whiffin, Van Passen e Harkes (2007).

Os solos utilizados pelos autores são classificados como areia, com tamanho médio das partículas entre 0,33 mm - 0,46 mm. Por se tratar de solos com partículas maiores, é lícito supor que as células bacterianas se distribuíram mais uniformemente e a solução cimentante percolou mais facilmente por todo corpo de prova, permitindo a cimentação por toda sua extensão, refletindo em ganho significativo de resistência à compressão simples. Embora a distribuição homogênea de células bacterianas e a adequada percolação da solução cimentante pelo corpo de prova pareçam estar relacionadas ao sucesso da técnica de MICP, o aumento à resistência e a quantidade de CaCO_3 precipitado também estão relacionados com a quantidade de células bacterianas (enzima urease), concentração de ureia, íons de cálcio, tempo de tratamento e o tipo de solo utilizado durante o processo (ZHAO et al., 2014b).

5.6. Ensaios de permeabilidade

Os resultados dos ensaios de permeabilidade são apresentados na Tabela 2. As amostras tratadas com a suspensão de *S. pasteurii* ATCC11859 apresentaram redução significativa do coeficiente de permeabilidade (k), comparativamente ao controle.

Houve uma redução da ordem de 243 vezes nos valores médios de k nas amostras tratadas com *S. pasteurii* ATCC 11859, em relação às amostras controle. Essa redução mostra a eficiência da cimentação na redução da permeabilidade do solo. Os espaços vazios da porção superior dos corpos de prova são preenchidos por cristais de calcita, os quais são precipitados durante o processo de mineralização realizado pela bactéria, reduzindo a permeabilidade significativamente ($p < 0,05$) de $5,93 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ (controle) para $2,44 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$ (tratado).

O termo “*bio-clogging*” foi introduzido para se referir ao processo de preenchimento de poros por processos microbianos que resultam na redução da porosidade e condutividade hidráulica (IVANOV; CHU, 2008). Uma redução considerável da permeabilidade (83%) também foi relatada por Smith et al. (2017), ao tratarem um solo classificado como argila com a bactéria *S. pasteurii* ATCC11859 por 96 horas. Por outro lado, os resultados encontrados nesse estudo apresentam valores significativamente superiores de redução de permeabilidade quando comparados aos

encontrados por Al qabany e Soga (2013) e Van passen (2009), que relatam diminuição de 30 e 60%, respectivamente, em solos arenosos tratados com *S. pasteurii*. Gollapudi et al. (1995) sugerem que o grau de redução da permeabilidade está relacionado com a extensão do tratamento. Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram redução de 99,59% da permeabilidade do solo nas amostras tratadas com *S. pasteurii* ATCC11859 durante 96 horas, enquanto Gollapudi et al. (1995) encontraram resultados similares em 120 horas.

Apesar de o processo de precipitação estar concentrado apenas na região da superfície do solo, o processo de cimentação mostra-se promissor para o controle da permeabilidade dos solos. Ao contrário do que ocorreu nos ensaios de cisalhamento e de resistência à compressão simples, o método de percolação é eficiente para reduzir a permeabilidade (GOMEZ et al., 2015). O método de percolação pode ser adequado para redução da permeabilidade de rochas nos reservatórios de petróleo, para se evitar a erosão marginal, reduzir a poeira em estradas não pavimentadas e até mesmo como substituição da manta utilizada em aterros sanitários (IVANOV; CHU, 2008; GOMEZ et al., 2015; CHENG; SHAHIN, 2019).

Tabela 2. Coeficientes de permeabilidade a 20 °C. O grupo tratamento foi identificado como CP1, CP2, CP3 e CP4 e o grupo controle como CPc7, CPc8 e CPc9. Os resultados encontrados mostram diferença estatística entre as médias (p-valor < 0,05). A análise estatística foi feita pela comparação entre duas médias utilizando teste t.

CPs com tratamento (k em cm s ⁻¹)				CPs sem tratamento (k em cm s ⁻¹)		
CP 1	CP 2	CP 3	CP 4	CPc 7	CPc 8	CPc 9
4,93 x 10 ⁻⁷	1,72 x 10 ⁻⁷	1,47 x 10 ⁻⁷	1,62 x 10 ⁻⁷	4,80 x 10 ⁻⁵	7,93 x 10 ⁻⁵	5,59 x 10 ⁻⁵
Média = 2,44 x 10⁻⁷ cm s⁻¹				Média = 5,93 x 10⁻⁵ cm s⁻¹		

5.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Amostras dos corpos de prova utilizados nos ensaios de cisalhamento (controle e tratado) foram utilizadas para as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS). As imagens e as análises de EDS foram realizadas em três seções dos corpos de prova: topo, meio e base.

Como relatado anteriormente, o topo dos CPs tratados com bactéria *S. pasteurii* ATCC 11859 apresentaram uma diminuição significativa da permeabilidade. Esse resultado foi atribuído ao fato de a maioria das células bacterianas permanecerem na superfície dos corpos de prova durante a injeção da suspensão bacteriana, em razão da rápida precipitação de carbonato de cálcio (CaCO_3) que ocorre próximo ao ponto de injeção (CHENG; SHAHIN; CHU, 2018). Portanto, a precipitação de carbonato de cálcio ocorreu majoritariamente na superfície, conforme demonstrado pelas imagens de MEV/EDS (Figura 16 e 17).

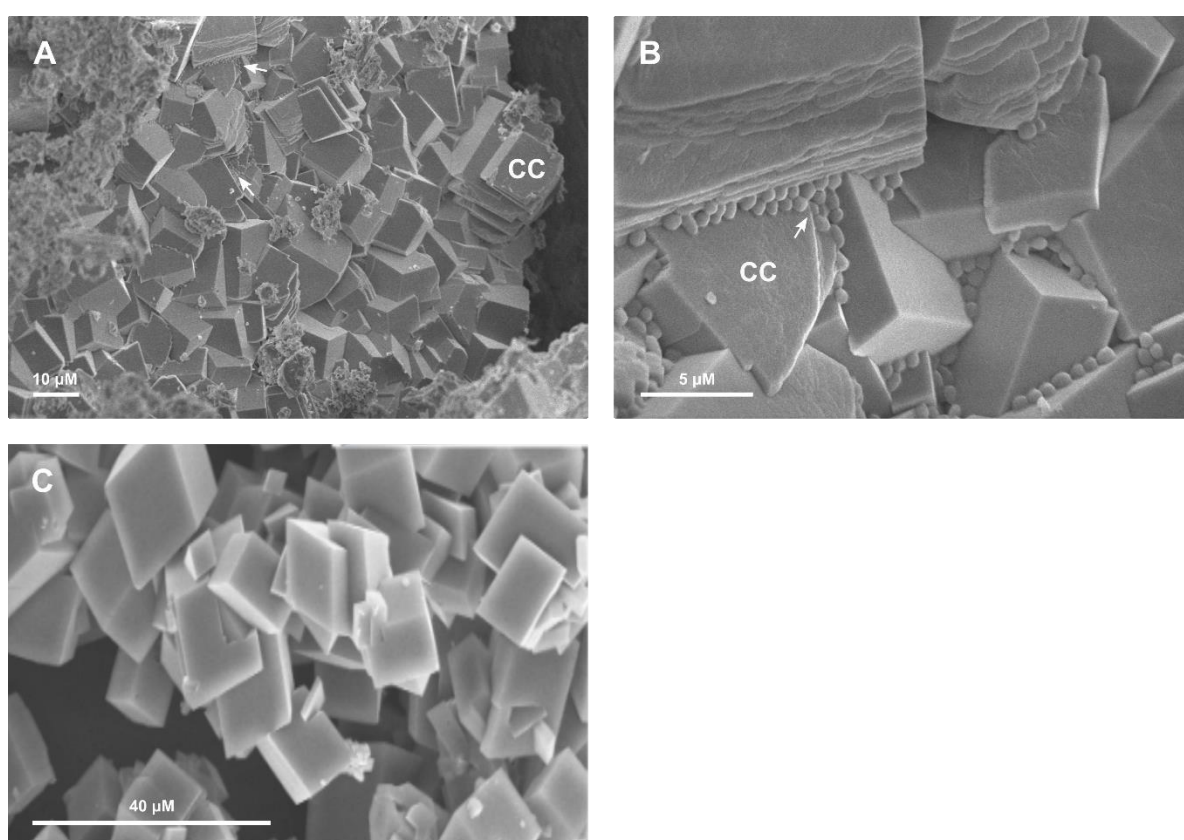


Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do topo do corpo de prova tratado com *S. pasteurii* ATCC 11859. Imagens de MEV da região do topo das amostras de solo tratadas com *S. pasteurii* ATCC 11859. (A) Presença de calcita na partícula do solo; (B) a seta indica a presença de células de *S. pasteurii* ATCC 11859 sobre os precipitados de calcita (CC); (C) morfologia dos cristais de calcita observada por Seifan e Berenjian (2018).

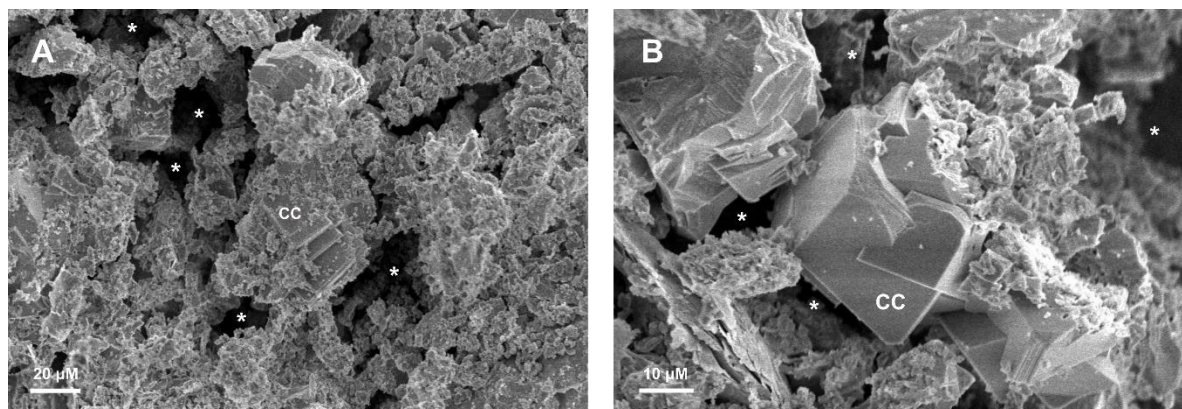


Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do topo do corpo de prova. Imagens de MEV da região do topo das amostras de solo tratadas com *S. pasteurii* ATCC 11859. (A) Redução dos espaços entre as partículas ocasionado pela precipitação dos cristais; (B) cristais de calcita (CC) fechando os poros do solo (*).

Os cristais de CaCO_3 formados são provavelmente cristais de calcita, cuja morfologia pode ser observada na figura 16C (SEIFAN; BERENJIAN, 2018). A imagem da Figura 16B é uma ampliação da área da Figura 16A. A ampliação permite observar com maior facilidade células bacterianas que assumimos ser a bactéria *S. pasteurii* ATCC 11859. As células servem como sítios de nucleação para precipitação dos cristais de CaCO_3 e, por esse motivo, podem ser visualizadas aderidas aos cristais (STOCKS-FISCHER et al., 1999)

A precipitação da calcita entre os poros reduziu os espaços vazios do solo, reduzindo o fluxo de água e, portanto, diminuindo a permeabilidade (Figura 17). Imagens similares, que mostram a precipitação de CaCO_3 entre as partículas, também são apresentadas na literatura (ANBU et al., 2016; CHENG; SHAHIN; MUJAH, 2017).

As análises de espectroscopia por energia dispersiva de raios-x (EDS), realizadas nas três seções dos corpos de prova, confirmam que a maior parte da precipitação de CaCO_3 ocorreu na região superior do corpo de prova. A região do topo apresentou um conteúdo em massa de cálcio (Ca) maior (53,97% m/m) em relação ao meio (0,74% m/m) e a base (0,13% m/m) (Figura 18).

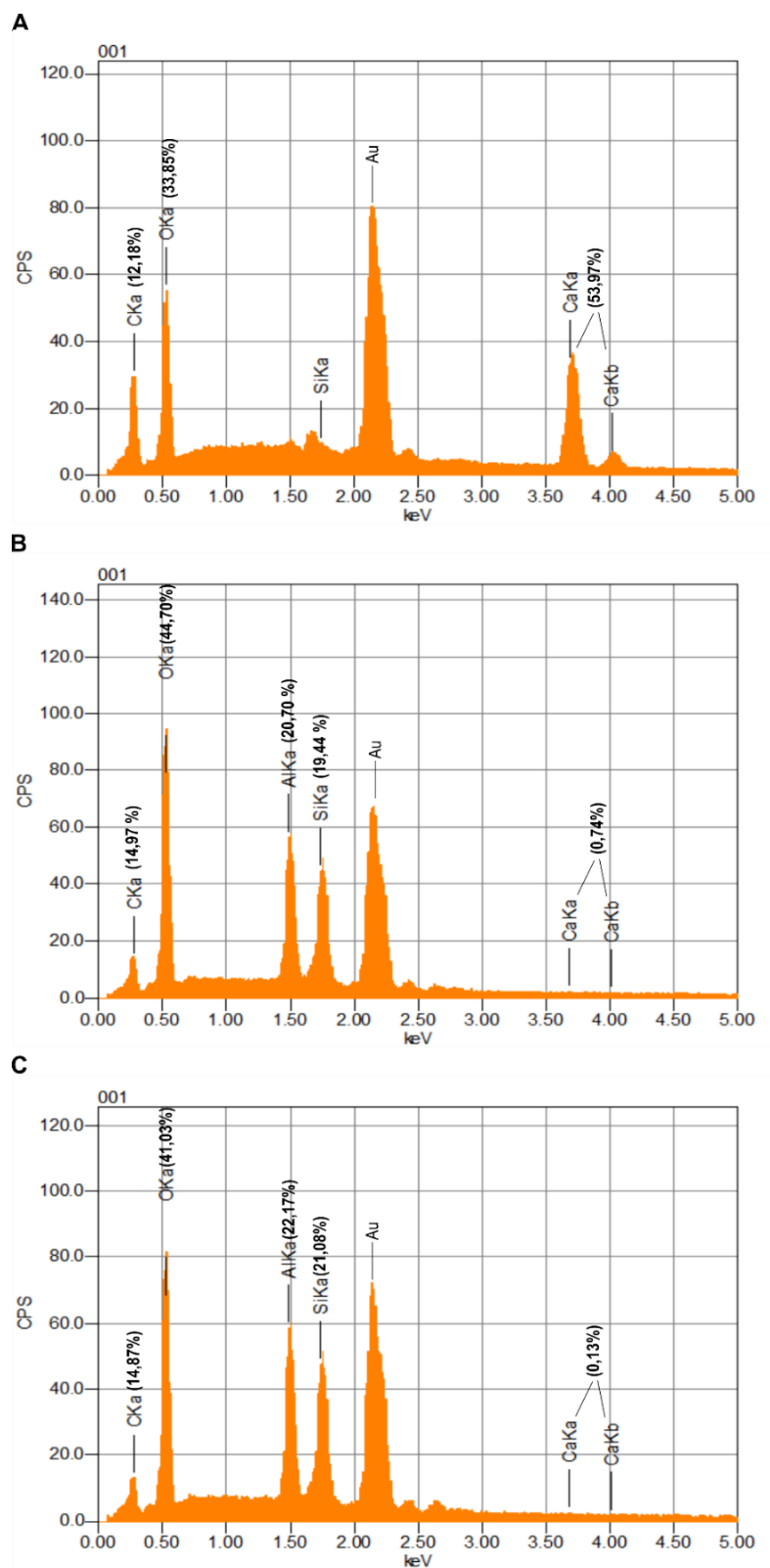


Figura 18. Espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) do corpo de prova submetido ao tratamento com *S. pasteurii* ATCC 11859. (A) Topo; (B) meio e (C) base.

As análises de EDS do grupo controle mostram que a presença de cálcio nas três regiões varia pouco (Figura 19). A região do topo apresenta valores menores de cálcio (2,68% m/m) em relação ao observado no tratamento (53,97% m/m). As análises de EDS da seção do meio (0,74% m/m) e base (0,13% m/m) das amostras de solo tratadas com a suspensão bacteriana de *S. pasteurii* ATCC11859 mostram valores menores do que os obtidos no controle (1,20% m/m e 1,22% m/m, respectivamente) (Figura 19). Esse resultado está possivelmente relacionado com a percolação das soluções durante o tratamento. No grupo tratamento, a camada superior sofreu redução da permeabilidade em função da deposição de cristais de CaCO_3 entre as partículas de solo, o que dificultou a penetração da solução cimentante para as camadas mais profundas dos corpos de prova. No grupo controle, não houve a formação dos cristais de CaCO_3 na superfície e, portanto, a permeabilidade não foi reduzida, o que favoreceu a percolação das soluções por todo corpo de prova, proporcionando maiores teores de cálcio nas regiões meio e base.

Embora o controle tenha apresentado maior resistência ao cisalhamento, não foi possível observar cristais de carbonato em quaisquer das seções dos corpos de prova. Nas imagens de MEV, não foi possível identificar outros cristais que possam ter proporcionado tal resultado (Figura 20).

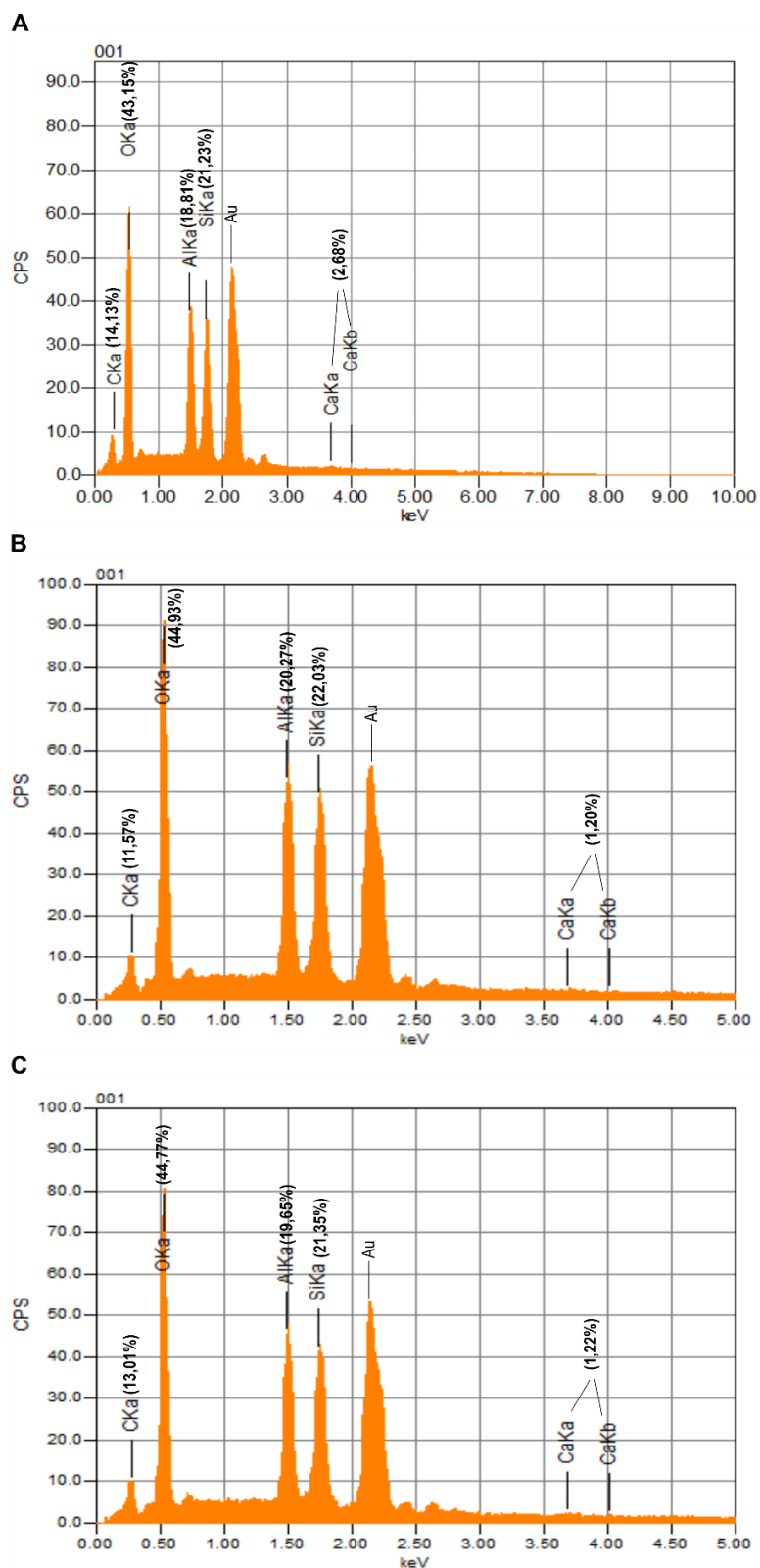


Figura 19. Espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) do corpo de prova controle. Análises de região EDS das amostras de solo não tratadas com *S. pasteurii* ATCC 11859. (A) Topo; (B) meio e (C) base.

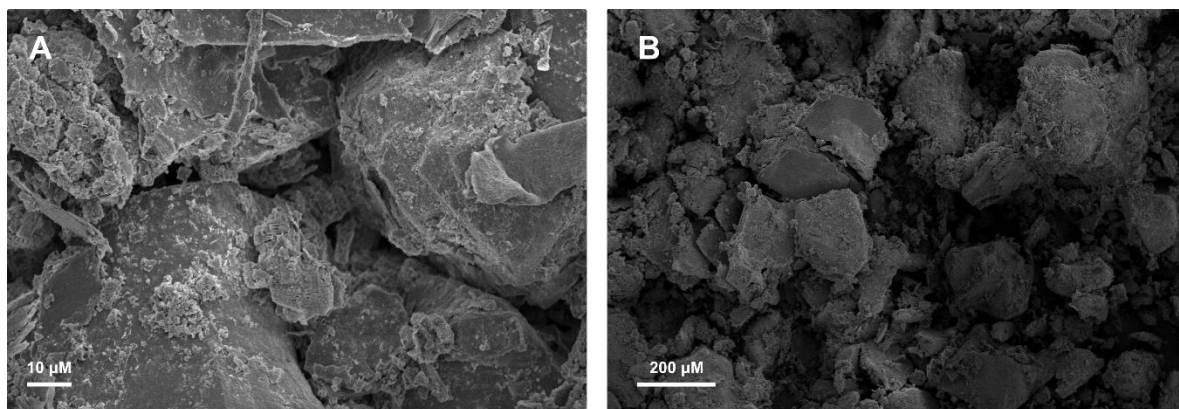


Figura 20. Microscopia eletrônica de varredura do controle (MEV). Imagens de MEV da região do topo das amostras controle. Não há presença de cristais de calcita entre as partículas de solo.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, estabeleceram-se as melhores condições de cultivo para a bactéria *S. pasteurii* ATCC 11859, envolvendo a concentração de ureia no meio de cultivo, temperatura, pH e tempo de incubação, visando a maior produção da enzima urease e um modelo experimental para aplicação da biocimentação em solos (*bio-grout*).

A condição que propiciou maior produção da enzima urease foi o meio de cultura TSB-ureia (peptona de caseína 17 g L⁻¹; peptona de soja 3 g L⁻¹; cloreto de sódio 5 g L⁻¹; glicose 2,5 g L⁻¹; fosfato dipotássico, 2,5 g L⁻¹) contendo 80 g L⁻¹ de ureia, pH 8,5, sob uma temperatura de 35 °C por 16 horas de cultivo.

A urease de *S. pasteurii* ATCC 11859 apresenta máxima atividade a pH 6,5, mantendo atividade acima de 80% do valor máximo em uma faixa de pH de 5,5 a 8,5.

A atividade da urease de *S. pasteurii* ATCC 11859 aumenta proporcionalmente ao aumento da temperatura entre 20 e 45 °C (máxima temperatura avaliada no estudo) e é interrompida em temperaturas ≤ 10 °C.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) mostraram a precipitação de cristais de calcita na seção superficial do solo submetido à biocimentação por *S. pasteurii* ATCC 11859 cultivada sob as condições otimizadas. Essa precipitação, embora superficial, foi suficiente para reduzir em 99,56% a permeabilidade do solo utilizado, classificado com textura de areia fina a média (silto-argilosa).

Os resultados obtidos sugerem potencial utilidade da estratégia desenvolvida para redução da permeabilidade em solos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHAL, V.; MUKHERJEE, A.; BASU, P. C.; REDDY, M. S. Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 981-988, 2009.
- ACHAL, V.; PAN, XIANGLIANG. Influence of Calcium Sources on Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation by *Bacillus* sp. CR2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 1, p. 307-317, 2014.
- ACHAL, V.; MUKHERJEE, A.; KUMARI, D.; ZHANG, Q. Biomineralization for sustainable construction—A review of processes and applications. **Earth-Science Reviews**, v. 148, n., p. 1-17, 2015.
- ALI, S. R.; ANWAR, Z.; IRSHAD, M.; MUKHTAR, S.; WARRAICH, N. T. Bio-synthesis of citric acid from single and co-culture-based fermentation technology using agro-wastes. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 1, p. 57-62, 2016.
- AL QABANY, A.; SOGA, K. Effect of chemical treatment used in MICP on engineering properties of cemented soils. **Géotechnique**, v. 63, n. 4, p. 331-339, 2013.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - **ASTM D2487-06**, Standard Practice for Classification of Soils for Engineering Purposes (Unified Soil Classification System), ASTM International, West Conshohocken, PA, 2006.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - **ASTM D3080/D3080M-11**, Standard Test Method for Direct Shear Test of Soils Under Consolidated Drained Conditions. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2011.
- ANBU, P.; KANG, C. H.; SHIN, Y. J.; SO, J. S. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. **Springerplus**, v. 5, p. 250, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12770: Solo coesivo - Determinação da resistência à compressão não confinada: Método de ensaio**. Rio de Janeiro, 1992.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14545: Solo – Determinação do coeficiente de permeabilidade de solos argilosos a carga variável**. Rio de Janeiro, 2000.
- BENZERARA, K.; MIOT, J.; MORIN, G.; ONA-NGUEMA, G.; SKOURI-PANET, F.; FERARD, C. Significance, mechanisms and environmental implications of microbial biomineralization. **Academie des Sciences Comptes Rendus Geoscience**, v. 343, p. 160-167, 2011.

BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**: Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1974, v.8

BURNE, R. A.; CHEN, Y.-Y. M. Bacterial ureases in infectious diseases. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 5, p. 533-542, 2000.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**: ESALQ, Piracicaba, SP, v. 2, 2016.

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

CHENG, L.; SHAHIN, M.; CORD-RUWISCH, R.; ADDIS, M.; HARTANTO, T.; ELMS, C. Soil stabilisation by microbial-induced calcite precipitation: investigation into some physical and environmental aspects. In: 7th International Congress on Environmental Geotechnics, 2014 Melbourne, Australia. **Resumos** [...]. Melbourne, 2014. p. 1105-1112.

CHENG, L.; SHAHIN, M. A.; MUJAH, D. Influence of key environmental conditions on microbially induced cementation for soil stabilization. **Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering**, v. 143, n. 1, 2017.

CHENG, L.; SHAHIN, M. A.; CHU, J. Soil bio-cementation using a new one-phase low-pH injection method. **Acta Geotechnica**, p. 615-626, 2018.

CHENG, L.; SHAHIN, M. A. Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP) for Soil Stabilization. In: **Ecological Wisdom Inspired Restoration Engineering**: Springer, p.47-68, 2019.

CHOU C. W.; SEAGREN, E. A.; AYDILEK, A. H.; LAI, M. Biocalcification of sand through ureolysis. **Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering**, v. 137, n. 12, p. 1179-1189, 2011.

CIURLI, S.; MARZADORI, C.; BENINI, S.; DEIANA, S.; GESSA, C. Urease from the soil bacterium *Bacillus pasteurii*: Immobilization on Ca-polygalacturonate. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 6, p. 811-817, 1996.

CUNHA E CASTRO, T, F. **Manutenção em Estruturas de Concreto Armado Baseado no Conceito de Manutenção Centrada em Confiabilidade**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2016.

DE MUYNCK, W.; VERBEKEN, K.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Influence of temperature on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1335-1347, 2013.

DEJONG, J. T.; FRITZGES, M. B.; NÜSSLEIN, K. Microbially Induced Cementation to Control Sand Response to Undrained Shear. **Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering**, v. 132, n. 11, p. 1381-1392, 2006.

DEJONG, J. T.; MORTENSEN, B.; MARTINEZ, B.; NELSON, D. **Bio-mediated soil improvement**, v. 36, p. 197-210, 2010.

DE VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K.-H.; WHITMAN, W. B. **Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes**: Springer Science & Business Media, 2011, v.3

DHAMI, N. K.; REDDY, S. M.; MUKHERJEE, A. Biofilm and microbial applications in biomineralized concrete. In: (Ed.). **Advanced topics in Biomineralization**: InTech, 2012.

DHAMI, N. K.; REDDY, M. S.; MUKHERJEE, A. Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. **Frontiers Microbiology**, v. 4, n. 314, p. 1-13, 2013.

EHRlich, H. L.; NEWMAN, D. K.; KAPPLER, A. 6 ed. **Ehrlich's geomicrobiology**. CRC press, 2015.

FAGERIA, N.; STONE, L. F. Manejo da acidez dos solos de cerrado e de várzea do Brasil. **Embrapa Arroz e Feijão. Documentos**, 1999.

GOLLAPUDI, U. K.; KNUTSON, C. L.; BANG, S. S.; ISLAM, M. R. A new method for controlling leaching through permeable channels. **Chemosphere**, v. 30, n. 4, p. 695-705, 1995.

GAT, D.; TSESARSKY, M.; SHAMIR, D.; RONEN, Z. Accelerated microbial-induced CaCO₃ precipitation in a defined coculture of ureolytic and non-ureolytic bacteria. **Biogeosciences**, v. 11, n. 10, p. 2561-2569, 2014.

GAUTAM, S.; BUNDELA, P.; PANDEY, A.; KHAN, J.; AWASTHI, M.; SARSAIYA, S. Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. **Biotechnology research international**, p. 1-8, 2011.

GIBSON, T. An Investigation of the *Bacillus pasteurii* Group: III. Systematic Relationships of the Group. **Journal of Bacteriology**, v. 29, n. 5, p. 491-502, 1935.

GOMEZ, M. G.; MARTINEZ, B. C.; DEJONG, J. T.; HUNT, C. E.; DEVLAMING, L. A.; MAJOR, D. W.; DWORATZEK, S. M. Field-scale biocementation tests to improve sands. **Proceedings of the Institution of Civil Engineers - Ground Improvement**, v. 168, n. 3, p. 206-216, 2015.

HAMED KHODADADI, T.; KAVAZANJIAN, E.; VAN PAASSEN, L.; DEJONG, J. Bio-Grout Materials: A Review. In: **Grouting 2017**, 2017, p.1-12.

HAMZAH, A.; PHAN, C.-W.; ABU BAKAR, N. F.; WONG, K.-K. Biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortia and the constituent single bacteria isolated from Malaysia. **Bioremediation Journal**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2013.

HELMI, F. M.; ELMITWALLI, H. R.; ELNAGDY, S. M.; EL-HAGRASSY, A. F. Calcium carbonate precipitation induced by ureolytic bacteria *Bacillus licheniformis*. **Ecological Engineering**, v. 90, p. 367-371, 2016.

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

JAHNS, T. Ammonium/urea-dependent generation of a proton electrochemical potential and synthesis of ATP in *Bacillus pasteurii*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 2, p. 403-409, 1996.

KAWASAKI, K. H. A. Electro-Biogrouting and Its Challenges. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 1196-1204, 2012.

KIM, G.; KIM, J.; YOUN, H. Effect of Temperature, pH, and Reaction Duration on Microbially Induced Calcite Precipitation. **Applied Sciences**, v. 8, n. 8, p. 1277, 2018.

KRAJEWSKA, B. Ureasas I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1, p. 9-21, 2009.

KRAJEWSKA, B. Urease-aided calcium carbonate mineralization for engineering applications: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 59-67, 2018.

KUMAR, J. B. G.; PRABAKARA, R.; PUSHPA, H. Effect of bacterial calcite precipitation on compressive strength of mortar cubes. **International Journal of Engineering and Advanced Technology**, v. 2, n. 3, p. 486-491, 2013.

LAUCHNOR, E. G.; TOPP, D. M.; PARKER, A. E.; GERLACH, R. Whole cell kinetics of ureolysis by *Sporosarcina pasteurii*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 6, p. 1321-1332, 2015.

LI, M.; FU, Q.-L.; ZHANG, Q.; ACHAL, V.; KAWASAKI, S. Bio-grout based on microbially induced sand solidification by means of asparaginase activity. **Scientific Reports**, v. 5, n. 16128, p. 1-9, 2015.

MA, L.; PANG, A.-P.; LUO, Y.; LU, X.; LIN, F. Beneficial factors for biomineralization by ureolytic bacterium *Sporosarcina pasteurii*. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2020.

MOBLEY, H. L. T.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular Biology of Microbial Ureasas. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 3, p. 451-480, 1995.

MONTANHER, O. C.; ESPÍNDOLA, D. R. B. R. Fatores que controlam a temperatura de superfície dos solos do noroeste do paraná. **Caminhos de Geografia**, v. 18, n. 62, p. 59-72, 2017.

MOYO, C. C.; KISSEL, D. E.; CABRERA, M. L. Temperature effects on soil urease activity. **Soil biology and biochemistry**, v. 21, n. 7, p. 935-938, 1989.

MUJAH, D.; SHAHIN, M. A.; CHENG, L. State-of-the-Art Review of Biocementation by Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP) for Soil Stabilization. **Geomicrobiology Journal**, v. 34, n. 6, p. 524-537, 2016a.

MUJAH, D.; SHAHIN, M. A.; CHENG, L. Performance of biocemented sand under various environmental conditions. *In: XVIII BRAZILIAN CONFERENCE ON SOIL MECHANICS AND GEOTECHNICAL ENGINEERING. THE SUSTAINABLE FUTURE OF BRAZIL GOES THROUGH OUR MINAS*, 2016b, Belo Horizonte, MG. **Resumo**.

MUJAH, D.; CHENG, L.; SHAHIN, M. A. Microstructural and geomechanical study on biocemented sand for optimization of MICP process. **Journal of Materials in Civil Engineering**, v. 31, n. 4, p. 04019025, 2019.

NEMATI, M.; VOORDOUW, G. Modification of porous media permeability, using calcium carbonate produced enzymatically in situ. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 5, p. 635-642, 2003.

NEUPANE, D.; YASUHARA, H.; KINOSHITA, N.; UNNO, T. Applicability of Enzymatic Calcium Carbonate Precipitation as a Soil-Strengthening Technique. **Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering**, v. 139, n. 12, p. 2201-2211, 2013.

NUDELMAN, F.; SOMMERDIJK, N. A. J. M. Biomineralization as an Inspiration for Materials Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 27, p. 6582-6596, 2012.

OGATA, S.; KAWASAKI, S.; HIROYOSHI, N.; TSUNEKAWA, M.; KANEKO, K.; TERAJIMA, R. Temperature dependence of calcium carbonate precipitation for biogrout. **Rock Engineering in Difficult Ground Conditions-Soft Rocks and Karst**, p. 29-31, 2009.

O'LEARY, W. M. **Practical handbook of microbiology**: CRC press, 1989.

OKWADHA, G. D.; LI, J. Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. **Chemosphere**, v. 81, n. 9, p. 1143-1148, 2010.

OMOREGIE, A. I.; GINJOM, I.; NISSOM, P. Microbially Induced Carbonate Precipitation Via Ureolysis Process: A Mini-Review. **Transactions on Science and Technology**, v.5, n. 4, p. 245-256, 2018.

OMOREGIE, A. I.; KHOSHDELNEZAMIHA, G.; SENIAN, N.; ONG, D. E. L.; NISSOM, P. M. Experimental optimisation of various cultural conditions on urease activity for isolated *Sporosarcina pasteurii* strains and evaluation of their biocement potentials. **Ecological Engineering**, v. 109, p. 65-75, 2017.

OMOREGIE, A. I.; PALOMBO, E. A.; ONG, D. E.; NISSOM, P. M. Biocementation of sand by *Sporosarcina pasteurii* strain and technical-

grade cementation reagents through surface percolation treatment method. **Construction and Building Materials**, v. 228, p. 116828, 2019.

OTTERSTEDT, J. E.; BRANDRETH, D. A. **Small particles Technology**: Springer US, 1998, v. 1.

PEDREIRA, R. **Bio-cimentação de solos arenosos para melhoramento das suas características hidro-mecânicas**. Dissertação de Mestrado - Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.

PHILLIPS, A. J.; GERLACH, R.; LAUCHNOR, E.; MITCHELL, A. C.; CUNNINGHAM, A. B.; SPANGLER, L. Engineered applications of ureolytic biomineralization: a review. **Biofouling**, v. 29, n. 6, p. 715-733, 2013.

RAJASEKAR, A.; K.S. MOY, C.; WILKINSON, S. **MICP and Advances towards Eco-Friendly and Economical Applications**, v.78, p. 012016, 2017.

RAMACHANDRAN, S. K.; RAMAKRISHNAN, V.; BANG, S. S. Remediation of concrete using microorganisms. **ACI Materials Journal**, v. 98, n. 1, p. 3-9, 2001.

REBATA-LANDA, V. **Microbial activity in sediments: effects on soil behavior**. 2007. Tese de Doutorado - Georgia Institute of Technology, 2007.

REIS, L.; RODRIGUES, A.; SOARES, R.; ARAÚJO, R.; VIEIRA, J. **Bioprecipitação de carbonato de cálcio por bactérias ureolíticas e suas aplicações**, v.14, p. 860-881, 2017.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in biochemistry**, v. 59, p. 1-41, 2015.

SEIFAN, M.; SAMANI, A. K.; BERENJIAN, A. Bioconcrete: next generation of self-healing concrete. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2591-2602, 2016.

SEIFAN, M.; BERENJIAN, A. Application of microbially induced calcium carbonate precipitation in designing bio self-healing concrete. **World Journal of Microbiology and Biotechnol**, v. 34, n. 11, p. 168, 2018.

SETHI, S.; GUPTA, S. Optimization of cultural parameters for cellulase enzyme production from fungi. **BioLife**, v. 2, n. 3, p. 989-996, 2014.

SIERRA-BELTRAN, L.; JONKERS, H. M.; SCHLANGEN, E. **Characterization of sustainable bio-based mortar for concrete repair**, v. 67, 2014.

SMITH, A.; PRITCHARD, M.; EDMONDSON, A.; BASHIR, S. The reduction of the permeability of a lateritic soil through the application of microbially induced calcite precipitation. **Natural Resources**, v. 8, p. 337-352, 2017.

SOON, N. W.; LEE, L. M.; KHUN, T. C.; LING, H. S. Improvements in engineering properties of soils through microbial-induced calcite

precipitation. **KSCE Journal of Civil Engineering**, v. 17, n. 4, p. 718-728, 2013.

STOCKS-FISCHER, S.; GALINAT, J. K.; BANG, S. S. Microbiological precipitation of CaCO₃. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 11, p. 1563-1571, 1999.

SUN, X.; MIAO, L.; TONG, T.; WANG, C. Study of the effect of temperature on microbially induced carbonate precipitation. **Acta Geotechnica**, 2018.

VAN PASSEN, L. A. **Biogrout, ground improvement by microbial induced carbonate precipitation**. Tese de Doutorado - Delft University of Technology, Delft, Holanda 2009.

WHIFFIN, V. S. **Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement**. Tese de Doutorado - Murdoch University, Perth, Australia, 2004.

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

WILEY, W. R.; STOKES, J. L. Requirement of an alkaline pH and ammonia for substrate oxidation by bacillus pasteurii. **Journal of Bacteriology**, v. 84, p. 730-734, 1962.

ZHAO, Q.; LI, L.; LI, C.; ZHANG, H.; AMINI, F. A full contact flexible mold for preparing samples based on microbial-induced calcite precipitation technology. **Geotechnical Testing Journal**, v. 37, n. 5, p. 917-921, 2014a.

ZHAO, Q.; LI, L.; LI, C.; LI, M.; AMINI, F.; ZHANG, H. Factors Affecting Improvement of Engineering Properties of MICP-Treated Soil Catalyzed by Bacteria and Urease. **Journal of Materials in Civil Engineering**, v. 26, n. 12, p. 04014094, 2014b.

ZHAO, Y.; XIAO, Z.; LV, J.; SHEN, W.; XU, R. A Novel Approach to Enhance the Urease Activity of *Sporosarcina pasteurii* and its Application on Microbial-Induced Calcium Carbonate Precipitation for Sand. **Geomicrobiology Journal**, v. 36, n. 9, p. 819-825, 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE – A Parâmetros físico-químicos do solo usado nos ensaios de biocimentação

pH em água	Mg ²⁺ (cmol _c /dm ³)	Al ³⁺ (cmol _c /dm ³)	P (mg/dm ³)	Capacidade de troca catiônica efetiva (cmol _c /dm ³)	Capacidade de troca catiônica a pH 7,0 (cmol _c /dm ³)	Índice de saturação por alumínio (%)
5,14	0,02	1,07	0,7	1,40	2,23	76,4

APÊNDICE – B Densidade óptica a 600 nm (D.O._{600 nm}) média da cultura de *S. pasteurii* ATCC 11859 em função do tempo de incubação (h) em em diferentes concentrações de ureia

Tempo (h)	Densidade óptica média (D.O. _{600 nm}) 20 g L ⁻¹	Densidade óptica média (D.O. _{600 nm}) 40 g L ⁻¹	Densidade óptica média (D.O. _{600 nm}) 60 g L ⁻¹	Densidade óptica média (D.O. _{600 nm}) 80 g L ⁻¹
	0	0.057	0.051	0.050
6	0.270	0.765	0.590	0.119
12	1.487	1.280	0.887	0.501
16	2.117	1.550	0.940	0.603
24	2.920	1.770	0.840	0.571
30	3.540	2.077	0.927	0.589
36	3.933	1.977	0.743	0.599
40	3.760	2.040	0.790	0.585

APÊNDICE – C Densidade óptica a 600 nm (D.O._{600 nm}) média, atividade da urease (taxa de condutividade; mS cm⁻¹ min⁻¹) e atividade específica da urease (taxa de condutividade média/D.O._{600 nm}) da cultura de *S. pasteurii* ATCC 11859 em função do tempo de incubação (h) em pH 8,5 e 9,5

Tempo (h)	Densidade óptica média (D.O. _{600 nm})	Taxa de condutividade média (mS cm ⁻¹ min ⁻¹)	Atividade específica (Taxa de condutividade média/D.O. _{600 nm})	Densidade óptica média (D.O. _{600 nm})	Taxa de condutividade média (mS cm ⁻¹ min ⁻¹)	Atividade específica (Taxa de condutividade média/D.O. _{600 nm})
	pH 9,5			pH 8,5		
0	0.044	0.006	0.148	0.047	0.011	0.231
6	0.078	0.025	0.315	0.116	0.031	0.271
12	0.364	0.086	0.237	0.429	0.064	0.149
16	0.456	0.105	0.231	0.500	0.120	0.240
24	0.411	0.114	0.276	0.457	0.124	0.272
30	0.438	0.101	0.230	0.485	0.108	0.223
36	0.455	0.086	0.189	0.473	0.085	0.180
40	0.419	0.125	0.297	0.470	0.136	0.289

APÊNDICE – D Densidade óptica a 600 nm (D.O._{600 nm}) média, atividade da urease (taxa de condutividade; mS cm⁻¹ min⁻¹) e atividade específica da urease (taxa de condutividade média/ D.O.) da cultura de *S. pasteurii* ATCC 11859 em função do tempo de incubação (h) sob temperatura de 35 e 40 °C

Tempo (h)	Densidade óptica média (D.O. _{600 nm})	Taxa de condutividade média (mS cm ⁻¹ min ⁻¹)	Atividade específica (Taxa de condutividade média/D.O. _{600 nm})	Densidade óptica média (D.O. _{600 nm})	Taxa de condutividade média (mS cm ⁻¹ min ⁻¹)	Atividade específica (Taxa de condutividade média/D.O. _{600 nm})
	Temperatura 35 °C			Temperatura 40 °C		
0	0.042	0.005	0.124	0.040	0.006	0.157
6	0.054	0.017	0.320	0.028	0.034	1.214
12	0.212	0.050	0.236	0.021	0.048	2.262
16	0.171	0.086	0.507	0.017	0.062	3.722
24	0.148	0.078	0.522	0.040	0.006	0.157
30	0.132	0.060	0.457	0.028	0.034	1.214
36	0.128	0.063	0.493	0.021	0.048	2.262
40	0.119	0.079	0.662	0.017	0.062	3.722