



João Pedro Gonçalves Neves

# MELHORAMENTO DE SOLOS COM RECURSO A ENZIMAS. ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO TEOR EM MATÉRIA ORGÂNICA

IMPROVEMENT OF SOILS WITH ENZYMES. ANALYSIS OF THE EFFECT OF THE ORGANIC MATTER  
CONTENT.

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Civil na área de Especialização em Geotecnia,  
orientada pelo Professor Doutor Paulo José da Venda Oliveira

Coimbra Março de 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



**FCTUC** DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

João Pedro Gonçalves Neves

# **Melhoramento de solos com recurso a enzimas. Análise da influência do teor em matéria orgânica**

**Improvement of soils with enzymes. Analysis of the effect of the organic matter  
content.**

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Civil na área de Especialização em Geotecnia,  
orientada pelo Professor Doutor Paulo José da Venda Oliveira

Esta Dissertação é da exclusiva responsabilidade do seu autor.  
O Departamento de Engenharia Civil da FCTUC declina qualquer  
responsabilidade, legal ou outra, em relação a erros ou omissões  
que possa conter.

Coimbra Março de 2018

*“Troco tudo aquilo que sei por  
metade do que desconheço.”*

## **AGRADECIMENTOS**

Após a conclusão deste trabalho, que representa o fim desta etapa, deixo os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas com as quais tive o privilégio de aprender e evoluir.

Agradeço a todo o corpo docente do DEC e em particular aos docentes do perfil de Geotecnia pelo conhecimento que me transmitiram, tornando possível a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Paulo José da Venda Oliveira deixo um agradecimento especial pelo apoio prestado e pela disponibilidade demonstrada no decorrer do presente trabalho.

Deixo também os meus agradecimentos ao Sr. José António, técnico do laboratório de Geotecnia do DEC-FCTUC, pelo apoio prestado na realização das diversas tarefas inerentes ao trabalho realizado.

Gostaria de agradecer a todos os amigos e colegas que me acompanharam nesta caminhada pelo ensino superior, pois sem eles este caminho não teria sido o mesmo.

Por último, mas não menos importante deixo um agradecimento muito especial aos meus pais por sempre me apoiarem e possibilitarem esta oportunidade e ao meu irmão pelo apoio e pela motivação dada ao longo destes anos de estudo na Universidade de Coimbra.

## **RESUMO**

Neste trabalho pretende-se estudar qual a influência do teor em matéria orgânica no processo de estabilização de solos recorrendo a enzimas.

Para evitar o processo de cultivo de bactérias, o qual é moroso, complicado e dependente das condições ambientais (temperatura, pH, etc.), a metodologia em estudo promove a precipitação de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) por via enzimática, misturando o solo com ureia, cloreto de cálcio e *urease enzyme*.

A temática em estudo é relativamente recente e bastante promissora, pois representa uma alternativa com menor impacte ambiental quando comparada com as atuais técnicas de estabilização de solos.

O programa experimental será dividido em duas fases, a primeira terá como objetivo a caracterização dos materiais, e a calibração dos equipamentos de medição de  $\text{CaCO}_3$ , a segunda fase envolve a realização de ensaios de compressão simples (UCS) em provetes de solo.

A segunda fase de trabalhos, envolve a preparação de diversos provetes de solo para 9 teores em matéria orgânica, com e sem solução estabilizadora, permitindo desta forma a análise do efeito da bioestabilização.

De forma a quantificar o comportamento mecânico dos provetes de solo, serão realizados ensaios UCS, os quais serão complementados com medições do teor em humidade, pH, teor de  $\text{CaCO}_3$  precipitado, teor em matéria orgânica, ensaios DRX (X-Ray Diffraction) e SEM (Scanning Electron Microscopes).

Os resultados experimentais mostram que a introdução de solução estabilizadora nos provetes com maiores teores em matéria orgânica revela-se mais eficaz no que concerne à melhoria das propriedades mecânicas, contribuindo para o aumento de resistência e de rigidez.

## **ABSTRACT**

This work aims to study the effect of the organic matter content on the processes of soil stabilization with enzymes.

To avoid the bacteria culture process, which is slow, complicated and dependent on environmental conditions (temperature, pH, etc.), the precipitation of calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) is promoted using enzymes, mixing the soil with urea, calcium chloride and *urease* enzyme.

This subject is relatively recent and quite promising because it represents an alternative with a low environmental impact when compared with other usual techniques of soil stabilization.

The experimental analysis will be divided into two phases, the first one will be about the characterization of the materials, and about the calibration of  $\text{CaCO}_3$  measuring equipment. The second phase involve UCS tests (Unconfined Compression Strength).

The second phase of work, requires the preparation of soil samples with 8 different organic matter contents, with and without stabilizing solution, in order to analyze the effect of the biostabilization process.

To quantify the mechanical behavior of soil samples, UCS tests will be performed, which will be complemented with measurements of the moisture content, pH,  $\text{CaCO}_3$  precipitation content, organic matter content and DRX (X-Ray Diffraction) and SEM tests (Scanning Electron Microscopes).

In general, the introduction of the stabilization solution for a high organic matter content has a positive impact on the process, namely in terms of mechanical properties, inducing the increase of the strength and stiffness.

---

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	i
RESUMO .....	ii
ABSTRACT .....	iii
ÍNDICE.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
ÍNDICE DE QUADROS .....	viii
SIMBOLOGÍA .....	ix
ABREVIATURAS .....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Enquadramento Geral .....	1
1.2 Estrutura da dissertação .....	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Biotecnologia.....	3
2.2 Biotecnologia aplicada à Engenharia Civil .....	3
2.3 Biomineralização .....	4
2.4 Bioestabilização.....	5
2.5 Precipitação de CaCO <sub>3</sub> .....	5
2.5.1 Precipitação de CaCO <sub>3</sub> por via bacteriana (MICP).....	6
2.5.2 Precipitação de CaCO <sub>3</sub> por via enzimática (EMCP).....	6
3 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO .....	10
3.1 Introdução.....	10
3.2 Composição granulométrica .....	10
3.2.1 Solo Argiloso .....	10
3.2.1 Solo Orgânico de Base .....	11
3.3 Densidade das partículas do solo.....	12
3.4 Limites de Consistência.....	13
3.4.1 Limite de liquidez.....	13
3.4.2 Limite de plasticidade.....	13
3.6 Teor em matéria orgânica.....	14
3.7 Produtos envolvidos na precipitação de CaCO <sub>3</sub> .....	14
3.7.1 Água .....	14
3.7.2 Ureia .....	14
3.7.3 Cloreto de Cálcio.....	14
3.7.4 Enzima <i>Urease</i> .....	14

---

3.7.5 Solução Tampão de fosfato de sódio .....	15
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	16
4.1 Introdução .....	16
4.2 Preparação dos provetes de solo .....	16
4.2.1 Equipamento .....	16
4.2.2 Preparação da solução estabilizadora .....	16
4.2.3 Montagem dos provetes de solo .....	17
4.3 Ensaio de Compressão Simples (UCS).....	18
4.3.1 – Preparação dos provetes .....	18
4.3.2 – Tratamento de resultados .....	19
4.4 – Medição de CaCO <sub>3</sub> .....	20
4.4.1 – Calibração .....	20
4.4.2 Medição do CaCO <sub>3</sub> nos provetes após ensaio UCS .....	22
4.5 Medição do Teor em água dos provetes após ensaio UCS .....	23
4.6 Medição do Teor de Matéria Orgânica dos provetes após ensaio UCS .....	23
4.7 Ensaio XRD .....	23
4.8 Ensaio SEM (Scanning Electron Microscops).....	23
4.9 Plano de ensaios .....	24
4.10 Precisão das medições .....	25
5 APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DE RESULTADOS .....	26
5.1 Introdução .....	26
5.2 Comportamento tensão-deformação .....	26
5.3 Variação de $q_{u\text{ máx}}$ com OM .....	31
5.4 Variação de $E_{u50}$ com OM.....	32
5.5 Variação do teor de CaCO <sub>3</sub> em função de OM .....	33
5.6 Ensaio XRD (Raios X).....	35
5.7 Variação do valor de pH com o teor de OM.....	36
5.8 Variação do Teor de humidade com diferentes teores de OM .....	38
5.9 Superfície de rotura dos diferentes provetes ensaiados .....	38
5.10 Ensaio SEM .....	39
6 CONCLUSÕES E DESENVOLVIMENTOS FUTUROS .....	42
6.1 Conclusões.....	42
6.2 Desenvolvimentos Futuros .....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
OUTRAS REFERÊNCIAS DE UTILIDADE .....	47
ANEXO A .....	A-1
ANEXO B .....	B-1
ANEXO C .....	C-1

---



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Esquema do processo de precipitação do carbonato de cálcio por via enzimática (Yashuara et al., 2012).....	7
Figura 2.2 – Areia estabilizada com 55 kg CaCO <sub>3</sub> /m <sup>3</sup> de solo. a) Precipitação de CaCO <sub>3</sub> num grão de areia. b) aglomerado de cristais de CaCO <sub>3</sub> . (Adaptado de van Passen et al., 2010).....	8
Figura 2.3 – Ensaios UCS; curvas tensão-extensão: (a) Solo arenoso; (b) Solo areno-siltoso; (c) Solo areo-siltoso; (d) Silte inorgânico; (e) Silte orgânico (Adaptado de Venda Oliveira et al., 2016).....	9
Figura 3.1 – Curva granulométrica para o solo argiloso .....	11
Figura 3.2 – Curva granulométrica da matéria orgânica .....	12
Figura 3.3 – Curva representativa da relação entre o teor de humidade e o nº de pancadas executadas em cada provete .....	13
Figura 4.1 – Esquema ilustrativo do procedimento utilizado na preparação dos provetes .....	18
Figura 4.2 – Correção dos “bedding errors”.....	20
Figura 4.3 – Calibração do sistema de medição de CO <sub>2</sub> (CVE) .....	22
Figura 5.1 – Gráfico tensão-extensão (qu-εax) dos ensaios UCS realizado para as diferentes %OM iniciais, nomeadamente: a) 0% OM; b) 1.6% OM; c) 3% OM; d) 4.5% OM; e) 6% OM; f) 8.9% OM; g) 10.3% OM; h) 11.3% OM .....	27-31
Figura 5.2 – Variação da tensão máxima de rotura com o aumento da %OM no solo .....	32
Figura 5.3 – Variação do Eu50 com o teor de OM nos provetes .....	33
Figura 5.4 – Variação do teor de CaCO <sub>3</sub> em função de OM.....	33
Figura 5.5 – Variação da tensão máxima de rotura em função do teor CaCO <sub>3</sub> .....	34
Figura 5.6 – Variação de Eu50 com o teor de CaCO <sub>3</sub> .....	35
Figura 5.7 – Ensaios XRD para os provetes E-8.9(1), E-10.3(1) e E-10.3(3).....	36
Figura 5.8 – Variação do valor de pH com OM .....	37
Figura 5.9 – Variação de qu em função do pH.....	37
Figura 5.10 – Variação do teor em água com OM .....	38
Figura 5.11 – Superfícies de rotura para diferentes teores de OM dos provetes bioestabilizados e não estabilizados .....	39

Figura 5.12 – Imagem SEM provete com 10.31% de OM (em cima), Mapa de dispersão de CaCO<sub>3</sub> no ponto analisado (em baixo à esquerda), Perfil químico da amostra de solo (em baixo à direita) .....41

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 4.1 – Características dos provetes testados sem solução estabilizadora.....	24
Quadro 4.2 – Características dos provetes testados com solução estabilizadora. ....	24
Quadro 4.3 – Precisão da instrumentação utilizada.....	25
Quadro 5.1 – Resultados preliminares do ensaio XRD.....	35
Quadro 5.2 – %CaCO <sub>3</sub> quantificados pelo ensaio SEM .....	40

## **SIMBOLOGÍA**

**CaCO<sub>3</sub>** – Carbonato de Cálcio

**Ca<sup>2+</sup>** - Ião Cálcio

**CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>** - Ureia

**CaCl<sub>2</sub>** – Cloreto de Cálcio

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono

**CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>** - Ião Carbonato

**H<sub>2</sub>O** - Água

**NH<sub>3</sub>** – Amoníaco

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>** - Ião Amónio

## **ABREVIATURAS**

**EMCP** – Enzyme Mediated Calcite Precipitation

**MBC** – Mineralização Biologicamente Controlada

**MBI** – Mineralização Biologicamente Induzida

**MICP** – Microbially Induced Calcite Precipitation

**OM** – Matéria Orgânica (Organic Matter)

**pH** – Potencial de Hidrogénio

**SEM** – Scanning Electron Microscopes

**UCS** – Unconfined Compression Strenght

**UNESCO** – Organização da Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura

**XRD** – X-Ray Diffraction

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Enquadramento Geral

O desenvolvimento social e económico está proporcionalmente associado ao crescimento das metrópoles urbanas, o qual é frequentemente condicionado pela disponibilidade de capital e pelas condições locais, nomeadamente a topografia e as propriedades mecânicas dos solos de fundação. De forma a contornar este último constrangimento, têm sido desenvolvidos novos métodos de melhoramento de solos, para viabilizar, tanto do ponto de vista técnico como económico, a construção de infraestruturas nos locais mais problemáticos em termos da engenharia geotécnica. No seguimento da evolução tecnológica, recentemente têm sido investigadas algumas técnicas emergentes, que recorrem a soluções no âmbito da biotecnologia para melhorar as características dos solos naturais.

Existem duas categorias de técnicas que visam melhorar o comportamento dos solos às solicitações introduzidas. A primeira, consiste no reforço, onde são introduzidos elementos resistentes que desempenham um efeito estrutural, aumentando a resistência dos maciços, tais como ancoragens, pregagens e estacas. A segunda categoria, diz respeito a técnicas de melhoramento, que visam a melhoria de pelo menos uma das propriedades do maciço, as quais podem ter um carácter permanente ou provisório, e natureza física, química ou mecânica; como exemplos temos a introdução de drenos verticais, compactação, “jet-grouting” ou “deep mixing” (Cardoso, 1987; Correia, 2011).

Devido às alterações climáticas, com repercussões no aumento da temperatura global do planeta, na subida do nível médio da água do mar e na intensificação de fenómenos meteorológicos extremos, recorre-se cada vez mais a métodos construtivos com reduzido impacto ambiental. Na constante procura de metodologias que minimizem os impactos no ambiente envolvente, surge a biotecnologia. Por definição, biotecnologia são todos os processos biológicos que recorrem a organismos vivos ou derivados, para a produção de bens ou serviços que melhorem a qualidade de vida (UNESCO, 2018). A biotecnologia já é usado desde os tempos das culturas da Mesopotâmia, Egipto e Índia, onde era utilizada na agricultura e produção de cerveja. (Biotecnologia, 2018)

Considerando a aplicabilidade da biotecnologia na Geotecnia, nos últimos anos têm sido realizados alguns estudos, que se debruçaram sobre a possibilidade de estabilização de solos através da indução da precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , pela introdução de bactérias, e mais tarde recorrendo à utilização de enzimas. O presente trabalho surge no seguimento desta última técnica, com o objetivo de estudar a influência do teor em matéria orgânica na precipitação de  $\text{CaCO}_3$ .

## **1.2 Estrutura da dissertação**

Este trabalho é composto por seis capítulos incluindo o presente capítulo, que tem como finalidade enquadrar o leitor no trabalho desenvolvido.

No capítulo 2 é enquadrado o tema nas suas diferentes componentes, nomeadamente sobre a origem da bioestabilização e sobre alguns métodos de estabilização por via biológica.

No capítulo 3 são caracterizados e descritos, o solo argiloso e o solo orgânico de base, bem como, os produtos envolvidos na preparação da solução estabilizadora. Os solos são caracterizados por intermédio da análise granulométrica, densidade das partículas do solo, limites de consistência e teor em matéria orgânica.

No capítulo 4 é apresentado o procedimento experimental, bem como o equipamento e o material usado na preparação dos provetes de solo e na execução dos ensaios UCS.

No capítulo 5 serão apresentados e analisados os resultados obtidos nos ensaios UCS e complementares.

No capítulo 6 e último, são apresentadas as principais conclusões, bem como sugestões de alguns trabalhos a desenvolver futuramente.

## **2 Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Biotecnologia**

A biotecnologia caracteriza-se pelo uso de plantas, animais, microrganismos e processos biológicos, para alcançar avanços nas áreas da indústria, medicina, engenharia e agricultura. Segundo a definição da UNESCO, corresponde à utilização de organismos vivos para o desenvolvimento e benefício da humanidade.

A biotecnologia é utilizada desde a época das culturas da Mesopotâmia, Egito e Índia até aos dias de hoje. Inicialmente começou por ser utilizada na produção de alimentos e na agricultura, com a finalidade de obter melhores colheitas, para isto selecionavam as melhores espécies de plantas e sementes. Com os avanços tecnológicos, esta ciência tem expandido a sua aplicabilidade na construção, produção de biocombustíveis, indústria farmacêutica, etc. (El Correo, 1987).

Um exemplo muito conhecido, é a produção de antibióticos, em que Fleming foi pioneiro com a descoberta da penicilina em 1928. Outro exemplo, da aplicabilidade da biotecnologia, consiste na produção de acetona por fermentação bacteriana, processo desenvolvido por Weizman, em 1917 (Jones, D.T. and Woods, D.R, 1986).

### **2.2 Biotecnologia aplicada à Engenharia Civil**

A biotecnologia é uma excelente aliada da Engenharia Civil, reduzindo o impacto que esta tem no ambiente, promovendo por exemplo a eficiência energética dos edifícios ou contribuindo para a redução da extração de matérias-primas (Torgal et al., 2015).

Existem duas grandes áreas de aplicação da biotecnologia no sector da construção. A primeira prevê o uso de microrganismos para a obtenção de materiais de construção. A segunda visa o uso de microrganismos em processos construtivos. Algumas das aplicações da biotecnologia, atualmente, na área da engenharia civil são (Torgal et al., 2015):

- Desenvolvimento de biocimentos, recorrendo a menos gastos energéticos, pois a sua produção requer temperaturas entre 20-60°C, contrariamente aos 950°C necessários para produzir o cimento comum;
- Tratamento de águas residuais recorrendo a plantas;
- Melhoramento das propriedades dos solos recorrendo a bactérias ou enzimas, para promover a resistência relativamente a processos erosivos, diminuir o potencial de liquefação devido a terramotos e estabilização de áreas contaminadas.

Existem oito tipos de processos biológicos relacionados com o melhoramento de solos (Torgal et al., 2015):

1. Bioagregação, promove o aumento do tamanho das partículas finas, reduzindo a erodabilidade do solo e a emissão de poeiras.
2. “Biocrusting”, permite a formação de uma camada superficial de solo, mineral ou orgânico, reduzindo a erosão, a emissão de poeiras e a infiltração da água.
3. “Biocoating”, é um processo semelhante ao “biocrusting” em que é formada uma camada na superfície sólida para que a colonização da superfície seja possível.
4. “Bioclogging”, refere-se ao preenchimento da matriz porosa do solo de forma a diminuir a permeabilidade do solo;
5. Biocimentação das partículas sólidas, permite um aumento significativo da resistência do solo;
6. “Biodesaturation” do solo, permite a redução do teor de água do solo através da produção de biogás in situ;
7. Bioencapsulamento das partículas sólidas, é um processo que aumenta a resistência de argilas moles através da formação de um revestimento das partículas de argila;
8. “Bioremediation”, permite a remoção de poluentes presentes em solos contaminados.

### **2.3 Biomineralização**

O termo biomineralização, descreve os processos pelos quais os organismos são capazes de produzir minerais (Bazylinski et al., 2003).

A principal função das bactérias nos processos de biomineralização é criar um ambiente alcalino (Fitolito, 2018), sendo condicionada pelas condições ambientais que favorecem a precipitação dos minerais.

Um processo bastante vulgar é o da precipitação de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Neste processo as bactérias metabolizam a ureia após a qual são formados cristais de carbonato de



cálcio ao redor das células, interligando-se aos grãos de solo, aumentando a resistência ao corte Costa (2012).

Os biominerais podem ser gerados por duas vias distintas: mineralização biologicamente controlada (MBC) em que o organismo controla o crescimento, a morfologia e a localização final do mineral. A segunda via é a mineralização biologicamente induzida (MBI) em que os organismos segregam alguns produtos metabólicos, que reagem com o meio envolvente e com a consequente deposição de partículas minerais.

## 2.4 Bioestabilização

O processo de bioestabilização visa promover a melhoria das propriedades geotécnicas dos solos mediante a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  por via biológica. Alguns dos processos que conduzem à precipitação de  $\text{CaCO}_3$  são a fotossíntese, a degradação de ureia, redução de sulfato, entre outros (Costa, 2012). A forma mais comum de MICP (Microbially Induced Calcite Precipitation) em ambientes aquáticos, é causada por organismos capazes de realizar a fotossíntese (McConnaughey e Whelan, 1997).

A formação de  $\text{CaCO}_3$  ocorre segundo as equações (2.1), (2.2), e (2.3). Na equação (2.1) a ureia ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ), reage com a água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) formando dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), sendo esta reação catalisada pela enzima *urease*. A equação (2.2), ocorre em meio aquoso gerando o ião amónio ( $\text{NH}_4^+$ ) e o ião carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). Os produtos de reação obtidos na equação (2.2) quando introduzidos num meio rico em cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) produzem de forma espontânea  $\text{CaCO}_3$  (equação 2.3).



## 2.5 Precipitação de $\text{CaCO}_3$

O processo de bioestabilização apenas é possível devido à presença da enzima *urease*, que pode ser produzida por bactérias ou introduzida diretamente no solo (Neupane et al., 2013).

A utilização direta da enzima *urease* é um processo mais prático, pois a produção de enzimas recorrendo ao emprego de bactérias é mais demorado e requer condições específicas do solo

para que estas possam sobreviver, de modo a promover a bioestabilização com eficácia (Yashuara et al., 2012).

#### **2.5.1 Precipitação de $\text{CaCO}_3$ por via bacteriana (MICP)**

Como referido anteriormente, a enzima *urease* tem um papel crucial no processo de bioestabilização, existindo na natureza em vários tipos de plantas, leveduras e diversas bactérias (Neupane et al., 2013).

Para que as bactérias tenham o máximo rendimento, relativamente à produção da enzima *urease*, terão que ser satisfeitas algumas condições, nomeadamente quanto à temperatura, pH, tempo de incubação e meio nutriente apropriados. Apesar da resistência dos solos estabilizados com recurso a esta técnica aumentarem a sua resistência mecânica e diminuírem a sua permeabilidade, a MICP (Microbially Induced Calcite Precipitation) pode apresentar alguns problemas, devido à incerteza quanto à sobrevivência ou extinção das bactérias no ambiente natural (Yashuara et al., 2012).

A MICP promove a formação de ligações de  $\text{CaCO}_3$  entre as partículas do solo, originando o aumento de resistência e de rigidez (Costa, 2012; Van Passen et al., 2010), redução de permeabilidade e diminuição do índice de vazios do solo (Yashuara et al., 2012).

#### **2.5.2 Precipitação de $\text{CaCO}_3$ por via enzimática (EMCP)**

O processo de precipitação de  $\text{CaCO}_3$  através da utilização direta das enzimas é mais simples, dado não ser necessário garantir condições específicas para o cultivo de bactérias (Yashuara et al., 2013). Este processo resume-se à adição da enzima *urease* a uma solução de ureia e cloreto de cálcio, tal como ilustrado na Figura 2.1.

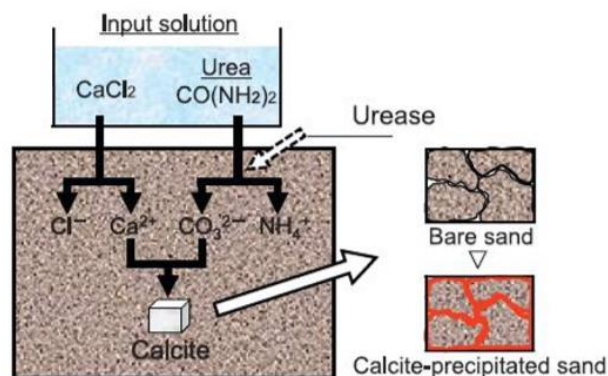


Figura 2.1 – Esquema do processo de precipitação do carbonato de cálcio por via enzimática (Yashuara et al., 2012)

A enzima *urease* pode ser encontrada em bactérias e em algumas plantas, como é o caso do feijão de porco (*Canavalia ensiformis*), a qual é usada na presente investigação como agente catalisador da hidrólise da ureia.

A quantidade de  $\text{CaCO}_3$  precipitada depende da concentração da enzima *urease*, ureia e cloreto de cálcio, bem como da temperatura (Yashuara et al., 2012). Um aumento da temperatura (de  $20^\circ$  para  $50^\circ\text{C}$ ), induz um aumento tanto da produção de  $\text{CaCO}_3$ , como da velocidade da reação de precipitação (Nemati et. al 2003). Esta técnica reduz a permeabilidade do solo, podendo ser aplicada na consolidação de areias em reservatórios e na solidificação de solos contaminados com alto teor de isótopos radioativos (Neupane et al., 2013).

Neupane et al., (2013) estudaram o efeito de escala no processo de precipitação de  $\text{CaCO}_3$  por via enzimática, tendo concluído que a quantidade de carbonato de cálcio precipitado é suficiente para modificar o comportamento mecânico de solos arenosos, viabilizando a aplicação desta técnica em campo, não obstante a distribuição do  $\text{CaCO}_3$  precipitado ter sido heterogênea. Yashuara et al. (2012) realizaram ensaios UCS (ensaios de compressão não confinados) e de permeabilidade tendo observado o aumento da resistência à compressão de solos arenosos de 400 kPa para 1,6 MPa devido à bioestabilização, tendo concluído que esta técnica é apropriada para o reforço de solos.

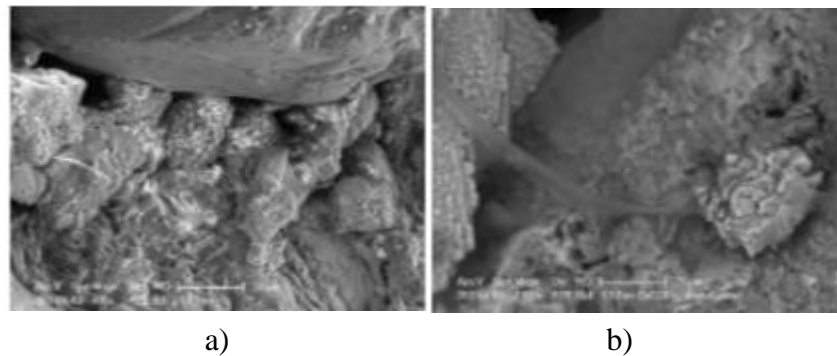


Figura 2.2 – Areia estabilizada com 55 kg CaCO<sub>3</sub>/m<sup>3</sup> de solo. a) Precipitação de CaCO<sub>3</sub> num grão de areia. b) aglomerado de cristais de CaCO<sub>3</sub> (Adaptado de Van Passen et al., 2010).

No departamento de Engenharia Civil da Universidade de Coimbra, têm sido realizados diversos trabalhos na área da bioestabilização, contemplando a precipitação de CaCO<sub>3</sub> tanto por via enzimática (Freitas, 2016; Carmona 2016; Carmona et al., 2018; Venda Oliveira et al., 2015, 2016) como bacteriana (Costa, 2012; Venda Oliveira et al., 2015). A análise da influencia do tipo de solo no processo de precipitação de CaCO<sub>3</sub> por via enzimática permitiu concluir que o processo de precipitação de CaCO<sub>3</sub> é potencializado em solos arenosos e siltosos com ganhos de resistência de 40% e 106%, Figura 2.3, (Freitas, 2016; Venda Oliveira et al., 2016). Concluíram também que o pH diminuía em todos os solos após a bioestabilização como consequência da libertação de cloreto de amónio (NH<sub>4</sub>Cl). Carmona (2016) concluiu que o aumento do tempo de cura e da concentração de enzima *urease* potencia a precipitação de carbonato de cálcio, com maior relevância nos primeiros sete dias de cura, obtendo-se após esse período a atenuação da quantidade de CaCO<sub>3</sub> precipitado. Costa (2012) e Venda Oliveira et al., (2015) compararam a eficácia das bactérias *Sporosaarcina pasteurii* e a *Idiomarina insulisalsae* para promover a bioestabilização de um solo arenoso, tendo concluído uma maior eficiência por parte da *Idiomarina insulisalsae*.

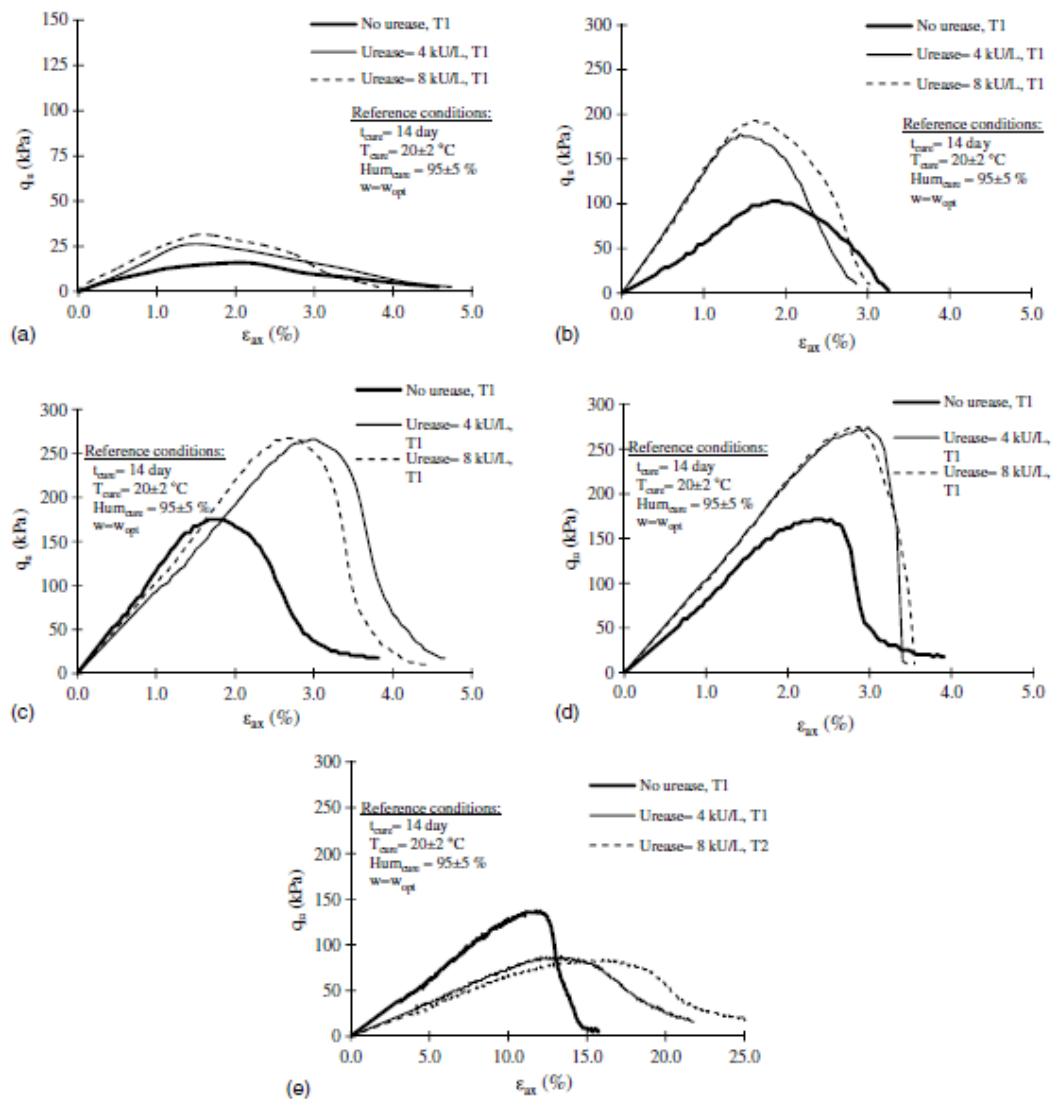


Figura 2.3 – Ensaio UCS; curvas tensão-extensão: (a) Solo arenoso; (b) Solo areno-siltoso; (c) Solo areno-siltoso; (d) Silte inorgânico; (e) Silte orgânico (Adaptado de Venda Oliveira et al., 2016)

## **3 Caracterização do solo**

### **3.1 Introdução**

O presente trabalho visa analisar a influência do teor de matéria orgânica do solo no processo de precipitação de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) por via enzimática.

De forma a caracterizar o solo argiloso e o solo orgânico de base, usados no presente trabalho, são quantificados o teor de humidade, a percentagem de matéria orgânica e a distribuição granulometria dos dois solos. Complementarmente, para o solo argiloso determinam-se os limites de plasticidade e de liquidez, tal como a densidade das partículas sólidas.

### **3.2 Composição granulométrica**

Para quantificar a distribuição granulométrica dos solos argiloso e orgânico de base, foram executados os procedimentos referidos na especificação E 196 – 1966 do LNEC.

#### **3.2.1 Solo Argiloso**

Como o solo argiloso é fino, na realização da peneiração grossa não ficou retido nenhum material, concluindo que o solo é constituído por partículas de dimensão inferior a 2mm. Na peneiração fina, verificou-se que ainda havia uma grande quantidade de solo que passava no peneiro 200, com malha 0.075mm (Quadro A.1). Assim, procedeu-se ao processo de sedimentação para determinar a distribuição de partículas com dimensão inferior a 0.075mm (Quadro A.2). As percentagens ponderadas das partículas do solo de acordo com as suas dimensões são apresentadas na Figura 3.1.

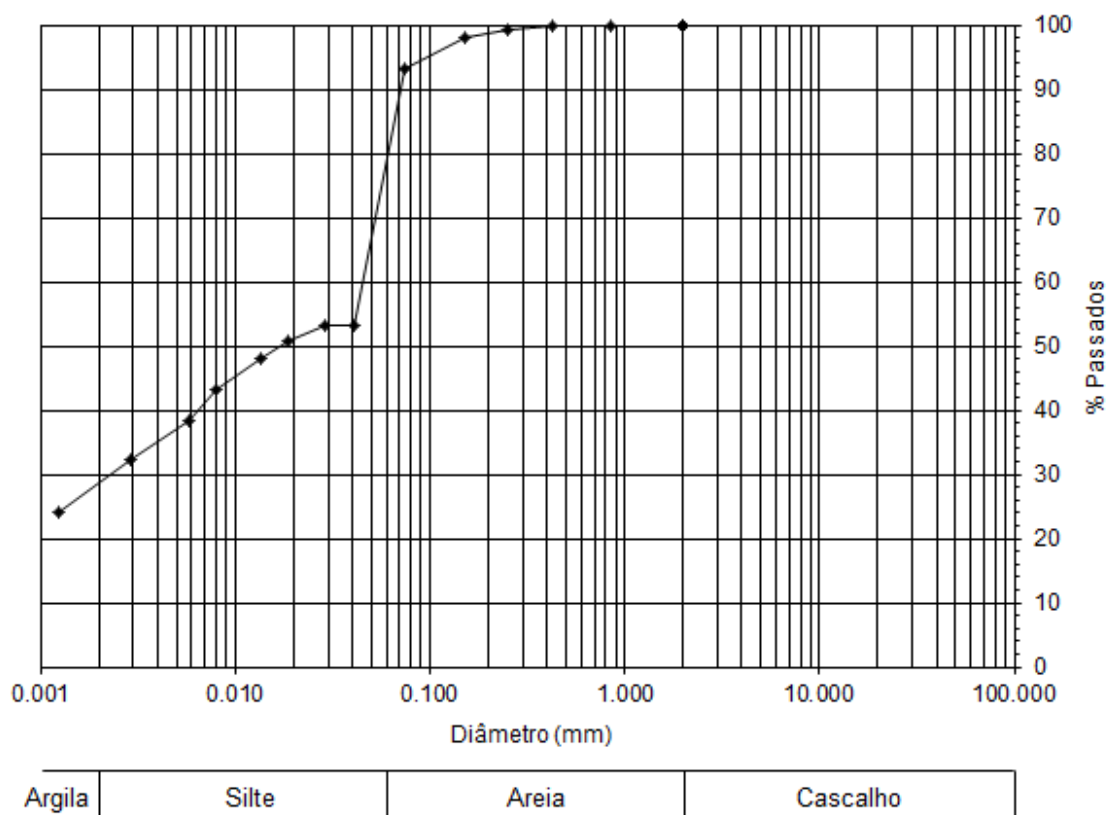


Figura 3.1 – Curva granulométrica para o solo argiloso

### 3.2.1 Solo Orgânico de Base

Na peneiração grossa (Quadro A.3) apenas se verificou retenção de matéria no peneiro nº10, procedendo-se de seguida à peneiração fina (Quadro A.4), onde se verificou a maior retenção de matéria. Após a peneiração fina verificou-se uma percentagem de matéria que passa no peneiro 200. Contudo não foi executado o processo de sedimentação, pois as partículas do solo orgânico de base sujeitas a este processo não sedimentam e flutuam na solução. Na Figura 3.2 apresenta-se a curva granulométrica do solo orgânico.

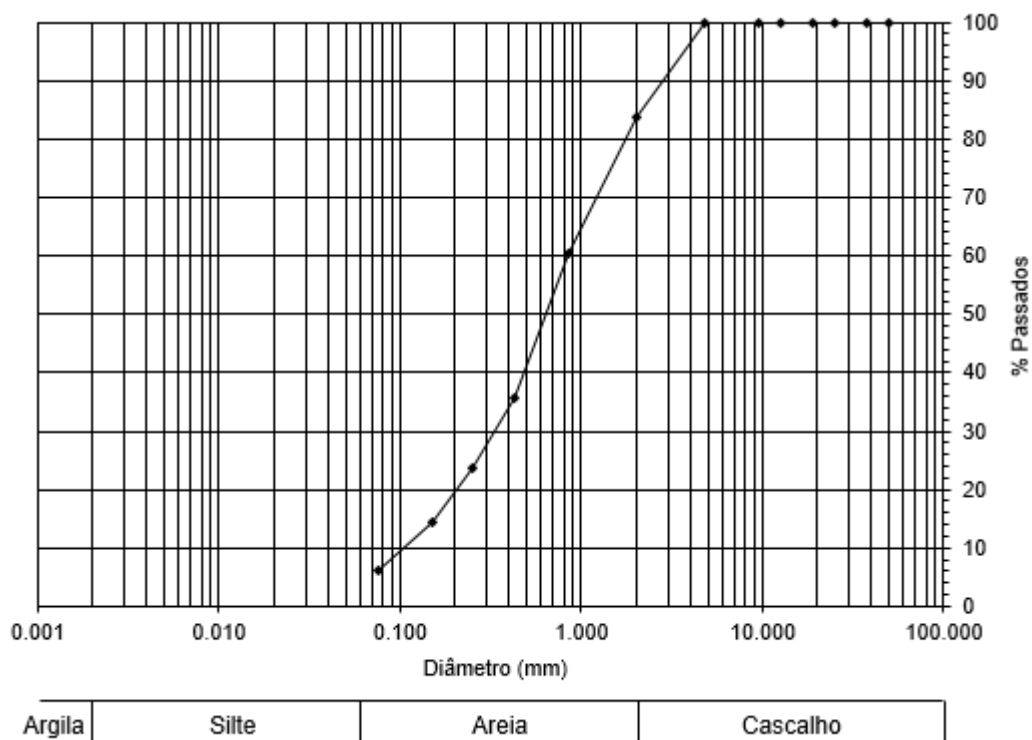


Figura 3.2 – Curva granulométrica do solo orgânico de base

### 3.3 Densidade das partículas do solo

Densidade das partículas (G) de um solo é designada pelo quociente da massa dum dado volume dessas partículas à temperatura do ensaio, pela massa de igual volume de água destilada a 20°C, sendo determinada conforme a norma NP-83 (1965).

No Quadro A.5, apresentado em anexo, estão apresentados os resultados obtidos, tendo-se desprezado os resultados obtidos no picnómetro 95 por apresentar uma diferença considerável, quando comparado com os resultados dos picnómetros 85 e 96. Assim a densidade média das partículas do solo é obtida apenas considerando os picnómetros 85 e 96, obtendo-se o valor de 2,75. Este valor está de acordo com a gama de valores 2.6-2.8 mencionados por Matos Fernandes (2012), Venda Oliveira (1992) e Lambe e Whitman (1969).



### 3.4 Limites de Consistência

Os limites de consistência são determinados segundo a norma NP-143 (1969), caracterizando o comportamento da fração fina. Neste trabalho são determinados o limite de liquidez ( $w_L$ ) e o limite de plasticidade ( $w_P$ ).

#### 3.4.1 Limite de liquidez

O limite de liquidez de uma amostra de solo é obtido na Concha de Casagrande, sendo o teor em água correspondente a 25 pancadas, para o qual os bordos inferiores de um sulco aberto num provete se unem numa extensão de 1cm. Em termos práticos, este limite é obtido por interpolação de uma curva, que relaciona o teor em água com o número de pancadas (Quadro A.6 e Figura 3.3) tendo-se obtido o valor de 52.5%.

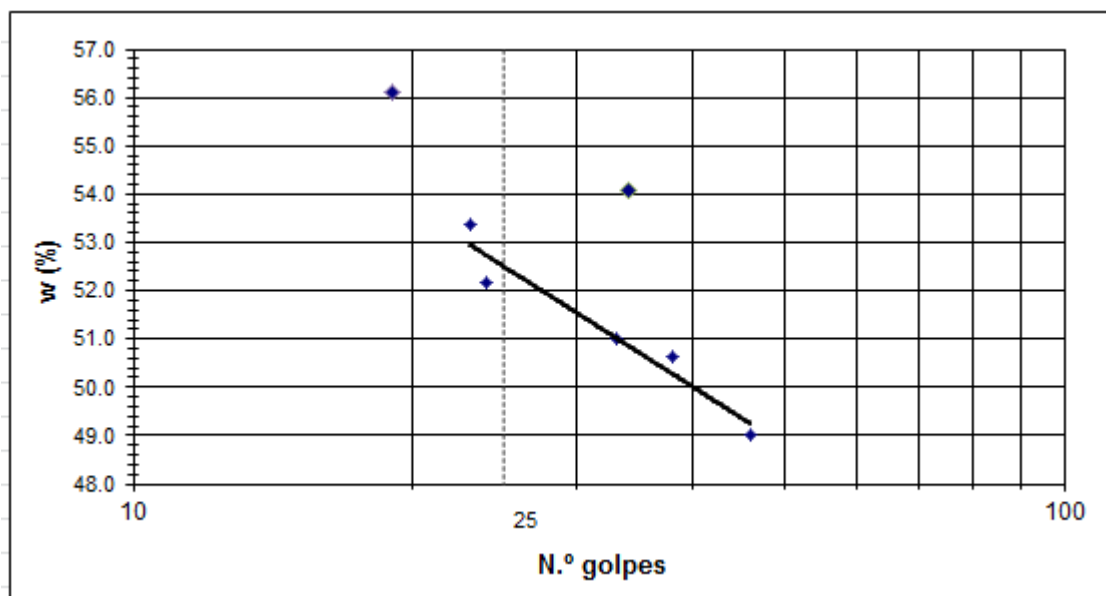


Figura 3.3 – Curva representativa da relação entre o teor de humidade e o n° de pancadas executadas em cada provete

#### 3.4.2 Limite de plasticidade

O limite de plasticidade corresponde ao teor em água que estabelece o limite entre o comportamento friável e plástico, sendo avaliado pelo teor em água que corresponde à quebra de um filamento de solo com 3 mm, após rolamento entre a palma da mão e uma placa de vidro. Em termos práticos, corresponde à média dos teores em água de 4 provetes. No Quadro A.7, apresentado em anexo, são apresentados os resultados obtidos tendo-se determinado o valor para o limite de plasticidade de 22,3%.

### **3.6 Teor em matéria orgânica**

Para a quantificação desta característica dos dois solos foram executados os procedimentos descritos na norma BS 1377-3 (1990), em que o teor de matéria orgânica é obtido através da seguinte expressão (3.1):

$$OM = [(P_S^{50^\circ C} - P_S^{400^\circ C}) / (P_S^{50^\circ C} - P_{cápsula})] \times 100 \quad (3.1)$$

Os teores em matéria orgânica obtidos para os solos argiloso e orgânico de base são 1.6% e 37.7%, respetivamente. Os teores podem ser consultados nos Quadros A.8 e A.9, apresentados em anexo.

### **3.7 Produtos envolvidos na precipitação de CaCO<sub>3</sub>**

Na precipitação de CaCO<sub>3</sub> foi preparada uma solução contendo ureia, cloreto de cálcio, água destilada, enzima *urease* e solução tampão de fosfato de sódio. Estes produtos quando misturados com o solo promovem o processo de bioestabilização, com o objetivo de alterar o comportamento mecânico do mesmo.

#### **3.7.1 Água**

Nas atividades laboratoriais realizadas neste trabalho, foi utilizada água destilada, obtida por um sistema de destilação do DEC a partir da água da rede pública, com pH próximo de 7.

#### **3.7.2 Ureia**

Na precipitação de carbonato de cálcio, a ureia (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O) é a fonte do ião carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). Para a realização deste trabalho, a ureia foi proveniente da *Acros Organics*, usada na forma de cristais, com uma pureza de 99,5% e massa molar de 60.06 g/mol.

#### **3.7.3 Cloreto de Cálcio**

O cloreto de cálcio (CaCl) é um sal que fornece à solução estabilizadora cálcio. Este produto é proveniente da *Applichem Panreac*, tem uma pureza de 95% e tem uma massa molar de 110.99 g/mol.

#### **3.7.4 Enzima Urease**

A enzima usada neste trabalho tem origem na *Canavalia Ensiformis*, é comercializada pela companhia *Sigma-Aldrich*. De acordo com o fornecedor da enzima, o valor ótimo do pH é 7,0

e a temperatura ótima de 25°C. A enzima deve ser armazenada num frigorífico com temperaturas entre 2-8°C.

O lote utilizado, no estudo da precipitação no solo tinha uma atividade de 34.31kU por grama, em estado sólido. A enzima utilizada por cada 1 U liberta 1,0 µmol de NH<sub>3</sub> da ureia por minuto a 25°C com pH de 7.

#### **3.7.5 Solução Tampão de fosfato de sódio**

A solução tampão de fosfato de sódio 0,2 M, é usada para a preparação da solução estabilizadora, permitindo manter o pH dentro de um intervalo ideal próximo de 7. Desta forma garante-se a atuação da enzima mesmo quando o pH for inferior a 7.

## 4 Procedimento experimental

### 4.1 Introdução

Neste capítulo serão apresentados os procedimentos laboratoriais e também o planeamento dos ensaios realizados. São também descritos os materiais usados e o equipamento utilizado, bem como o modo de preparação das amostras e da solução estabilizadora. Complementarmente descrevem-se os ensaios UCS (Ensaio de Compressão Simples), XRD, SEM, bem como o ensaio utilizado para avaliar o teor de  $\text{CaCO}_3$ .

### 4.2 Preparação dos provetes de solo

No presente trabalho foram considerados nove tipos diferentes de teores de matéria orgânica (0%, 1.6%, 3%, 4.5%, 6%, 7%, 8%, 10%, 12.5%). Para cada teor em matéria orgânica foram preparados três provetes sem qualquer estabilização e outros três bioestabilizados por via enzimática. Todos os provetes estiveram 14 dias em cura na câmara húmida.

#### 4.2.1 Equipamento

O equipamento necessário para a preparação dos provetes de solo com e sem presença de solução estabilizadora é o seguinte:

- Moldes de PVC ( $\phi 37$ , 76mm);
- Pilão de compactação (10 kg);
- Vaselina;
- Fita-cola;
- Tabuleiro;
- Espátula;
- Garfo metálico;
- Balança (limite erro  $\pm 0.001\text{g}$ );
- Balança (limite erro  $\pm 0.0001\text{g}$ );
- Pelicula aderente;
- Papel de filtro.

#### 4.2.2 Preparação da solução estabilizadora

A solução estabilizadora é preparada misturando ureia, cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), enzima *urease* e a solução tampão de fosfato de sódio 0.2M, para concentrações de ureia e  $\text{CaCl}_2$  iguais a 1mol/L e uma dosagem de *urease* de 16kU/L. A relação entre a dosagem de *urease* e as

concentrações de reagentes correspondem aos valores ótimos que permitem maximizar a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  (Carmona 2016; Carmona et al., 2018).

#### **4.2.3 Montagem dos provetes de solo**

Os provetes de solo são reconstituídos usando moldes de 37 mm de diâmetro (D) e 76 mm de altura (h). Estes valores estão de acordo com a norma NP EN 12390-1 (2010), dado a razão h/D ser igual a 2.

De forma a diminuir a interferência de partículas de grandes dimensões, nos provetes foi utilizado o material passado no peneiro ASTM de malha quadrada 2mm (n° 10).

Na preparação dos provetes foram pesadas as diferentes massas de argila e de solo orgânico de base conforme o teor em matéria orgânica pretendido, estas massas foram calculadas recorrendo ao sistema de equações formado pelas equações (4.1) e (4.2)

$$1.64\% * M_{\text{Argila}} + 37.66\% * M_{\text{MO}} = \% \text{OM} * M_{\text{Provete}} \quad (4.1)$$

$$M_{\text{Argila}} + M_{\text{MO}} = M_{\text{Provete}} \quad (4.2)$$

sendo  $M_{\text{Solo base}}$  a massa de solo de base,  $M_{\text{MO}}$  a massa de solo orgânico e  $M_{\text{Provete}}$  a massa do provete.

Foram preparados três provetes em simultâneo perfazendo 450 g de solo, o qual foi misturado com água de modo a garantir um teor de água de 22% (33mL/provete), correspondete ao limite de plasticidade do solo argiloso. Seguidamente esta massa foi dividida em diversas partes de modo a permitir a preparação de cada provete com seis camadas, estando cada uma sujeita a uma carga de 10kg durante 10s. Após cada camada ser compactada a superfície é esscarificada, com o auxílio do garfo metálico, formando uma superfície rugosa entre camadas. O processo encontra-se esquematizado na Figura 4.1.

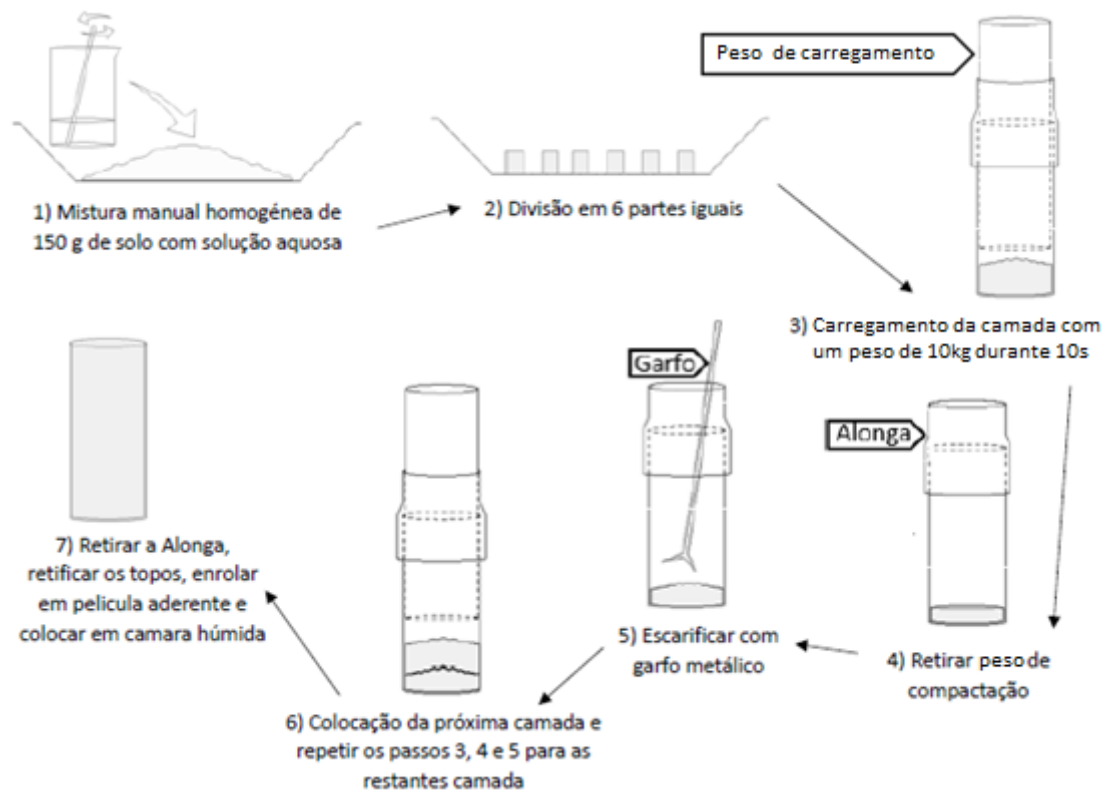


Figura 4.1 – Esquema ilustrativo do procedimento utilizado na preparação dos provetes (adaptado de Carmona, 2016)

Os provetes com solução estabilizadora foram preparados de forma idêntica aos provetes sem solução estabilizadora. Neste caso a água destilada foi substituída por solução estabilizadora ( $w = 22\%$ ). A solução estabilizadora é preparada seguindo o procedimento descrito no ponto 4.2.2.

### 4.3 Ensaios de Compressão Simples (UCS)

#### 4.3.1 – Preparação dos provetes

Esta investigação contemplou a realização de ensaios UCS para avaliação dos parâmetros mecânicos (resistência e deformabilidade), aferindo desta forma a eficiência do processo de bioestabilização.

Antes do início do ensaio, foi realizada a calibração dos instrumentos de medição da prensa, nomeadamente do transdutor de deslocamento e da célula de carga.

O procedimento adotado no ensaio é o seguinte:

1. Medição da altura e o diâmetro do provete.

2. Colocação do provete no pedestal e alinhamento do seu eixo com a célula de carga, permitindo a aplicação da carga seja no eixo do provete.
3. Aproximar o provete o máximo possível da célula de carga, sem que seja aplicada uma força no provete.
4. Iniciação (colocação a zero) do deslocamento (transdutor de deslocamento) e da força (célula de carga).
5. Início do ensaio de compressão com uma velocidade de deformação de 1%/min (0,76mm/min). Esta velocidade enquadra-se entre os 0.5%/min e 2%/min, tal como preconizado pela norma ASTM D 2166 (2000).
6. Registo automático dos valores da força e deslocamento através do software *Triax*.
7. O ensaio termina quando, após se ter atingido o valor da carga máxima ( $q_{u\text{ máx}}$ ) o valor medido pela célula de carga diminui para perto de zero, ou estabiliza num determinado valor;
8. Gravação dos dados obtidos após o fim do ensaio;
9. Remoção do provete do pedestal. Uma parte do provete é utilizada para a medição do teor em água e matéria orgânica, sendo o resto utilizado para avaliar o teor de  $\text{CaCO}_3$ , pH e realização de ensaios DRX e SEM.

#### 4.3.2 – Tratamento de resultados

Para a determinação de  $q_{u\text{ máx}}$  divide-se a força máxima medida pela célula de carga ( $F_{\text{max}}$ ), pela área corrigida ( $A_c$ ) do provete, de acordo com a expressão 4.3. A área corrigida ( $A_c$ ) é calculada através da expressão 4.4, onde,  $A_0$  é a área inicial do provete e  $\epsilon_{\text{ax}}$  representa a extensão axial do provete.

$$q_{u\text{ máx}} = F_{\text{max}} / A_c \quad (4.3)$$

$$A_c = A_0 / (1 - \epsilon_{\text{ax}} / 100) \quad (4.4)$$

O modulo de deformabilidade analisado correspondente a 50% da tensão máxima de rotura ( $E_{u50}$ ), sendo avaliado a partir da identificação do ponto da curva tensão- extensão com  $q_{u\ 1/2} = 50\% q_{u\text{ máx}}$ . O modulo de deformabilidade representa o declive da reta secante que passa por esse ponto, utilizando-se a expressão 4.5, na qual  $q_{u\ 1/2}$  representa 50% da tensão máxima de rotura e  $\epsilon_{\text{ax}(q_{u\ 1/2})}$  representa a extensão axial correspondente a 50% da tensão máxima de rotura.

$$E_{u\ 50} = q_{u\ 1/2} / \epsilon_{\text{ax}(q_{u\ 1/2})} \quad (4.5)$$

Nos ensaios UCS existem “bedding errors” que surgem devido ao ajuste do equipamento de medição ao provete.

Este erro é caracterizado no gráfico ( $q_u$ - $\epsilon_{ax}$ ) por uma zona inicial em que há uma variação da deformação sem variação ou com uma variação mínima da tensão axial. De forma a eliminar estes erros corrigem-se dos valores de  $\epsilon_{ax}$ , no troço inicial com “bedding errors” de acordo com o ilustrado na Figura 4.2. Esta correção é realizada de forma a não alterar as características da curva de ensaio, nomeadamente a tensão ( $q_u$ ) e o módulo de deformabilidade do material ( $E_{u50}$ ).

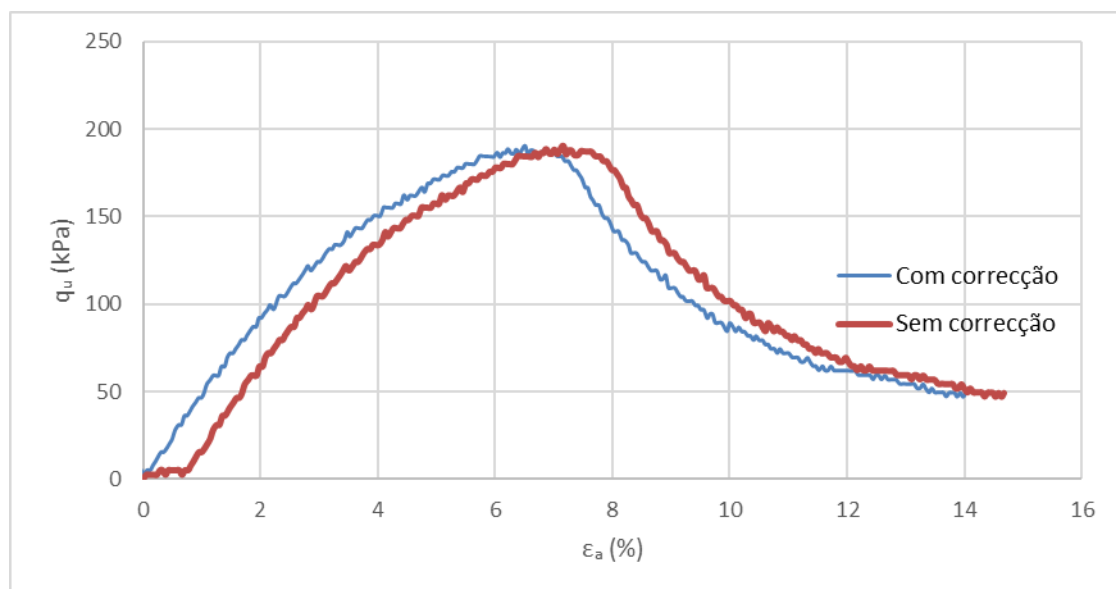
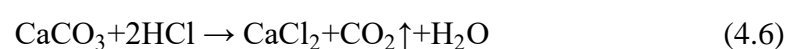


Figura 4.2 – Correção dos “bedding errors”.

## 4.4 – Medição de $\text{CaCO}_3$

### 4.4.1 – Calibração

A avaliação do teor de  $\text{CaCO}_3$  foi baseado no procedimento de Neupane et al. (2015), relacionando-se o teor de  $\text{CaCO}_3$  com o volume de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) libertado após adição de ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ), de acordo com a seguinte reação química:



Este processo requer a prévia calibração do sistema de medição, o qual se encontra representado na Figura 4.3 e descrito da seguinte forma: (i) inicialmente é introduzida uma massa conhecida



de CaCO<sub>3</sub> (puro ou misturado com solo) num recipiente; (ii) o recipiente é fechado com uma rolha com dois furos, que permitem a ligação de um funil (com válvula acoplada) e a uma haste de vidro; a haste de vidro liga o recipiente a um tubo de medida, previamente cheio com água; (iii) no funil é introduzido 10 mL de HCl; (iv) a válvula do funil é aberta e os 10 mL de HCl entram em contato com o CaCO<sub>3</sub>; v) a reação química descrita pela equação 4.6 inicia-se sendo libertado CO<sub>2</sub> cujo volume é medido no tubo de medida; (vi) representação gráfica do volume de CO<sub>2</sub> útil (descontando 10 mL de HCl) em função da massa de CaCO<sub>3</sub> (Figura 4.3); (vii) a calibração dos sistema corresponde à representação de uma regressão linear que relaciona o volume de CO<sub>2</sub> e a massa de CaCO<sub>3</sub> equação (4.7).

$$V_{\text{CO}_2} = 210.32 * m_{\text{CaCO}_3} \quad (4.7)$$

Complementarmente, os valores experimentais obtidos são confrontados com os valores teóricos, os quais correspondem a um rendimento de 100%. O valor da massa teórica é calculado através da equação (4.8)

$$m_t = C * M * V \quad (4.8)$$

sendo C é a concentração de reagentes (mol/L), M a massa molar de CaCO<sub>3</sub> (100.087 g/mol) e V o volume da solução.

Na figura 4.3 encontra-se representados diferentes pontos utilizados para a calibração do sistema de medição de CaCO<sub>3</sub>.

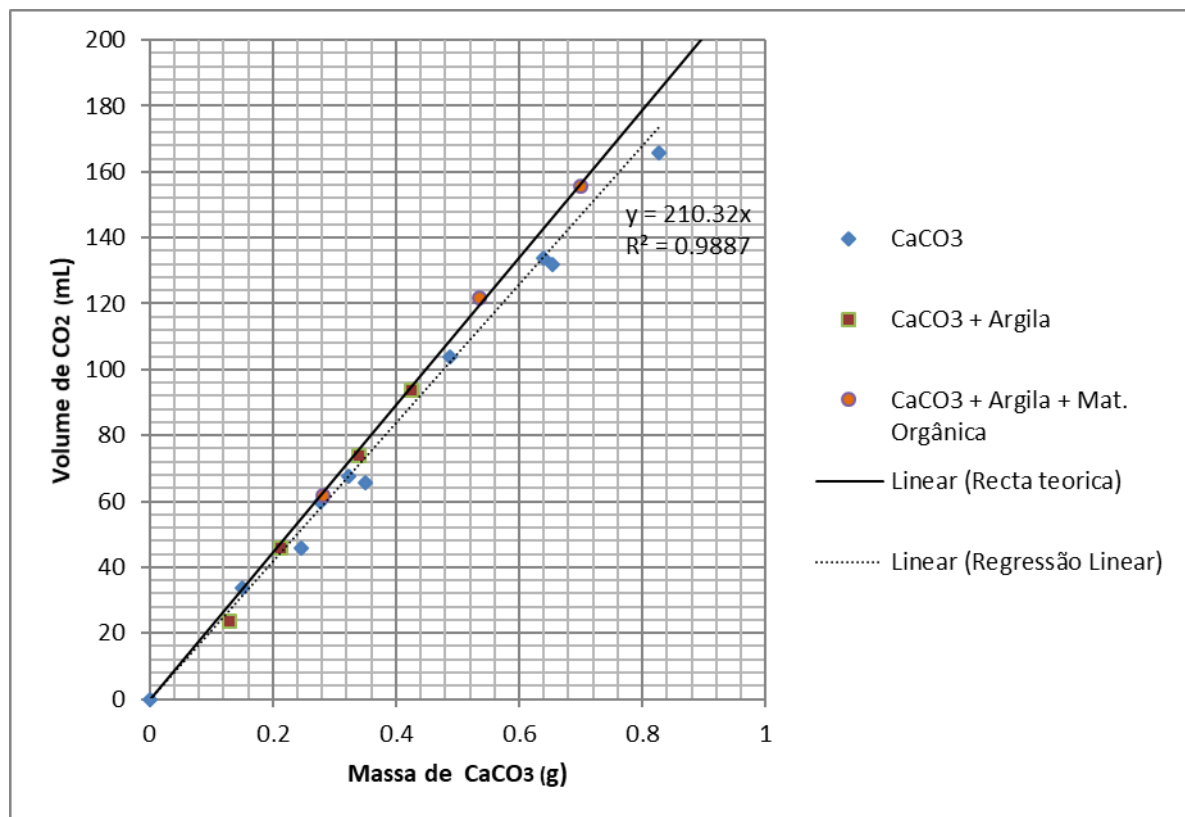


Figura 4.3 – Calibração do sistema de medição de CO<sub>2</sub> (CVE)

#### 4.4.2 Medição do CaCO<sub>3</sub> nos provetes após ensaio UCS

Em termos práticos, a medição de CaCO<sub>3</sub> em amostras bioestabilizadas segue os procedimentos utilizados na calibração, ou seja, mede-se o volume de CO<sub>2</sub> após adição de 20 ml de HCL, sendo a massa de CaCO<sub>3</sub> calculada com a relação (4.7). O procedimento é descrito nos seguintes pontos (Neupane et al., 2015):

1. Pesa-se uma quantidade de amostra;
2. Isola-se o sistema de medição;
3. Insere-se 20 mL de solução HCl (2,5M) em contacto com o solo, iniciando-se a reação da equação (4.6)
4. Reação do solo com o HCl até não se formarem mais bolhas e efetua-se a leitura do volume de água deslocado (volume total) no tubo de ensaio;
5. Ao volume total é descontado o volume de HCl colocado no sistema, correspondendo o volume de CO<sub>2</sub> à diferença.
6. Cálculo da massa de CaCO<sub>3</sub> precipitado através da equação (4.7).
7. A massa de CaCO<sub>3</sub> precipitado obtida, é dividida pela massa de amostra inserida no sistema de medição, obtendo a percentagem de CaCO<sub>3</sub> precipitado.

#### **4.5 Medição do Teor em água dos provetes após ensaio UCS**

A quantificação do teor em água foi realizada de acordo com a norma NP-84 1965, traduzida pela seguinte expressão:

$$W = [(m_2 - m_3) / (m_3 - m_1)] \times 100 \quad (4.9)$$

$m_1$  – massa do recipiente

$m_2$  – massa do recipiente e do provete antes da secagem

$m_3$  – massa do recipiente e do provete seco

#### **4.6 Medição do Teor de Matéria Orgânica dos provetes após ensaio UCS**

A quantificação do teor de matéria orgânica (OM) foi executada de acordo com os procedimentos descritos na norma BS 1377-3 (1990) descritos pela expressão (3.1)

#### **4.7 Ensaio XRD**

De forma a identificar a presença de  $\text{CaCO}_3$  nas amostras de solo bioestabilizado foram realizados ensaios DRX (Difração do raio-X) no Laboratório de Sedimentologia do Departamento de Ciências da Terra da Universidade de Coimbra.

#### **4.8 Ensaio SEM (Scanning Electron Microscops)**

Este tipo de ensaio foi realizado de forma a confirmar a formação do precipitado  $\text{CaCO}_3$  nos provetes ensaiados, através da análise de imagens ampliadas, complementadas com análise química. Neste ensaio foi utilizado um microscópio eletrónico Zeiss Merlin Gemini II pertencente ao IPN (Instituto Pedro Nunes).

Este sistema obtém imagens a partir do varrimento de um raio de eletrões pela amostra, obtendo o perfil topográfico da mesma.

Este processo inicia-se com a aplicação de uma camada de ouro (Au), em vácuo, à amostra aumentando o seu potencial condutor. Após esta preparação a amostra é colocada no microscópio, onde é induzido o vácuo, posteriormente procede-se à recolha dos perfis topográficos e químicos das amostras.

#### 4.9 Plano de ensaios

Tendo em consideração que o presente trabalho de investigação pretende analisar o efeito do teor de matéria orgânica no processo de bioestabilização por via enzimática, é comparado o comportamento de provetes não estabilizados e bioestabilizados para teores de matéria orgânica de 0%, 1.7%, 3.0%, 4.5%, 5.2%, 6.8%, 8.9%, 10.3% e 11.2% (Quadro 4.1 e 4.2). Todos os provetes foram sujeitos a cura em câmara húmida (temperatura =  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ; humidade =  $95\pm 5\%$ ) durante 14 dias, antes de serem ensaiados.

Quadro 4.1 – Características dos provetes ensaiados sem solução estabilizadora.

OM <sub>obtido</sub> (%)	nº provetes
0	3
1,7	3
3,0	3
4,5	3
5,2	3
6,8	3
8,9	3
10,3	3
11,2	3

Quadro 4.2 – Características dos provetes ensaiados com solução estabilizadora.

OM* <sub>obtido</sub> (%)	Nº provetes	Urease (kU/L)	Ureia (mol/L)	CaCl <sub>2</sub> (mol/L)
3.0	3	16	1	1
3.8	3	16	1	1
4.5	3	16	1	1
5.4	3	16	1	1
7.4	3	16	1	1
8.8	3	16	1	1
8.9	3	16	1	1
10.3	3	16	1	1
11.9	3	16	1	1

Comparando os valores dos Quadros 4.1 e 4.2 no respeitante aos teores em matéria orgânica medidos após a realizações de ensaios UCS, constata-se a existência de maiores valores nos provetes bioestabilizados. De facto, estes últimos valores não são fiáveis, sendo expectável que processo de aquecimento na mufla induza também a decomposição térmica do carbonato de cálcio, descrito pela equação (4.10) (Neupane et al., 2015), mascarando os valores medidos, os quais não correspondem na integra à matéria orgânica. Assim, na análise efetuada no capítulo 5 os teores em matéria orgânica apresentados dizem respeito aos teores medidos nos provetes não estabilizados.



#### **4.10 Precisão das medições**

De forma a minimizar a ocorrência de erros foram usados instrumentos de elevada precisão de modo a garantir a minimização dos erros de medição. No Quadro 4.3 apresentam-se as precisões das diversas medidas utilizadas neste trabalho.

Quadro 4.3 – Precisão da instrumentação utilizada.

<b>Pesagens e Medições</b>	<b>Precisão</b>
Cloreto de cálcio	0.001 g
Ureia	0.001 g
Enzima <i>urease</i>	0.0001 g
Fosfato de sódio	0.001 g
Água	0.001 L
Solo	0.1 g
Cápsulas	0.001 g
pH	0.01
<b>Prensa (UCS)</b>	
Força	$1 \times 10^{-6}$ N
Deslocamento	$1 \times 10^{-6}$ mm

## 5 Apresentação e Análise de Resultados

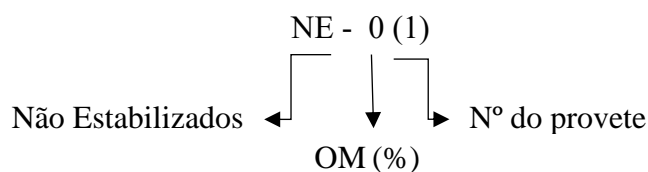
### 5.1 Introdução

No presente capítulo, são apresentados e analisados os resultados experimentais obtidos na determinação da influência do teor de matéria orgânica no processo de precipitação de  $\text{CaCO}_3$  por via enzimática.

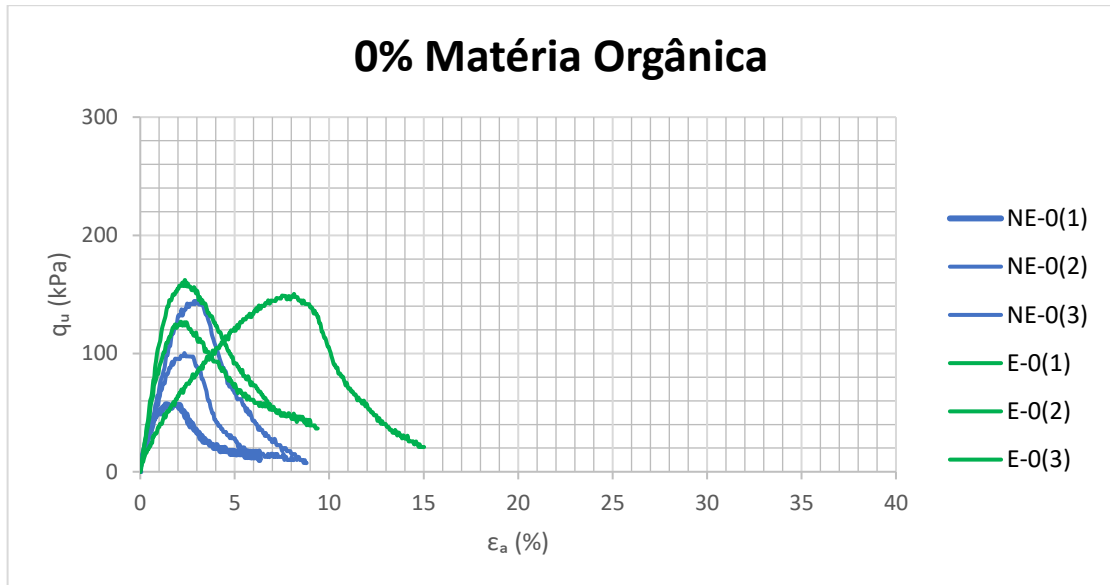
São discutidos os diferentes parâmetros medidos, nomeadamente pH, teor em água (w), teor em matéria orgânica (OM), resistência à compressão não confinada ( $q_{u \text{ máx}}$ ) e módulo de deformabilidade não drenado, para um nível de tensão correspondente a 50% da tensão de rotura ( $E_{u50}$ ). Complementarmente, é analisada a forma como estes parâmetros se relacionam com a percentagem de  $\text{CaCO}_3$  gerada pelo processo de bioestabilização.

### 5.2 Comportamento tensão-deformação

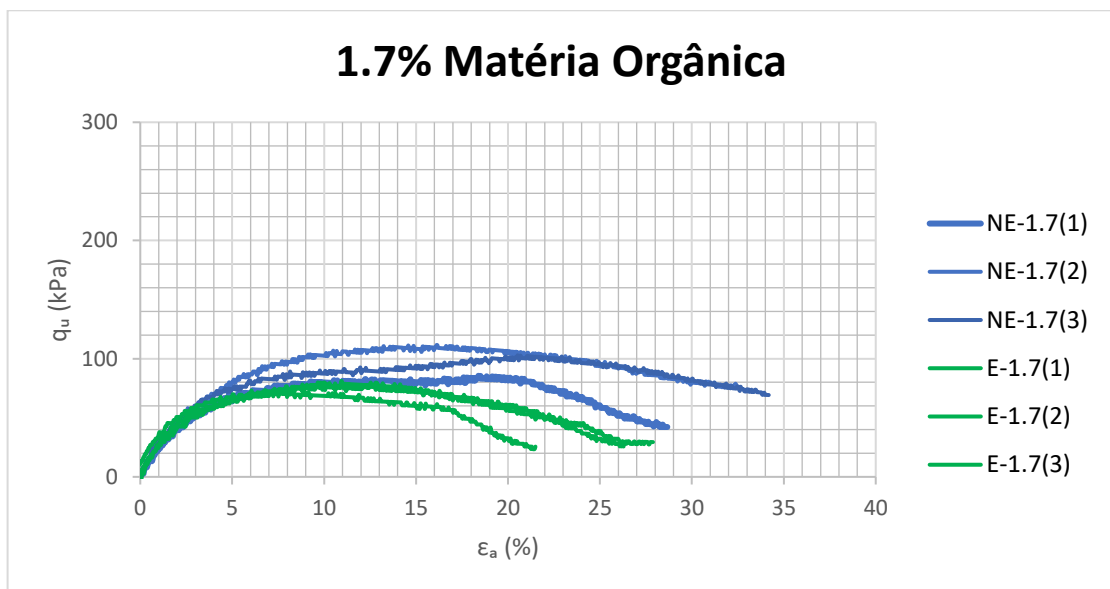
Na Figura 5.1 apresentam-se as curvas tensão-extensão referentes aos ensaios UCS de provetes estabilizados (E) e não estabilizados (NE) para os diferentes teores em matéria orgânica. Os provetes são identificados se acordo com a seguinte nomenclatura:



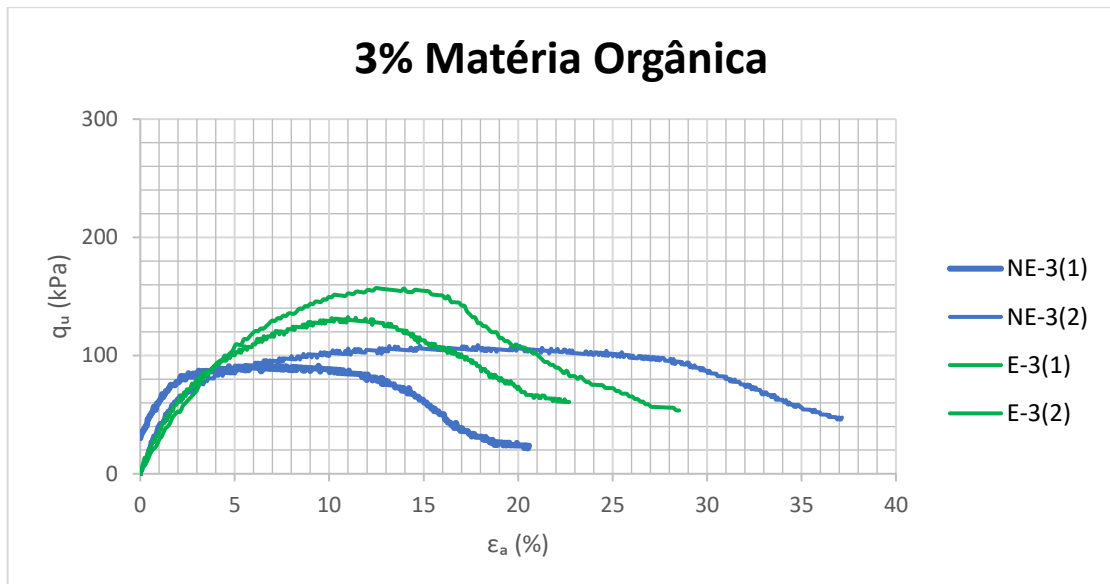
De um modo geral, para valores de OM inferiores a 3% constata-se, que o comportamento tensão-deformação não é significativamente influenciado pelo processo de bioestabilização. Contudo, para valores de OM superiores a 3%, observa-se que o processo de bioestabilização origina, em paralelo com elevados acréscimos de resistência em relação aos provetes não estabilizados, o aumento da fragilidade do solo bioestabilizado, enquanto que o solo não estabilizado apresenta um comportamento com maior ductilidade, consequência do elevado teor em matéria orgânica, a qual promove o incremento da deformabilidade na rotura.



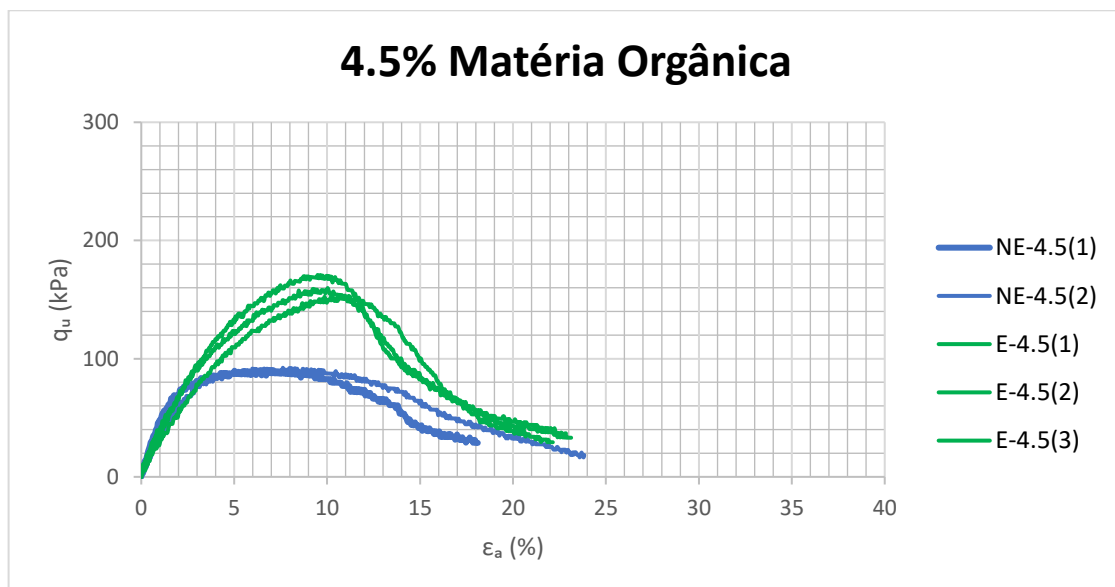
a)



b)

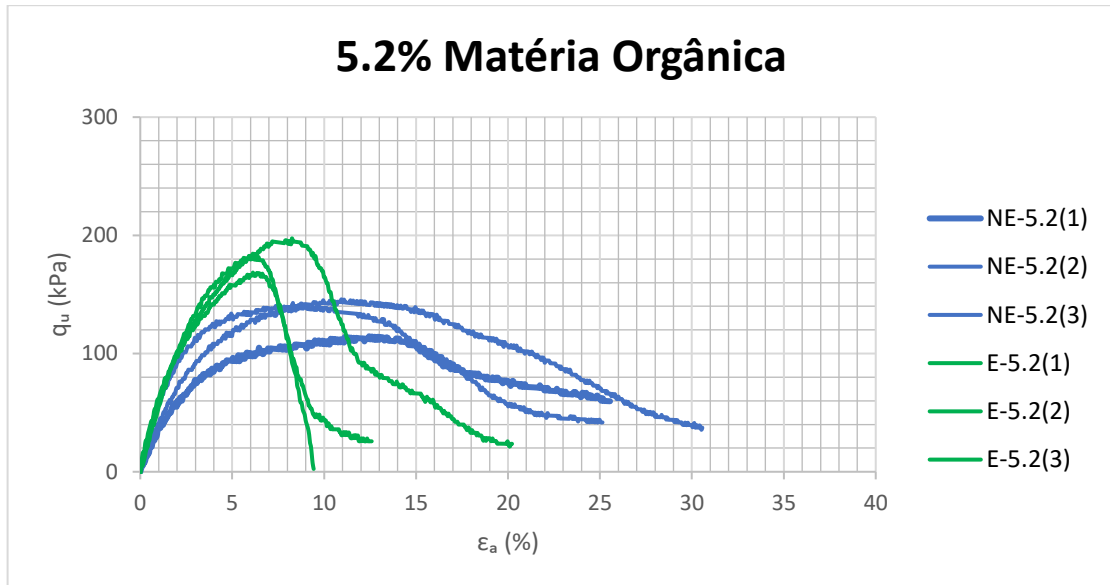


c)

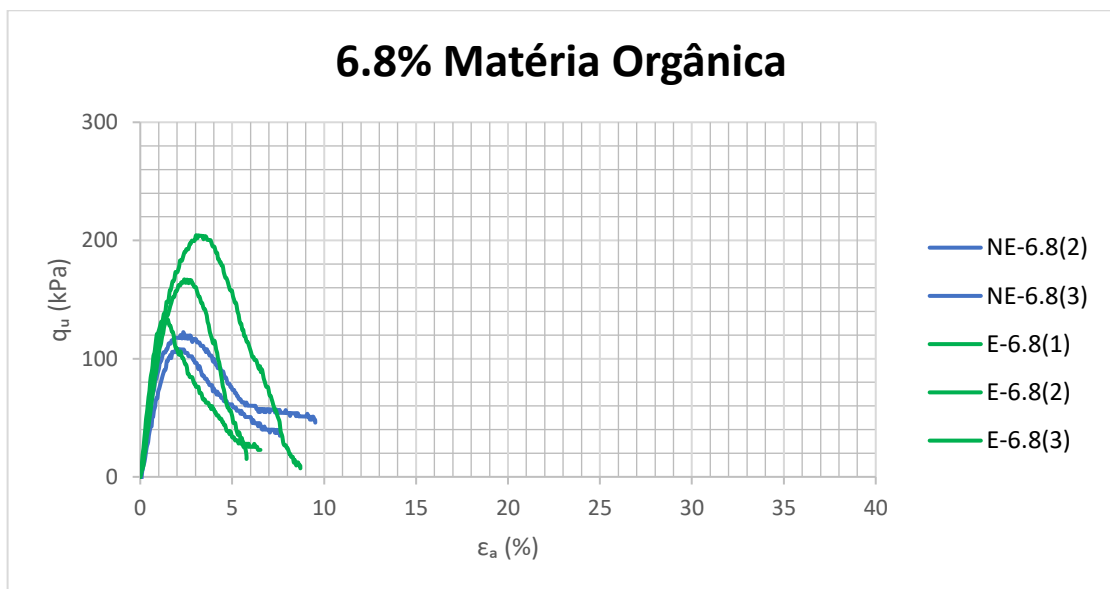


d)

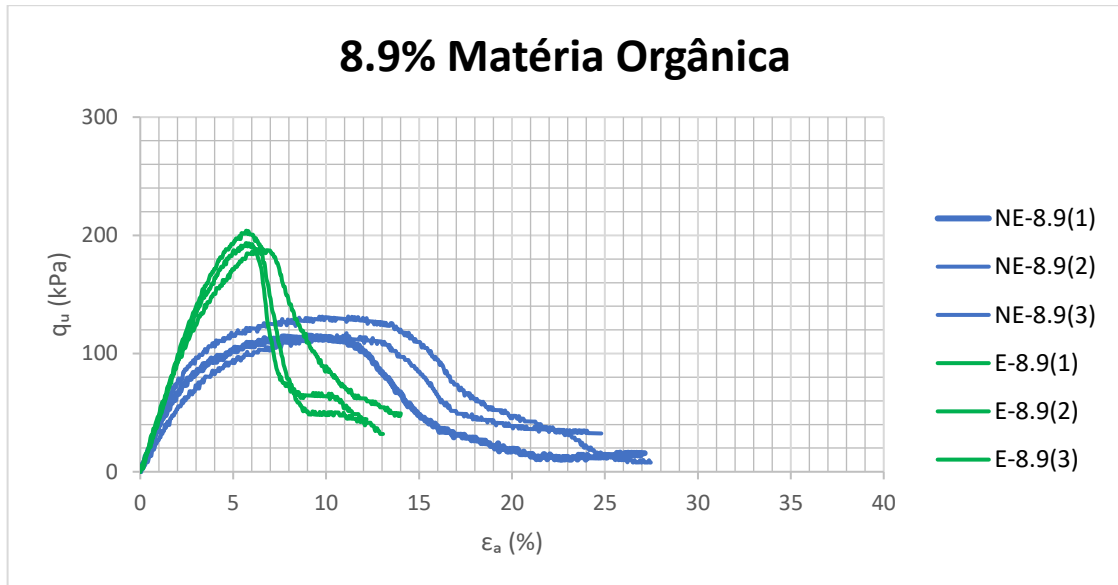




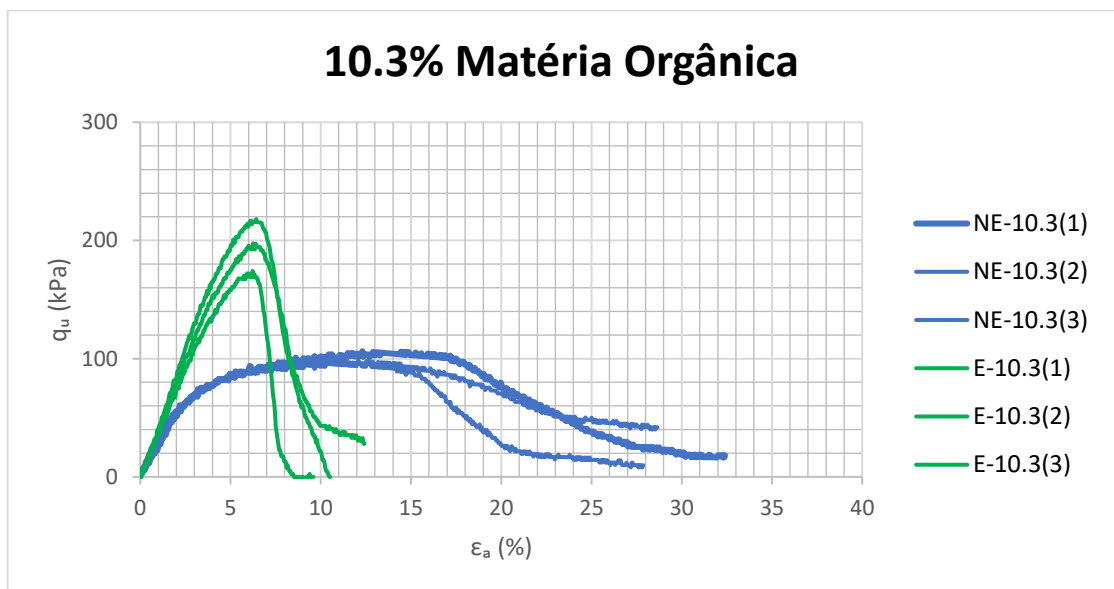
e)



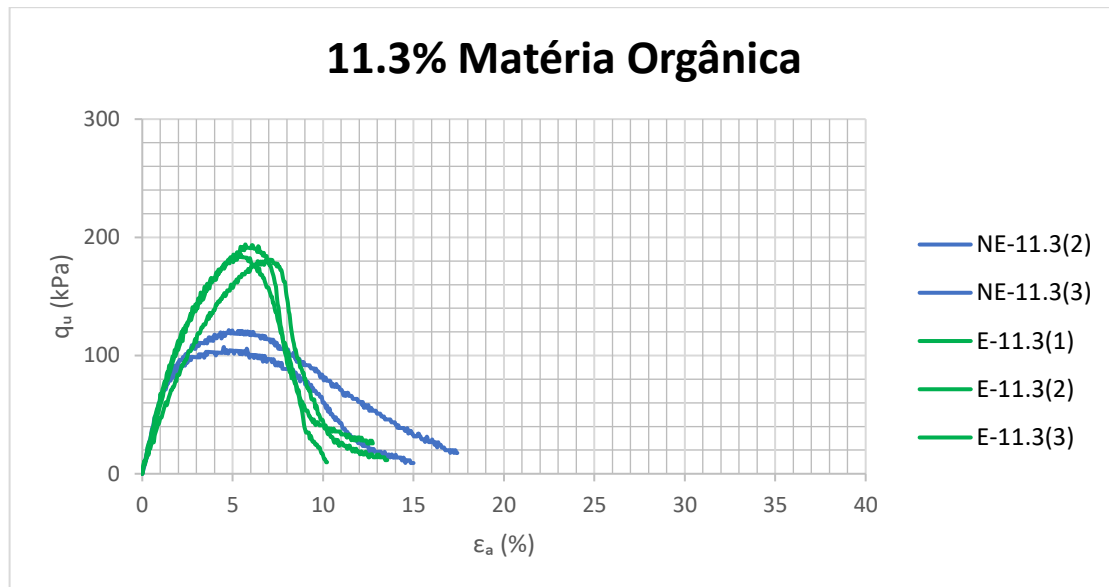
f)



g)



h)



i)

Figura 5.1 – Gráfico tensão-extensão ( $q_u$ - $\epsilon_{ax}$ ) dos ensaios UCS realizado para diferentes teores de OM iniciais: a) 0%; b) 1.7%; c) 3%; d) 4.5%; e) 5.2%; f) 6.8%; g) 8.9%; h) 10.3%; i) 11.3%

### 5.3 Variação de $q_u$ máx com OM

Inicialmente foram ensaiados 3 provetes para cada teor de OM (0%, 1.7%, 3.0%, 4.5%, 5.2%, 6.8%, 8.9%, 10.3% e 11.3%) tendo-se repetidos os ensaios para os teores em matéria orgânica 1.7% e 5.2% para tentar despistar algumas incongruências.

Nas figuras 5.2 apresenta-se a variação da tensão máxima de rotura para diferentes teores de OM.

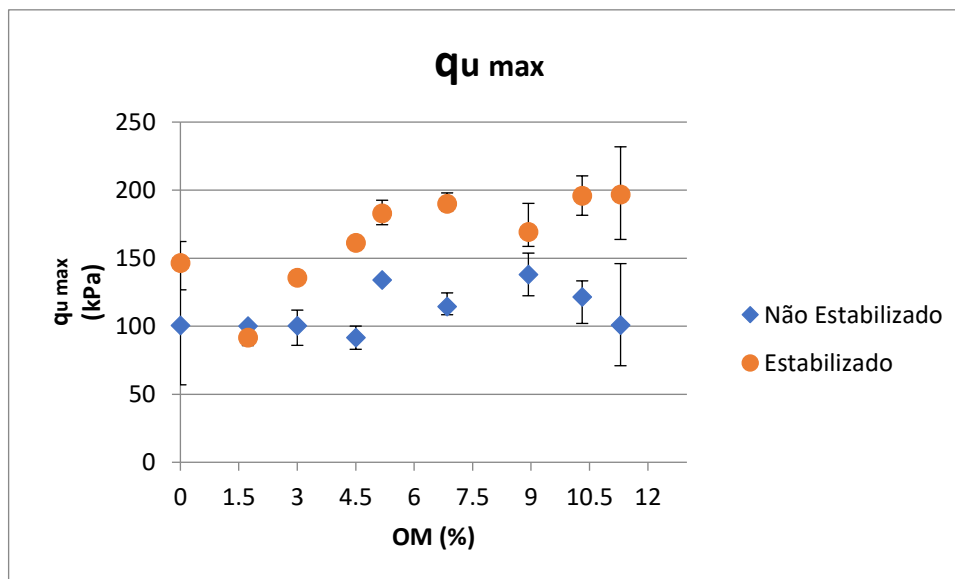


Figura 5.2 – Variação da tensão máxima de rotura com o aumento do teor de OM no solo

Comparando os dois casos, com e sem solução estabilizadora, é possível observar um aumento da resistência do provete à compressão nos provetes bioestabilizados, sendo este aumento da resistência mais acentuado para maiores teores de OM. Contudo, para valores de OM superiores a 8% observa-se que a capacidade resistente de provetes bioestabilizados tende a estabilizar,

O comportamento obtido, mostra que o processo de bioestabilização com recurso a enzimas pode ser utilizado em solos com elevados teores de OM.

#### 5.4 Variação de $E_{u50}$ com OM

A Figura 5.3 ilustra a variação de  $E_{u50}$  em relação ao teor de matéria orgânica. Contrariamente ao observado para a resistência, a variação de  $E_{u50}$  não revela nenhuma relação nítida com o teor em matéria orgânica. Contudo, muito embora com algumas flutuações, os resultados mostram para teores de OM superiores a 6% um efeito ligeiramente positivo do processo de bioestabilização na rigidez dos provetes.

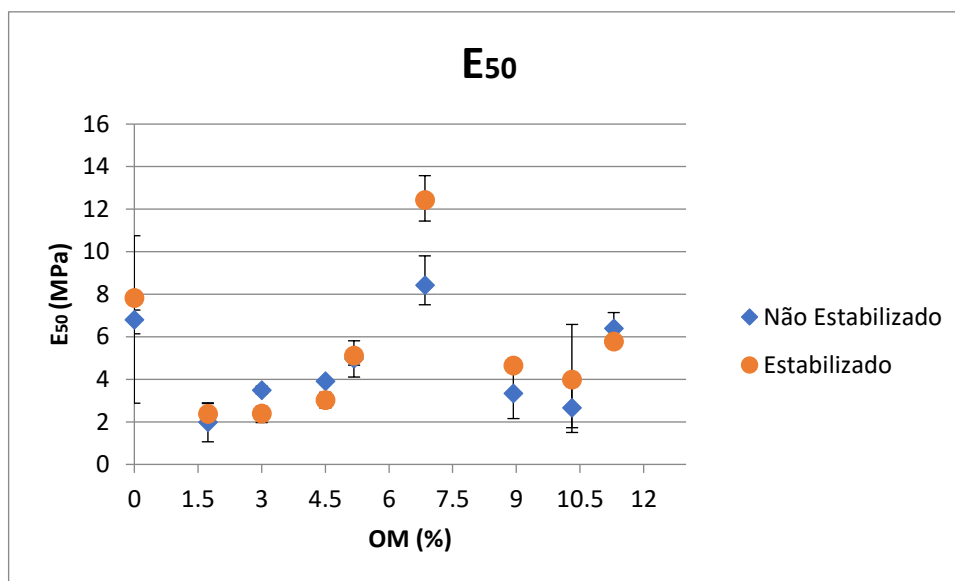


Figura 5.3 – Variação do E50 com o teor de OM nos provetes

### 5.5 Variação do teor de CaCO<sub>3</sub> em função de OM

Na Figura 5.4 são apresentados os valores das medições de CaCO<sub>3</sub> para os diferentes teores de OM. Ao analisar a figura conclui-se que o aumento de OM potencia uma maior precipitação de CaCO<sub>3</sub>. Este facto parece dever-se ao aumento do coeficiente de permeabilidade, induzido pelo incremento de OM, facilitando a percolação da solução estabilizadora, e consequentemente potenciando a precipitação de CaCO<sub>3</sub>.

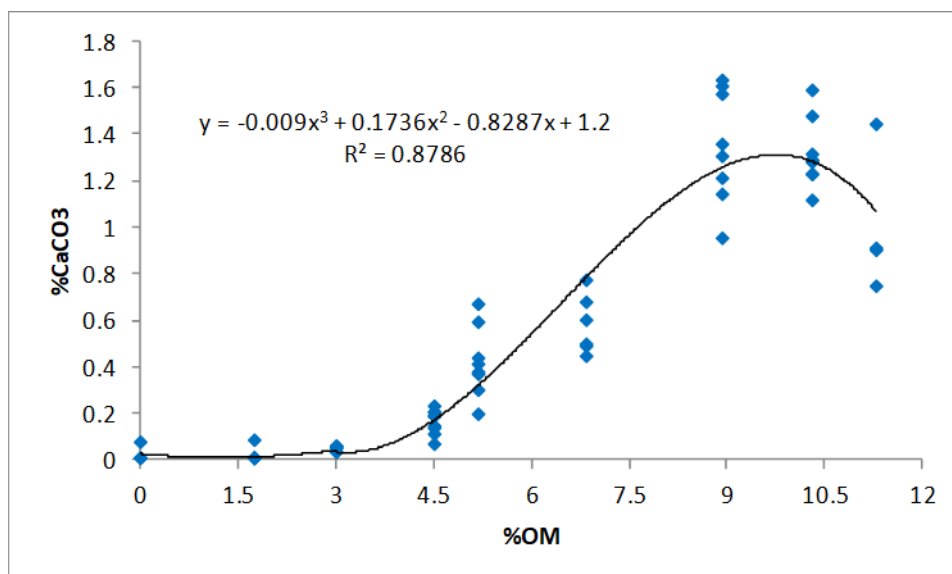


Figura 5.4 – Variação do teor de CaCO<sub>3</sub> em função da OM

Ao comparar a quantidade de  $\text{CaCO}_3$  precipitado com a tensão máxima de rotura (Figura 5.5), verifica-se, até 0,6% de  $\text{CaCO}_3$  o incremento de  $q_u$  com  $\text{CaCO}_3$ , em consequência do incremento de ligações entre as partículas promovidas pelo carbonato de cálcio precipitado. Contudo, para valores de  $\text{CaCO}_3$  superiores a 0,6% não verifica um aumento da  $q_{u \text{ máx}}$ , observando-se a tendência para estabilizar a partir deste valor. De facto, esta variação é semelhante à observada na Figura 5.6, relativa à variação de  $E_{u50}$ .

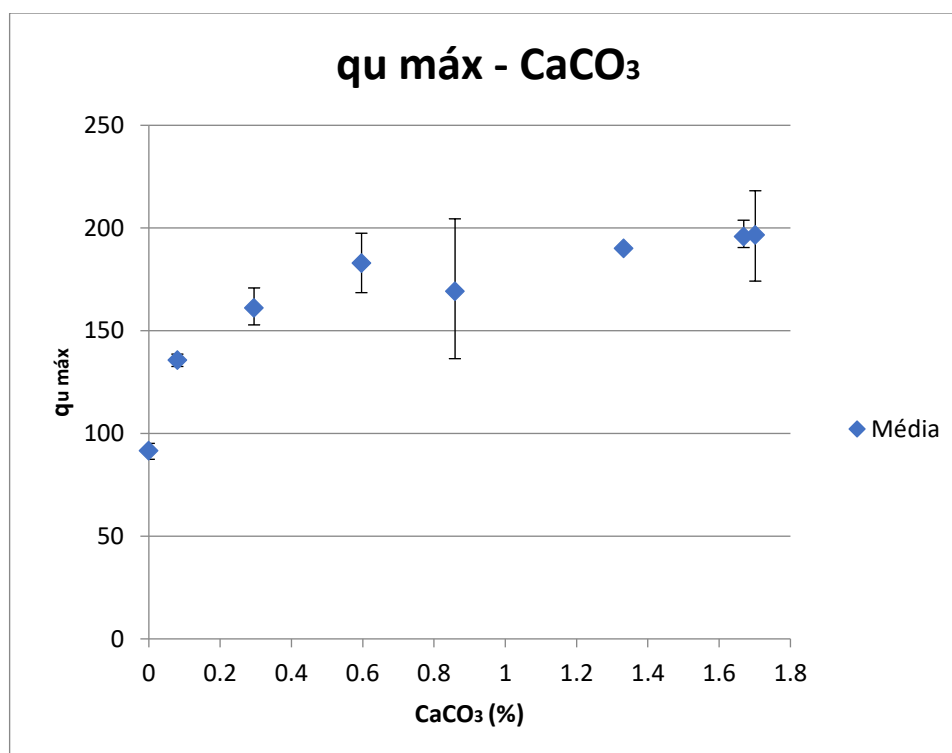


Figura 5.5 – Variação da tensão máxima de rotura em função do teor  $\text{CaCO}_3$ .

Na Figura 5.6 apresenta-se a variação do módulo de deformabilidade não drenado ( $E_{u50}$ ) com o teor de  $\text{CaCO}_3$  precipitado. Até cerca de 0,6% de  $\text{CaCO}_3$  observa-se com o aumento do teor de carbonato de cálcio precipitado, o aumento da rigidez dos provetes, ou seja, as ligações entre as partículas promovidas pelo  $\text{CaCO}_3$  contribuem para o incremento da rigidez do esqueleto sólido dos provetes bioestabilizados. Na figura também se observa que valores superiores a 0,6% de  $\text{CaCO}_3$  não tem repercussão no aumento de rigidez dos provetes. De facto, esta variação é semelhante à observada na Figura 5.5, relativa à variação de  $q_{u \text{ máx}}$ .

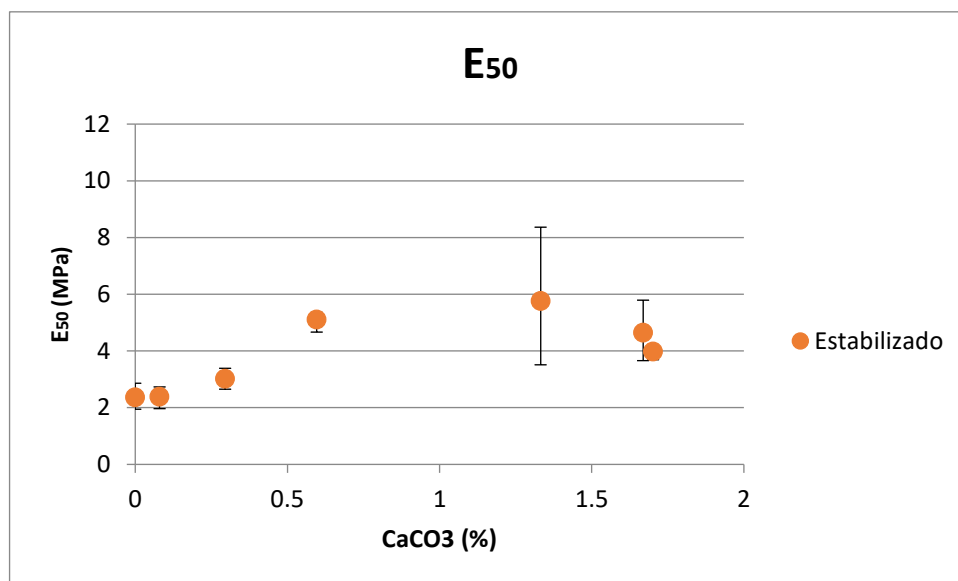


Figura 5.6 – Variação de  $E_{50}$  com o teor de  $CaCO_3$

### 5.6 Ensaio XRD (Raios X)

Na Figura 5.7 e Quadro 5.1 apresentam-se os resultados dos ensaios XRD realizados para 7 provetes, com teores em matéria orgânica de 3%, 5.2%, 6.8%, 8.9% e 10.3%, com concentrações de ureia-CaCl de 1mol/L e com dosagem de *urease* de 16 kU/L. Na Figura 5.7 observa-se a sobreposição dos resultados das 7 amostras, sendo a formação de calcite traduzida pela reflexão entre 3.03-3.04 Angstrom, correspondendo no gráfico da Figura 5.7 à abcissa 29.4-29.5. De uma forma geral, os resultados indicam a formação de  $CaCO_3$  de uma forma moderada nos 7 provetes, corroborando os resultados de medição do teor em  $CaCO_3$ .

Quadro 5.1 – Resultados preliminares do ensaio XRD

Proвете	Quartzo (%)	Feldspato (%)	Filossilicatos (%)	Carbonatos (%)
E-3(1)	95	2	0	3
E-5.2(1)	93	0	0	7
E-6.8(1)	91	2	0	7
E-8.9(1)	63	0	26	10
E-10.3(1)	70	0	18	12
E-10.3(1)	89	0	0	11
E-10.3(3)	69	15	8	7

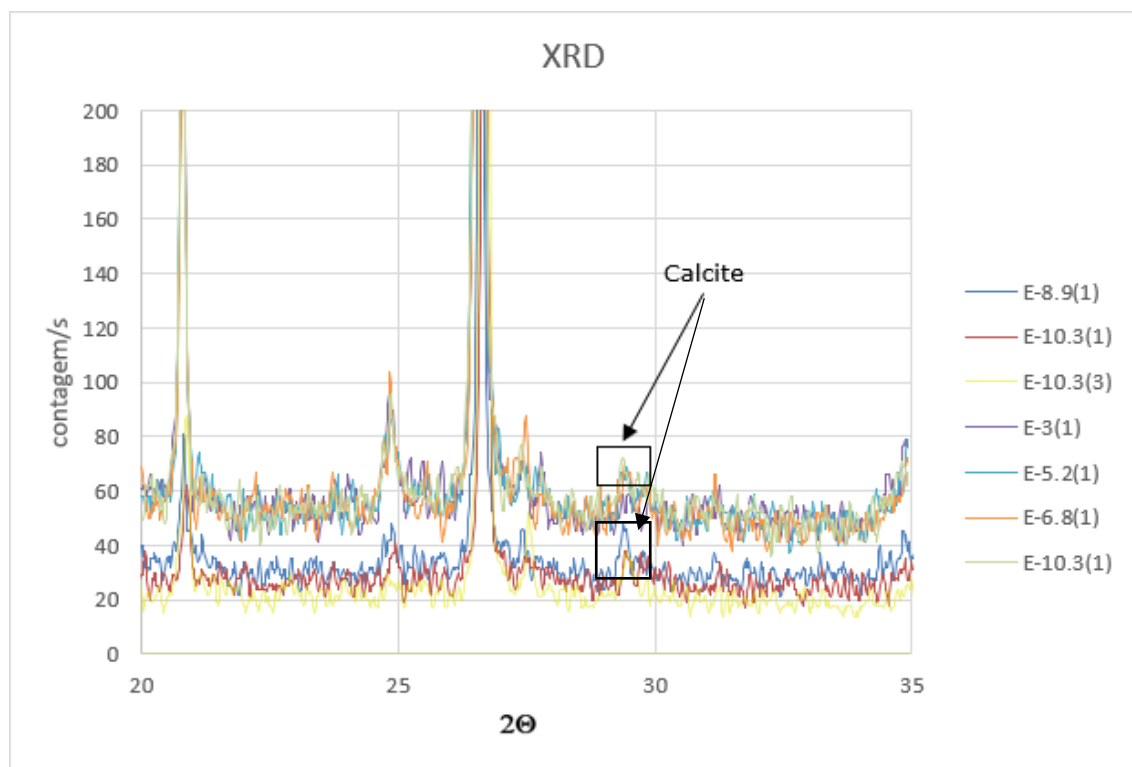


Figura 5.7 – Ensaio XRD para os provetes E-3%, E-5.2%, E-6.8%, E-8.9(1), E-10.3(1) e E-10.3(3)

### 5.7 Variação do valor de pH com o teor de OM

A Figura 5.8 ilustra a variação do valor de pH em função do teor em matéria orgânica dos diversos provetes. Constata-se que o valor de pH do solo (bioestabilizado) tende a aumentar ligeiramente quando o teor de OM é superior a 3%. De uma forma geral o pH dos provetes estabilizados e não estabilizados coincidem. Para teores de OM reduzidos (0%, 1.6%) como o pH do provete é baixo, o processo de estabilização com recurso a enzimas sofre uma influência negativa. Nestes dois casos como o pH é inferior a 7, afastando-se do pH ideal para atuação da enzima *urease*, este processo de estabilização do solo não proporciona o aumento das características resistentes dos provetes.

Na figura 5.9 apresenta-se a variação da tensão máxima de rotura com os diferentes valores de pH. Nos provetes estabilizados com recurso a enzimas observa-se o aumento da capacidade resistente para valores de pH superiores a 7.



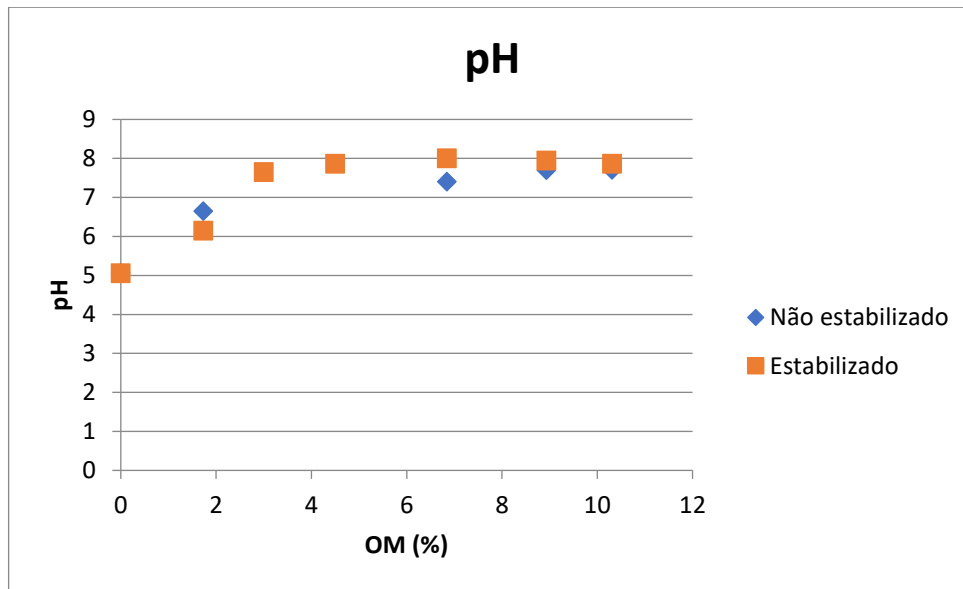


Figura 5.8 – Variação do valor de pH com OM

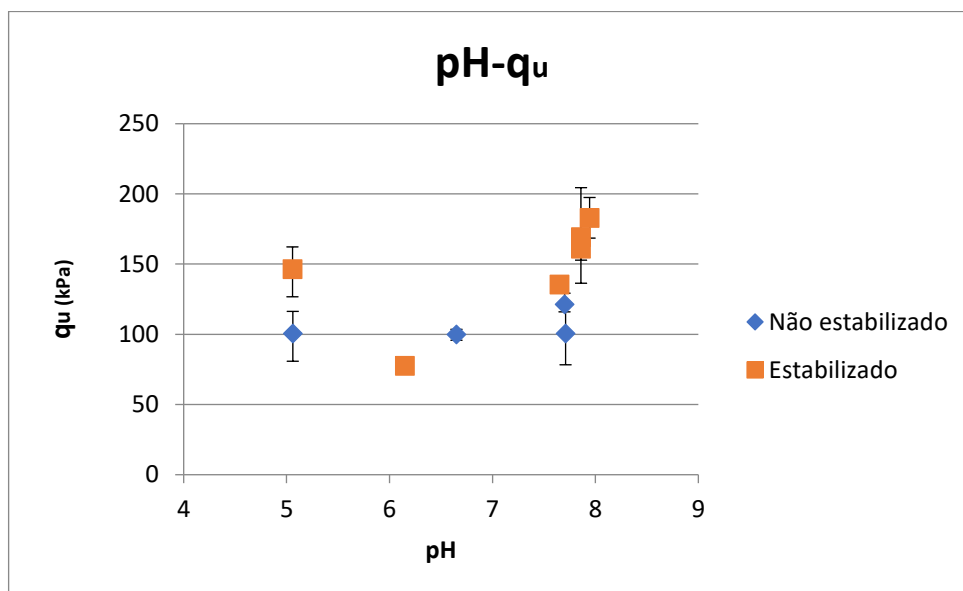


Figura 5.9 – Variação de  $q_u$  em função do pH

### 5.8 Variação do Teor de humidade com diferentes teores de OM

A Figura 5.10 mostra a variação do teor em água (w), medidos após os ensaios UCS, para diversos teores de OM. Como esperado, observa-se o aumento de w com o incremento de OM, dado a matéria orgânica potenciar a capacidade de absorção de água pelos provetes.

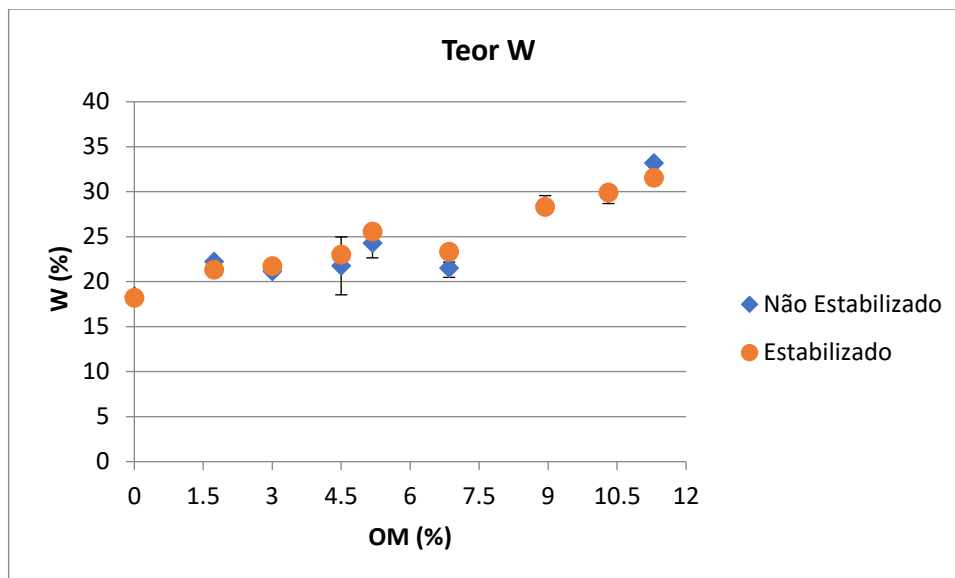


Figura 5.10 – Variação do teor em água com OM

### 5.9 Superfície de rotura dos diferentes provetes ensaiados

A Figura 5.11 ilustra as superfícies de rotura observadas nos diferentes provetes, tanto bioestabilizados como não estabilizados. No cômputo geral não se verifica diferenças entre as superfícies de rotura observadas nos provetes estabilizados e não estabilizados. As superfícies de rotura em todos os provetes ensaiados apresentam uma inclinação próxima de 45°, sendo algumas delas evidentes e outras com desenvolvimento em cunha.

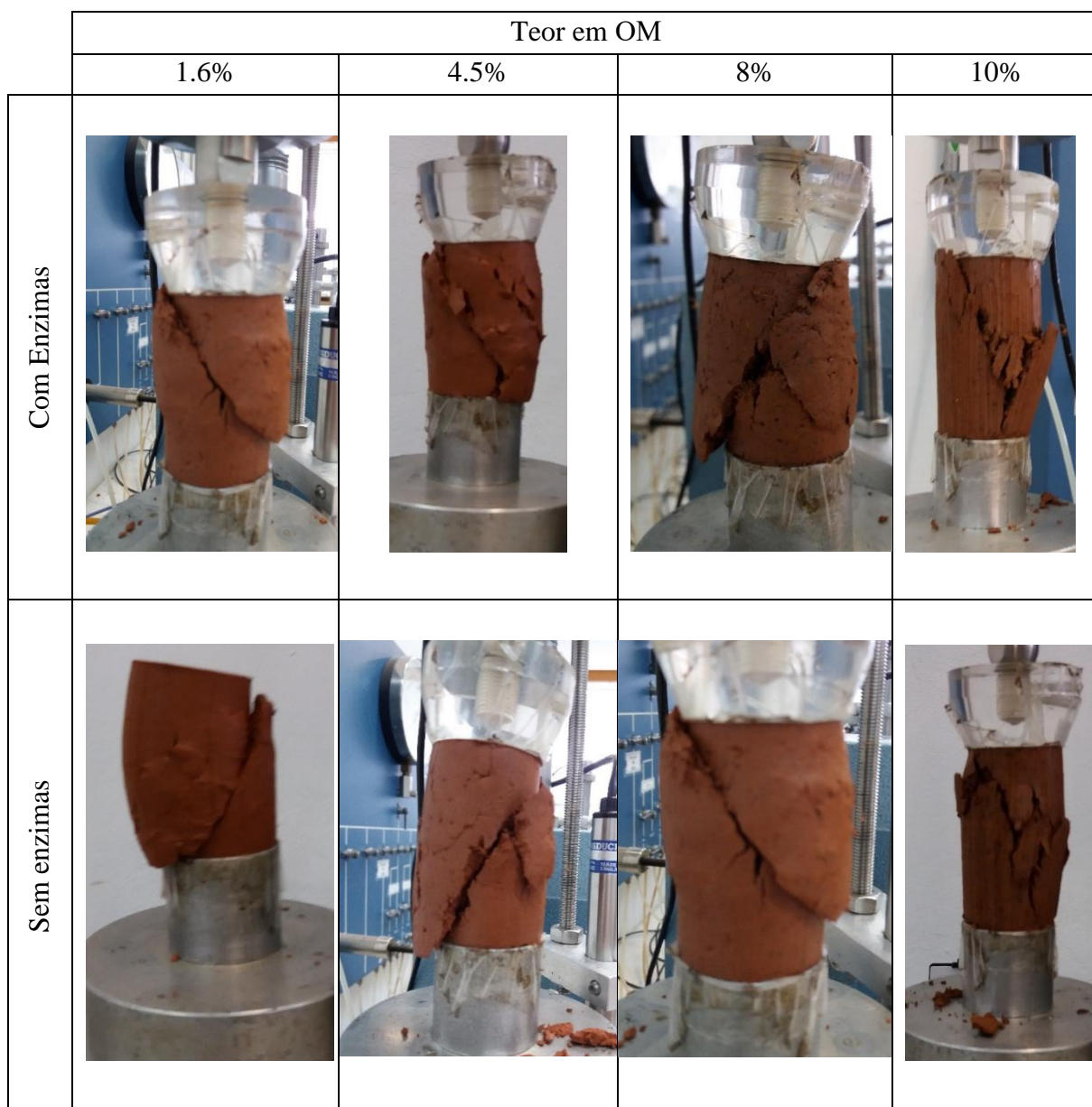


Figura 5.11 – Superfícies de rotura para diferentes teores de OM dos provetes bioestabilizados e não estabilizados

### 5.10 Ensaio SEM

Os ensaios SEM foram realizados para confirmar os valores obtidos pelo método CVE (avaliação de  $\text{CaCO}_3$ ). Foram submetidos a estes provetes estabilizados com OM de 5.2%, 6.8% e 10.3%. Para os teores de 5.2% e 10.3% foi analisado um provete por teor, enquanto que para o teor de 6.8% foram ensaiados seis provetes.

Salienta-se o facto que a análise química se refere a um ponto específico do provete, pelo que a sua extrapolação para a totalidade da amostra é discutível. Os resultados obtidos encontram-se esquematizados no Quadro 5.2.

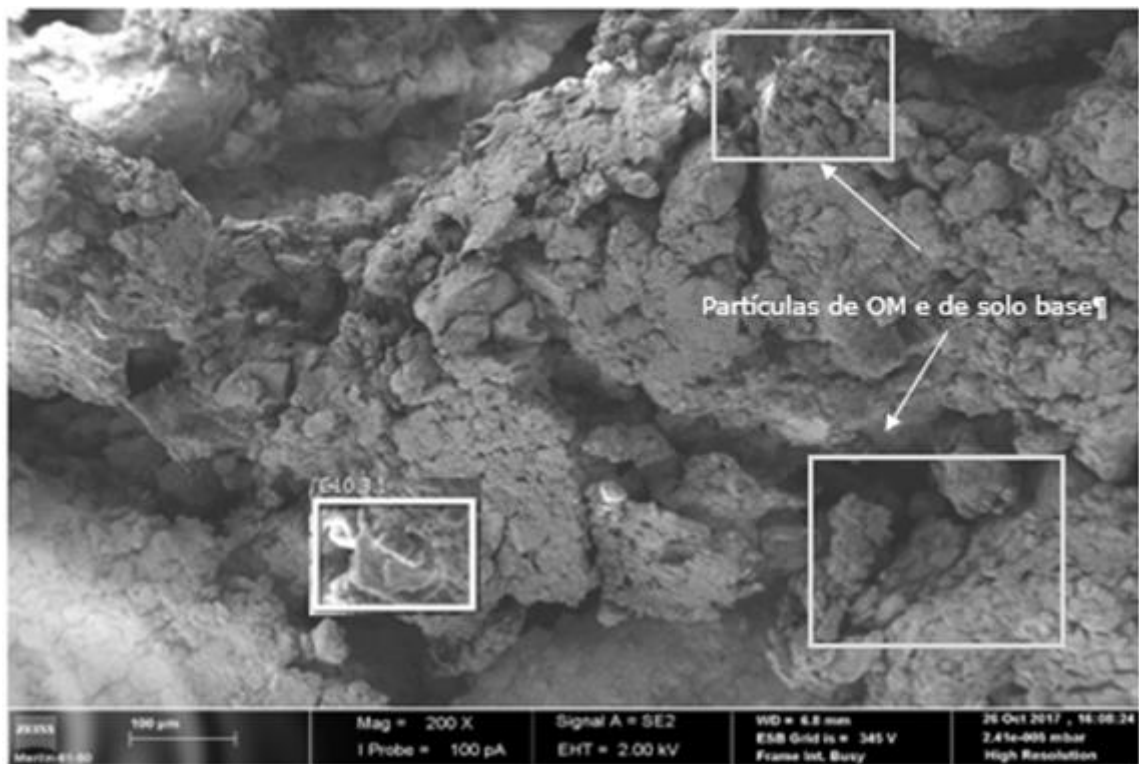
Quadro 5.2 – %CaCO<sub>3</sub> quantificados pelo ensaio SEM

Designação	%OM	%CaCO <sub>3</sub> (SEM)	%CaCO <sub>3</sub> (CVE)
C 6.2.1	5.2	1.8	0.62
C 7(1) 2.1	6.8	1.5	0.86
C 7(1) 2.2	6.8	0.7	0.86
C 7(1) 2.3	6.8	3.4	0.86
C 7(3) 2.1	6.8	0.7	0.79
C 7(2) 2.1	6.8	0.6	0.93
C 7(2) 2.2	6.8	0.5	0.93
C 10 3.1	10.3	1.2	1.7

Quando comparados os resultados obtidos na análise SEM com os resultados medidos pelo método CVE (CO<sub>2</sub> volume evaluation method), as %CaCO<sub>3</sub> medidas no ensaio SEM são superiores às obtidas pelo CVE, contudo estes resultados são referentes a uma pequena área (na ordem dos µm), enquanto que no CVE é medido o precipitado formado na totalidade da amostra.

A Figura 5.12 apresenta uma imagem SEM de um provete estabilizado para OM de 10,3%, com realização de um perfil químico e mapeamento do elemento químico Ca. As restantes imagens, perfis e mapas de dispersão podem ser consultadas no Anexo C.

Analisando o mapa de dispersão verifica-se que o precipitado se formou uniformemente ao longo da amostra, e pelo perfil químico verifica-se há presença de calcite, ou seja, CaCO<sub>3</sub> em quantidades relativas semelhantes às obtidas pelo CVE.



Ca Kα1

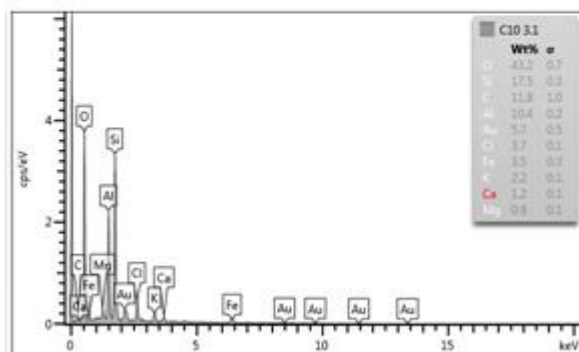
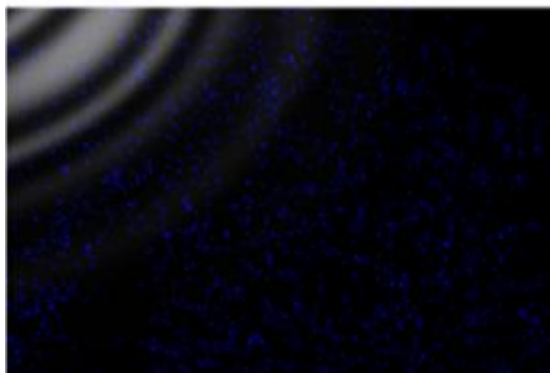


Figura 5.12 – Imagem SEM provete com 10.31% de OM (em cima), Mapa de dispersão de Ca no ponto analisado (em baixo à esquerda), Perfil químico da amostra de solo (em baixo à direita)

## **6 Conclusões e desenvolvimentos futuros**

### **6.1 Conclusões**

O presente trabalho visa estudar a influência do teor de matéria orgânica presente no solo no processo de precipitação de carbono de cálcio por via enzimática. Seguidamente apresentam-se as principais conclusões obtidas.

Contrariamente ao expectável, os provetes não estabilizados mostraram, com o incremento do teor em OM, um ligeiro acréscimo de resistência à compressão não confinada. De facto, os resultados obtidos repercutem a maior apetência dos provetes com maior OM para absorverem água.

A adição de solução estabilizadora originou um aumento de resistência não confinada em relação aos provetes não estabilizados, sendo este feito potenciado com o incremento de OM até cerca de 7%, encontrando-se estes resultados correlacionados com o aumento da precipitação de  $\text{CaCO}_3$  nestes provetes. Estes resultados, sendo não expectáveis, podem ser justificados pelo aumento do coeficiente de permeabilidade associado ao incremento de OM, o que permite que a solução estabilizadora percole melhor pelo solo, conduzindo a um melhor desempenho mecânico do solo estabilizado.

As curvas tensão-extensão de provetes estabilizados apresentam um comportamento mais rígido relativamente aos provetes não estabilizados, em reflexo da precipitação de  $\text{CaCO}_3$  criar ligações entre as partículas de solo, aumentando a rigidez do esqueleto sólido. Contudo o módulo de deformabilidade não varia significativamente com o teor de OM, contrariamente ao que acontecia com a resistência não confinada. Contudo o valor do módulo de deformabilidade é superior nos provetes bioestabilizados, relativamente aos não estabilizados, quando o teor de OM é superior a 5.2%.

Com o aumento do teor de OM o pH também aumenta, sendo que para teores de OM iguais ou superiores a 3% o pH aproxima-se de 8 e para teores de OM iguais ou inferiores a 1.6% o pH varia entre 5 e 6. Como o processo de precipitação de  $\text{CaCO}_3$  é mais eficaz para valores de pH iguais ou ligeiramente superiores a 7, foi obtida uma resistência dos provetes superior para valores de pH próximos de 8.

Com o aumento do teor em matéria orgânica existe uma maior apetência dos solos para reterem água, sendo este facto correlacionável com a menor eficiência do processo de bioestabilização, para elevados teores em matéria orgânica, no que respeita à ductilidade do solo.

## **6.2 Desenvolvimentos Futuros**

Considerando os resultados obtidos neste trabalho e de modo a completar este estudo seria pertinente analisar os seguintes aspetos:

- Utilizar outros métodos de introdução da solução estabilizadora no solo (injeção simples e repetidamente, percolação descendente e ascendente).
- Estudar a aplicabilidade deste método a uma escala maior, aumentando o volume de solo a estabilizar.
- Estudar a variação de  $\text{CaCO}_3$  precipitado com diferentes porosidades.
- Realização de ensaios de corte direto e ensaios triaxiais drenados e não drenados.
- Realização de ensaios edométricos para determinar a deformabilidade de provetes bioestabilizados.
- Estudar os possíveis impactes ambientais do processo de bioestabilização, e forma de os mitigar.
- Estudar a eventual solubilidade do  $\text{CaCO}_3$  após o processo de bioestabilização.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTM D 2166 (2000). “Standard test method for unconfined compressive strength of cohesive soil”. American Society for testing and materials.
- Bazylnski, Dennis A., Frankel, Richard B. (2003). “Biologically controlled Mineralization in Prokaruotes: reviews in Mineralogy an Geochemistry”. 54(1): 217-247.
- Biotechnologia. (2018). Disponível em [pt.wikipedia.org/wiki/Biotecnologia](http://pt.wikipedia.org/wiki/Biotecnologia). Acedido em Janeiro de 2018.
- BS 1377-3 (1990). “Methods of test for soil for Civil engineering purposes – part 3: chemical and electro-chemical tests”. British Standards Institution, London.
- Cardoso, A.S. (1987). “A técnica das pregagens em solos aplicada em escavações – métodos de análise e dimensionamento”. Tese de Doutoramento, FEUP, Porto.
- Carmona, J.P.S.F (2016) “Utilização da biotecnologia para a estabilização de solos: Precipitação de CaCO<sub>3</sub> por via enzimática.”. Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Carmona, J.P.S.F.; Venda Oliveira, P.J.; Lemos, L.J.L.; Pedro, A.M.G. (2018). “Improvement of a sandy soil by enzymatic CaCO<sub>3</sub> precipitation”. ICE – Geotechnical Engineering, Vol.171 (GE1), pp. 3-15. [<https://doi.org/10.1680/jgeen.16.00138>].
- Costa, J.N.P (2012) “Estabilização de solos por via química e biológica”. Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Correia, A.A.S. (2011). “Aplicabilidade da Técnica de Deep Mixing aos Solos Moles do Baixo Mondego”. Tese de Doutoramento, Dep. de Eng<sup>a</sup> Civil da FCTUC, Universidade de Coimbra.



- E 196 (1966). “Solos – Análise Granulométrica”. Especificações do LNEC, Lisboa, Portugal.
- El Correo (1987). “Biotecnologia, agricultura y desarrollo”. Unesco. [unesdoc.unesco.org/images/0007/000730/073033so.pdf](https://unesdoc.unesco.org/images/0007/000730/073033so.pdf)
- Fitolito. (2018). Disponível em <https://es.wikipedia.org/wiki/Fitolito>. Acedido em Fevereiro de 2018.
- Freitas, L.D. (2016) “Utilização da biotecnologia para a estabilização de solos: Precipitação de  $\text{CaCO}_3$  por via enzimática. Influência do tipo de solo”. Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Jones, D.T. and Woods, D.R (1986). "Acetone-Butanol Fermentation Revisited". Department of Microbiology, University of Cape Town, Rondebosch 7700, South Africa.
- Lambe, T.W.; Whitman, R.V. (1969). “Soil Mechanics, SI Version”. Jhon Wiley & Sons, Inc.
- Matos Fernandes, M. (2012) “Mecânica dos solos Conceitos e Princípios Fundamentais, Volume 1”. FEUP Edições, 3ª edição
- McConnaughey and Whelan 1997. Calcification generates protons for nutrient and bicarbonate uptake. *Earth-Science Reviews* 42:95-117
- Nemati, M; Greene, E.A.; Voordow, G. (2003). “Modification of porous media permeability, using calcium carbonate produced enzymatically in situ”. *Enzyme na Microbial Technollogy*; 33: 635-642.
- NP-83 (1965). “Solos – Determinação da densidade das particulas”. Norma Portuguesa Definitiva
- NP EN 12390-1 (2010). “Ensaio do betão endurecido. Parte 1: Forma, dimensões e outros requisitos para o ensaio de provetes e para os moldes”. IPQ.
- Neupane, D.; A. Masce, Yashuara; H. Kinishita N.; Unno, T. (2013). “Applicability of Enzymatic Calcium Carbonate Precipitation as a soil-strengthening Technque”. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*; 139: 2201-2211
-

- Neupane, D.; Yashuara,H.; Kinoshita,N.; Ando,Y. (2015). “Distribution of mineralized carboonate and its quantification method in enzyme mediated calcite precipitation technique”. *Soils and Foundations*, 55(2): 447-457
- Torgal, F.P.; Labrincha, J.A.; Diamanti, M.V.; You, C.-P.; Lee, H.K. (2015). “Biotechnologies and Biominetics for Civil Engineering”. Springer International Publishing, Switzerland.
- UNESCO (2018). Disponível em <http://www.unesco.org/new/en/natural-sciences/science-technology/basic-sciences/life-sciences/biotechnology/> . Acedido em Fevereiro de 2018
- Van Passen, L.A.; Ghose, R.; van der Linden, T.J.M.; van der Star, W.R.L.; van Loosgrecht, M.C.M. (2010). “Potencial soil reinforcement by biological denitrification”. *Ecological Engineering*, 36(2): 168-175.
- Venda Oliveira, P.J. (1992) “Algumas características do comportamento de um solo de baixa plasticidade”. Lisboa
- Venda Oliveira, P.J.; Freitas, L.D.; Carmona J.P.S.F (2016), “Effect of soil tpe on the enzymatic Calcium Carbonate precipitation process used for soil improvement”. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 29(4): 04016263.
- Venda Oliveira, P.J., Costa, M.S., Costa, J.N.P., Nobre, M.F. (2015). “Comparison of the ability of two bactéria to improve the behaviour of a sandy soil”. *Journal of Material in Civil Engineering*, 27(1): 06014025. DOI: 10.1061/(ASCE) MT. 1943-5533.0001138.
- Yashuara, H, Neupane, D. Hayashi, K, Okamura, M. (2012) “Experiments and predictions of physical properties of sand cemented by enzymatically-induced carbonate precipitation”. *Soils Foundaition*, 52 (3): 539-549.

## **OUTRAS REFERÊNCIAS DE UTILIDADE**

- Blakely, R.L. and Zerner, B. (1984). “Jack Bean *Urease*: The First Nickel Enzyme”. *Journal of Molecular Catalysis*, 23(2-3): 263–292.
- Burbank, M., Weaver, T., Lewis, R., Williams, T., Williams, B., and Crawford, R. (2013). “Geotechnical tests of sands following bioinduced calcite precipitation catalyzed by indigenous bacteria”. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering (ASCE)*, 139(6): 928-936.
- Cardoso, E., Tsai, S. & Neves, M. C. (1992). “Microbiologia do solo”. Sociedade Brasileira de ciência do solo. Campinas, SP, pp. 6-72.
- Chang, R. (2005). “Química”. McGraw-Hill, 8ª edição.
- DeJong, J.T., Fritzges, M., and Nüsslein, K. (2006). “Microbially Induced Cementation to Control Sand Response to Undrained Shear”. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering (ASCE)*, 132(11): 1381–1392.
- DeJong, J.T., Mortensen, B. M., Martinez, B.C., and Nelson D.C. (2010). “Bio-mediated soil improvement”. *Ecological Engineering*, 3(2): 196-210.
- DeJong, J.T., Soga, K., Kavazanjian, E., Burns, S., van Paassen, L.A., Al Qabany, A., Aydilek, A., Bang, S.S., Burbank, M., Caslake, L.F., Chen, C.Y., Cheng, X., Chu, J., Ciurli, S., Esnault-Filet, A., Fauriel, S., Hamdan, N., Hata, T., Inagaki, Y., Jefferis, S., Kuo, M., Laloui, L., Larrahondo, J., Manning, D.A.C., Martinez, B., Montoya, B.M., Nelson, D. C., Palomino, A., Renforth, P., Santamarina, J.C., Seagren, E.A., Tanyu, B., Tsesarsky, M., Weaver, T. (2013) “Biogeochemical processes and geotechnical applications: progress, oportunities and challenges”. *Géotechnique*, 63(4): 287-301.
- E 195 (1966). “Solos – Preparação por via seca de amostras para ensaios de identificação”. Especificações do LNEC, Lisboa, Portugal.
-

- Marzadori, C., Miletto, S., Gessa, C. and Ciurli, S., (1998). "Immobilization of jack bean *urease* on hydroxyapatite: *urease* immobilization in alkaline soils". *Soil Biol. & Biochem*, 30(12): 1485-1490.
- Nemati, M; Voordow, G. (2005). "Permeability profile modification using bacterially formed calcium carbonate: comparison with enzymic option". *Process Biochemistry*; 40: 925-933.
- NP-84 (1965). "Solos – Determinação do teor em água". Norma Portuguesa Definitiva.
- NP-143 (1969). "Solos – Determinação dos limites de consistência". Norma Portuguesa Definitiva
- SIGMAALDRICH @ (2017) <http://www.sigmaaldrich.com> , Portugal
- Sondi, I.; Matijević, E. (2001). "Homogeneous precipitation of calcium carbonates by enzyme catalyzed reaction". *Journal of Colloid and Interface Science*, 238(1): 208-214
- Triax [software] Durham, University of Durham, School of Engineer, England.
- Whiffin, V. S. (2004). "Microbial CaCO<sub>3</sub> precipitation for the production of biocement". PhD Thesis. Murdoch University, Perth, Western Australia.

## **ANEXO A**

Quadro A.1 – Percentagem de material passado e retido na peneiração fina do solo argiloso

Peneiro n.º	Malha (mm)	Peso material retido (g)	% material retido	% acumulada de retidos	% acumulada de passados
20	0.850	0.048	0.07	0.07	99.93
40	0.425	0.150	0.23	0.30	99.70
60	0.250	0.296	0.45	0.75	99.25
100	0.150	0.820	1.25	2.00	98.00
200	0.075	3.221	4.90	6.90	93.10
				Resíduo	1.05g

Quadro A.2 – Diâmetros das partículas na sedimentação do solo argiloso

t (min)	Leitura no Densímetro Ls	T (°C)	Leitura corrigida Lc	Zs (cm)	K	D (mm)	% passados
1	1.025	24.0	1.0222	10.6045	0.01264	0.0412	53.15
2	1.025	24.0	1.0222	10.6045	0.01264	0.0291	53.15
5	1.024	24.0	1.0212	10.8743	0.01264	0.0186	50.76
10	1.023	23.5	1.0201	11.1711	0.01272	0.0134	28.13
30	1.021	23.0	1.0180	11.7377	0.01279	0.0080	43.10
60	1.019	23.0	1.0160	12.2773	0.01279	0.0058	38.32
250	1.0165	23.0	1.0135	12.9518	0.01279	0.0029	32.34
1440	1.013	23.0	1.0100	13.8961	0.01279	0.0013	23.97

Antifloculante: 100 cm<sup>3</sup> de solução de hexametáfosfato de sódio ; Correção do antifloculante, C<sub>A</sub>: 0.004078  
Correção do menisco, C<sub>M</sub>: 0.0005 ; Densidade das partículas, G: 2.75

Quadro A.3 – Percentagem de material passado e retido na peneiração grossa do solo orgânico de base

Peneiro n.º	Malha (mm)	Peso material retido (g)	% material retido	% acumulada de retidos	% acumulada de passados
2"	50	0	0.00	0.00	100.00
1"1/2	37.5	0	0.00	0.00	100.00
1"	25	0	0.00	0.00	100.00
3/4"	19	0	0.00	0.00	100.00
1/2"	12.5	0	0.00	0.00	100.00
3/8"	9.5	0	0.00	0.00	100.00
4	4.75	0	0.00	0.00	100.00
10	2	6.648	16.24	16.24	83.76
Massa usada na peneiração fina					34.38 g

Quadro A.4 – Percentagem de material passado e retido na peneiração fina do solo orgânico de base

Peneiro n.º	Malha (mm)	Peso material retido (g)	% material retido	% acumulada de retidos	% acumulada de passados
20	0.850	9.546	27.76	27.76	60.50
40	0.425	10.152	29.53	57.29	35.77
60	0.250	5.032	14.64	71.93	23.51
100	0.150	3.751	10.91	82.84	14.38
200	0.075	3.318	9.65	92.49	6.29
Resíduo					1.98 g

Quadro A.5 – Massas e densidades das partículas do solo argiloso

n.º. Picnómetro		85	95	96
Picnómetro (g)	- m1	38.549	36.266	32.006
Picn. + água (g)	- m2	134.164	132.685	130.396
Picn. + solo seco (g)	- m4	62.520	65.120	65.120
Picn. + água + solo (g)	- m5	149.417	151.543	151.543
Solo (g)		23.971	28.854	33.114
G		2.7373	2.8647	2.7570
G médio		2.75		

Quadro A.6 – Teor de Humidade e N° de pancadas para cada provete

Cápsula N°		4	79	38	15	81	126	102
Peso da cápsula	(g)	19.811	15.615	19.806	19.746	15.531	10.634	10.635
P. cáps. + Solo húmido	(g)	24.706	23.018	26.621	26.469	22.756	16.118	16.795
P. cáps. + Solo seco	(g)	22.988	20.442	24.330	24.164	20.315	14.314	14.581
Peso de água	(g)	1.72	2.58	2.29	2.31	2.44	1.80	2.21
Peso de solo seco	(g)	3.18	4.83	4.52	4.42	4.78	3.68	3.95
<i>Teor de Humidade</i>	(%)	54.1	53.4	50.6	52.2	51.0	49.0	56.1
<i>N° de Golpes</i>		34	23	38	24	33	46	19

Quadro A.7 – Cálculo do limite de plasticidade de cada provete

Cápsula N°		127	123	120	107
Peso da cápsula	(g)	10.645	10.634	10.621	10.661
P. cáps. + Solo húmido	(g)	18.580	15.593	16.518	17.094
P. cáps. + Solo seco	(g)	17.151	14.694	15.418	15.926
Peso de água	(g)	1.43	0.90	1.10	1.17
Peso de solo seco	(g)	6.51	4.06	4.80	5.27
<i>Teor de Humidade</i>	(%)	22.0	22.1	22.9	22.2
<i>Teor de Humidade Médio</i>	(%)	22.3			

Quadro A.8 – Teor em matéria orgânica do solo argiloso

Cápsula N°	Solo Argila siltosa			
	112	107	127	121
Peso da cáps. (g)	10.530	10.659	10.645	10.322
massa antes da secagem	46.704	39.964	34.377	41.806
massa seca a 50°C	45.878	39.361	33.894	41.078
massa seca a 400°C	45.287	38.886	33.521	40.544
Teor em OM (%)	1.672	1.655	1.604	1.736
Teor em OM médio (%)	1.64			

Quadro A.9 – Teor em matéria orgânica do solo orgânico de base

Cápsula N°	Solo Orgânico			
	72	117	123	120
Peso da cáps. (g)	15.667	10.392	10.588	10.603
massa antes da secagem	34.733	31.283	30.880	30.553
massa seca a 50°C	29.252	25.854	25.252	25.223
massa seca a 400°C	24.152	19.874	19.860	19.152
Teor em OM (%)	37.541	38.675	36.770	41.525
Teor em OM médio (%)	37.66			

## **ANEXO B**

Quadro B.1 - Variação da tensão máxima de rotura com o aumento do teor de OM no solo

%OM teórica	%OM real	Q <sub>umax</sub>	
		Não estabilizado	Estabilizado
0	0.00	100.59	146.48
1.6	1.73	100.66	91.58
3	3.00	100.33	135.61
4.5	4.50	91.55	161.14
6	5.18	133.98	182.89
7	6.85	137.94	169.26
8	8.93	121.36	195.88
10	10.31	100.74	196.63
12.5	11.30	114.41	190.00

Quadro B.2 - Variação do Eu<sub>50</sub> com o teor de OM nos provetes

%OM teórica	%OM real	Eu <sub>50</sub>	
		Não Estabilizado	Estabilizado
0	0.00	6.79	7.82
1.6	1.73	4.02	2.37
3	3.00	3.49	2.38
4.5	4.50	3.90	3.02
6	5.18	4.96	5.11
7	6.85	8.42	12.43
8	8.93	3.33	4.64
10	10.31	2.65	3.98
12.5	11.30	6.40	5.77



Quadro B.3 - Variação de Eu50 com o teor de CaCO<sub>3</sub>

CaCO <sub>3</sub> (%)	E <sub>50</sub>
	Estabilizado
-0.04	7.82
0.00	2.37
0.08	2.38
0.30	3.02
0.60	5.11
0.41	12.43
1.67	4.64
1.70	3.98
1.33	5.77

Quadro B.4 - Variação do teor de CaCO<sub>3</sub> em função do teor de OM

%OM teórica	%OM real	CaCO <sub>3</sub> (%)	
		Não Estabilizado	Estabilizado
0	0.00		-0.04
1.6	1.73	0.01	0.00
3	3.00		0.08
4.5	4.50		0.30
6	5.18	0.12	0.60
7	6.85		0.41
8	8.93		1.67
10	10.31		1.70
12.5	11.30		1.33

Quadro B.5 - Variação da tensão máxima de rotura em função do teor CaCO<sub>3</sub>

CaCO <sub>3</sub> (%)	Q <sub>umax</sub>	CaCO <sub>3</sub> (%)	Q <sub>umax</sub>
	Não Estabilizado		Estabilizado
		-0.04	146.48
0.01	100.66	0.00	91.58
		0.08	135.61
		0.30	161.14
0.12	133.98	0.60	182.89
		0.41	169.26
		1.67	195.88
		1.70	196.63
		1.33	190.00

Quadro B.6 - Variação do valor de pH com a variação do teor de OM

%OM teórica	%OM real	pH	
		Não Estabilizado	Estabilizado
0	0.00	5.06	5.06
1.6	1.73	6.65	6.15
3	3.00		7.65
4.5	4.50		7.86
6	5.18		
7	6.85	7.40	8.00
8	8.93	7.70	7.94
10	10.31	7.71	7.86
12.5	11.30		

Quadro B.7 - Variação do pH com o aumento do precipitado

CaCO <sub>3</sub> (%)	pH	
	Estabilizado	
-0.04	5.06	
0.00	6.15	
0.08	7.65	
0.30	7.86	
1.67	7.94	
1.70	7.86	

Quadro B.8 - Variação do teor em água com o teor de OM em cada provete

%OM teórica	%OM real	W (%)	
		Não Estabilizado	Estabilizado
0	0.00	18.37	18.18
1.6	1.73	22.21	21.35
3	3.00	21.16	21.73
4.5	4.50	21.76	23.00
6	5.18	24.30	25.56
7	6.85	21.51	23.32
8	8.93	28.48	28.31
10	10.31	29.79	29.90
12.5	11.30	33.19	31.55

## ANEXO C

Figura C.1 - Imagem SEM e respetivo perfil químico para cada provete estabilizada, com 3% de OM

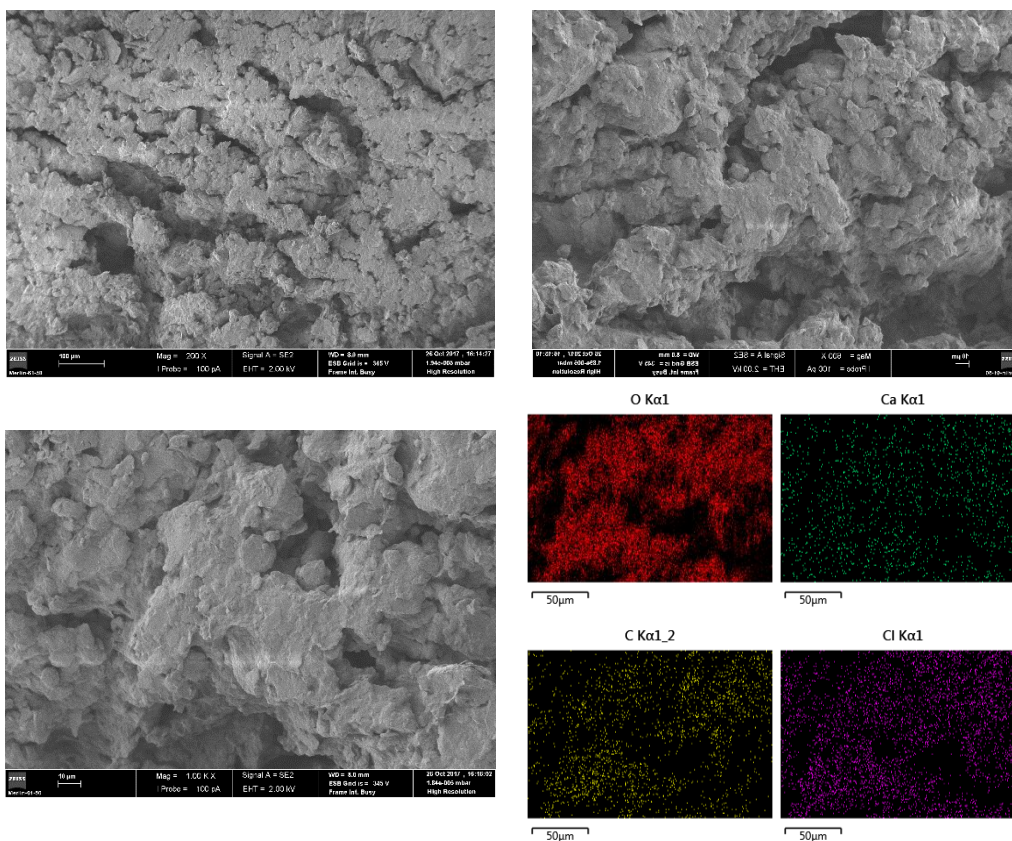


Figura C.2 - Imagem SEM e respetivo perfil químico para cada provete estabilizada, com 5.18% de OM

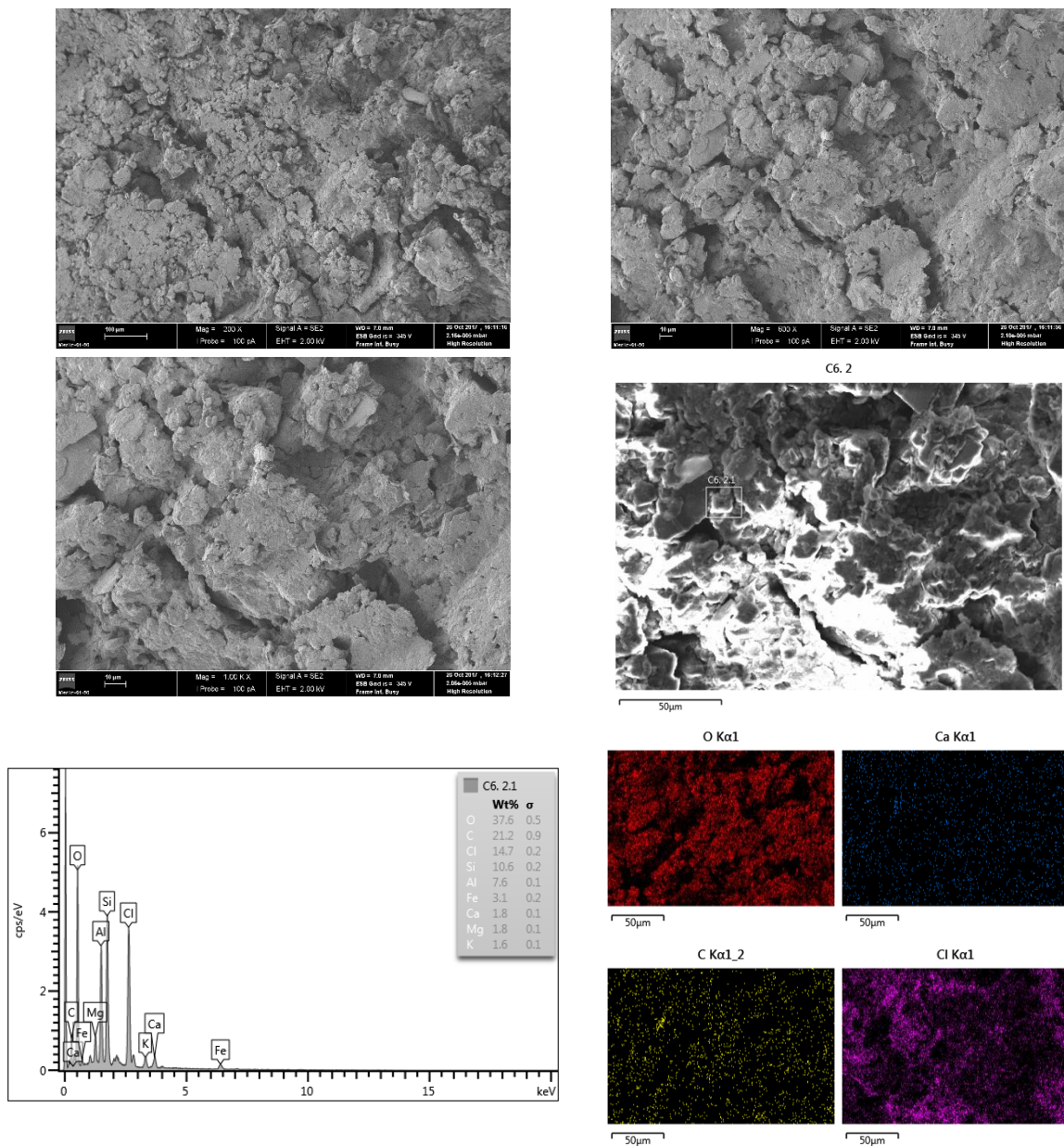


Figura C.3 - Imagem SEM e respetivo perfil químico para cada provete estabilizada, com 6.85% de OM

