BIOESTABILIZAÇÃO DE UM SOLO ARENOSO POR INTERMÉDIO DA PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO POR VIA ENZIMÁTICA

BIOSTABILIZATION OF A SANDY SOIL THROUGH ENZYMATIC CALCIUM CARBONATE PRECIPITATION

Carmona, João P. S. F.; *FCTUC, Coimbra, Portugal, jp_carmona@hotmail.com*
Venda Oliveira, Paulo J.; *FCTUC, Coimbra, Portugal, pjvo@dec.uc.pt*
Lemos, Luís J. L.; *FCTUC*, *Coimbra*, *Portugal*, *llemos@dec.uc.pt*

RESUMO

Neste trabalho apresentam-se os resultados de uma investigação laboratorial que visa analisar os ganhos de resistência e rigidez de um solo arenoso, através da precipitação de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) por via enzimática (bioestabilização). O volume de solução estabilizadora corresponde ao teor em humidade ótimo do ensaio Proctor normal (w=12%) contendo, para além de água, ureia $[CO(NH_2)_2]$, cloreto de cálcio ($CaCl_2$) e a enzima *urease*. Com base em ensaios de compressão uniaxial não confinada (UCS) este trabalho estuda o efeito da concentração equimolar de ureia-$CaCl_2$, de enzima *urease* e do tempo de cura, na resistência e rigidez do material estabilizado. Constata-se a duplicação da resistência e rigidez do solo devido ao efeito da bioestabilização, em provetes preparados com 4 kU/L de *urease*, 0,75 mol/L de ureia-$CaCl_2$ e com um tempo de cura de 28 dias.

ABSTRACT

This paper presents the results of a laboratory investigation that aims to analyse the effect on the strength and stiffness of a sandy soil, through enzymatically-induced calcium carbonate precipitation ($CaCO_3$) (biostabilization). The volume of stabilizer solution corresponds to the optimum moisture content evaluated from normal Proctor test (w=12%), which is composed by water, urea ($CO(NH_2)_2$), calcium chloride ($CaCl_2$) and the *urease* enzyme. Based on unconfined compressive strength tests (UCS), it is studied the effect of equimolar concentration of urea-$CaCl_2$, the *urease* enzyme and curing time, on the strength and stiffness of the stabilised material. It is observed the double of the strength and stiffness of the biostabilised soil in samples prepared with 4 kU/L *urease*, 0.75 mol/L urea-$CaCl_2$ and 28 days of curing time.

1 - INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, associado ao aumento de qualidade de vida e ao desenvolvimento da sociedade, tem levado à ocupação de maciços terrosos, outrora não recomendados para a construção. Para viabilizar a utilização destas formações geotécnicas, é necessário promover o melhoramento e/ou reforço destes solos, de modo a garantir o seu bom comportamento mecânico e hidráulico. Investigações recentes têm mostrado que a biotecnologia pode, no futuro, ser também utilizada para promover a estabilização dos solos, contribuindo, em paralelo, para a minimização dos impactes ambientais.

A biotecnologia é definida como a aplicação de princípios científicos e de engenharia para o processamento de materiais, através de agentes biológicos, para fornecer produtos e serviços (Bull *et al.*, 1982). A interdisciplinaridade entre biologia, química e engenharia civil tem permitido o desenvolvimento de técnicas de estabilização de solos com recurso à biotecnologia, processo este denominado por bioestabilização ou biocalcificação. De acordo com DeJong *et al.* (2013) o aproveitamento de processos biológicos nos solos promete ser a próxima prática revolucionária na engenharia geotécnica.

Em geral, a bioestabilização é obtida através da precipitação de $CaCO_3$ por hidrólise da ureia, descrita pelas equações químicas 1 a 6 (Hammes *et al.*, 2003). A enzima *urease* catalisa a hidrólise da ureia $[CO(NH_2)_2]$, originando uma molécula de amónia e uma de ácido carbâmico (Equação 1). Este último decompõe-se espontaneamente formando uma mole adicional de amónia e uma mole de ácido carbónico (Equação 2), o qual se decompõe em ião bicarbonato e ião hidrogénio (Equação 3). As moléculas de amónia dão origem a iões amónio e hidróxido (Equação 4). Este último promove um aumento do pH, permitindo a formação de iões carbonato (Equação 5).

$$CO(NH_2)_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Enzima } urease} NH_3 + NH_2COOH \quad [1]$$

$$NH_2COOH + H_2O \longrightarrow NH_3 + H_2CO_3 \quad [2]$$

$$H_2CO_3 \longleftrightarrow HCO_3^- + H^+ \quad [3]$$

$$2NH_3 + 2H_2O \longleftrightarrow 2NH_4^+ + 2OH^- \quad [\uparrow pH] \quad [4]$$

$$HCO_3^- + H^+ + 2NH_4^+ + 2OH^- \longleftrightarrow CO_3^{2-} + 2NH_4^+ + 2H_2O \quad [5]$$

Estando os iões carbonato na presença de iões de cálcio, a produção de carbonato de cálcio inicia-se espontaneamente (Chou *et al.*, 2011), pela equação 6.

$$Ca^{2+} + CO_3^{2-} \longleftrightarrow CaCO_3(s) \quad [6]$$

O carbonato de cálcio pode apresentar três formas de cristais, denominadas calcite, aragonite e vaterite (Al-Thawadi, 2011).

A bioestabilização compreende a formação de pontes de ligação de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) entre as partículas de solo, aumentando a resistência e rigidez do material (Chou *et al.*, 2011), com um resultado semelhante à cimentação natural (Al-Thawadi, 2011). Por outro lado, a deposição de $CaCO_3$ promove o preenchimento dos poros do material levando a uma diminuição da porosidade (Whiffin *et al*., 2007) e da condutividade hidráulica do solo (Al Qabany e Soga, 2013; Yasuhara *et al*., 2012), além de contribuir para a redução do seu potencial de liquefação (DeJong *et al*., 2010).

A precipitação de $CaCO_3$ por hidrólise de ureia é um processo químico governado essencialmente por quatro fatores: concentração de cálcio, concentração de carbono inorgânico dissolvido, pH do meio e disponibilidade de locais de nucleação (Hammes e Verstraete, 2002).

Existem várias aplicações práticas da biocalcificação em engenharia, entre as quais se destacam a proteção e restauração de monumentos de calcário (Tiano *et al.*, 1999), a remoção de contaminantes de águas freáticas (Fujita *et al.*, 2000), a produção de argamassas biológicas (De Muynck *et al.*, 2008) ou o preenchimento de poros em reservatórios rochosos destinados a armazenamento de petróleo (Nemati e Voordouw, 2003).

Na bioestabilização por hidrólise da ureia, a enzima *urease* pode ser obtida por via microbiológica (Whiffin *et al*., 2007; Venda Oliveira *et al*., 2015) ou por via enzimática (Yasuhara *et al*., 2012; Neupane *et al*., 2013).

Os trabalhos laboratoriais que envolvem a bioestabilização por via microbiológica, passam pela introdução exógena de bactérias (*Sporosarcina pasteurii*, *Idiomarina insulisalsae,* etc.) no processo de precipitação de $CaCO_3$ (Whiffin *et al*., 2007; Venda Oliveira *et al*., 2015), capazes de produzir a enzima *urease,* requerida na reação química. Como obstáculos desta via, são apontadas a variação da produção de *urease* por parte dos microrganismos (Whiffin, 2004) e a sua aplicação em solos finos ser limitada (van Paassen, 2009), visto as bactérias terem um tamanho de 0,5 a 5 μm, idêntico às partículas de solos finos (Mitchell e Santamarina, 2005).

De maneira a contornar as complexidades de cultivação e armazenamento de bactérias (Hamdan *et al*., 2013), um processo alternativo é estudado neste trabalho, onde se substitui o uso de microrganismos pela adição direta da enzima *urease* (Yasuhara *et al*., 2012; Neupane *et al*., 2013, 2015), a qual pode ser encontrada em diversas bactérias, fungos e plantas (Al-Thawadi, 2011), designadamente numa espécie de feijão tropical, *Canavalia Ensiformis.* A via enzimática é assim um processo mais simples de promover a precipitação de $CaCO_3$ (Yasuhara *et al*., 2012), como forma de alcançar uma melhoria uniforme das propriedades mecânicas do solo (Neupane *et al*., 2015). Por outro lado, o tamanho da enzima *urease* é da ordem de 12 nm (Blakely e Zerner, 1984), o que sugere que a aplicação desta técnica se possa também estender a solos finos (Hamdan *et al*., 2013).

Neste trabalho apresentam-se os resultados laboratoriais da bioestabilização de um solo arenoso por via enzimática, adicionando um volume de solução estabilizadora (constituída por água, ureia, cloreto de cálcio e a enzima *urease*) equivalente ao teor ótimo de compactação obtido no ensaio Proctor normal. A avaliação da resistência e rigidez do material é efetuada com base em ensaios de compressão uniaxial não confinada (UCS).

Para a definição das condições base (concentração de reagentes, dosagem de *urease*, tempo de cura, etc.) a utilizar nos provetes com solo, foi previamente efetuado um estudo em tubos de ensaio sem solo, tendo-se quantificado a massa de $CaCO_3$ precipitado para diferentes dosagens de *urease*, reagentes e diversos tempos de reação. As condições base correspondem a 4 kU/L de *urease*, 0,75 mol/L de concentração equimolar de ureia-$CaCl_2$ e 14 dias de cura (Carmona, 2016).

2 - CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

2.1 - Solo natural

O solo em estudo foi extraído na região de Leiria. A composição granulométrica, E196 (1966), indica que o solo é composto por 2,3% de argila, 3,5% de silte, 78,7% de areia e 15,5% de cascalho. Pela norma ASTM D 2487 (1998), a classificação unificada remete para uma areia mal graduada com silte e cascalho, designado por SP-SM com cascalho. A densidade das partículas sólidas (G_s), pela norma NP-83 (1965), toma o valor de 2,71. O ensaio de compactação, de acordo com a especificação E197 (1966), aplicando a compactação leve em molde pequeno, remete para um teor ótimo em humidade (w_{opt}) de 12% e um peso volúmico seco máximo ($\gamma_d^{máx}$) de 17,3 kN/m^3. O teor em matéria orgânica (OM), realizado pelo método de ignição aplicado ao intervalo de temperaturas 50º-400º, indica um valor de 0,34%. A medição do pH do solo natural, com base na norma BS 1377-3 (1990) indica que se trata de um solo alcalino, com pH de 8,4. O Quadro 1 resume a caracterização geotécnica do solo em estudo.

Quadro 1 – Caracterização geotécnica do solo natural

Granulometria (%)	G_s (-)	w_{opt} (%)	$\gamma_d^{máx}$ (kN/m^3)	OM (%)	pH
Argila ≈ 2,3% Silte ≈ 3,5% Areia ≈ 78,7% Cascalho ≈ 15,5%	2,71	8	17,3	0,34	8,4

2.2 - Constituintes da solução estabilizadora

Os produtos envolvidos na precipitação de $CaCO_3$ adicionados ao solo no processo de bioestabilização desempenham um papel primordial, uma vez que desencadeiam interações de natureza física, química e biológica com as partículas de solo, conduzindo à alteração do comportamento mecânico do material daí resultante. A solução estabilizadora é assim composta por água, ureia, $CaCl_2$ e *urease*:

- A água foi destilada em laboratório a partir da rede pública.
- A ureia, $CO(NH_2)_2$, oriunda da companhia *Acros Organics*, é utilizada como fonte de iões carbonato, tendo uma pureza de 99,5% e uma massa molar de 60,06 g/mol.
- O cloreto de cálcio, $CaCl_2$, proveniente da companhia *Applichem Panreac*, é utilizado como fonte de iões de cálcio e tem uma pureza de 95% e uma massa molar de 110,99 g/mol.
- A enzima *urease*, introduzida para promover a hidrólise da ureia, é proveniente da companhia *Sigma-Aldrich*. De acordo com a informação do produto, o valor ótimo de pH é 7,4, a temperatura ótima é 60ºC, e a temperatura de armazenamento deve estar no intervalo 5º±3ºC. O lote utilizado neste estudo tem a referência U1500 e tem uma atividade de 34310 U/g (1 U origina a libertação de 1,0 µmol de NH_3 por minuto, a 25ºC e com um pH de 7,0). As instruções de preparação do produto remetem para a colocação de *urease* com uma concentração de 10 mg/mL numa solução tampão de fosfato de sódio 0,2 M, permitindo manter a solução com um pH na faixa ideal, próximo de 7.

3 - PROCEDIMENTO LABORATORIAL DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os provetes de solos reproduzidos neste estudo são cilíndricos com 37 mm de diâmetro e 76 mm de altura, correspondendo a uma relação entre a altura e o diâmetro de 2:1, estando de acordo com a norma NP EN 12390-1 (2010). Para o referido diâmetro do provete, a máxima dimensão das partículas de solo deve ser inferior a 3,35 mm (Head, 1982), pelo que se adotou a fração de solo passada no peneiro ASTM de malha quadrada 2 mm (nº10), ao qual corresponde 84,5% da fração granulométrica total, descrita em 2.1.

O procedimento de ensaio seguiu as seguintes etapas:

i) Pesagem de 180 g de solo seco.

ii) Preparação de uma solução aquosa estabilizadora composta por uma determinada concentração equimolar de ureia-$CaCl_2$ e de *urease*. O volume da solução adotado é equivalente ao teor em água ótimo do ensaio Proctor normal (descrito em 2.1).

iii) Mistura manual com uma espátula do solo com a solução aquosa, garantindo a sua homogeneidade.

iv) Preparação de moldes de PVC para execução dos provetes de solo, colocando uma camada fina de vaselina nas paredes interiores de maneira a facilitar a extração do provete de solo após cura. O molde é colocado sobre uma base rígida, sendo instalada uma alonga na abertura superior deste, para evitar desperdícios de material.

v) Compactação dos provetes com 8 camadas e 4 pancadas por camada, de modo a obter o peso volúmico seco máximo do ensaio Proctor normal (referido em 2.1).

vi) Colocação dos provetes dentro de um saco plástico, por forma a manter o teor em água durante o tempo de cura, ficando armazenados numa câmara termohigrométrica (temperatura de 20º±2ºC e humidade relativa de 95±5%).

vii) Após o tempo de cura definido no programa de ensaios, a resistência mecânica dos provetes de solo é avaliada com base em ensaios UCS, executados com uma velocidade de corte de 1%/min referido à altura da amostra.

Na Figura 1 apresenta-se um esquema ilustrativo do procedimento de preparação dos provetes de solo.

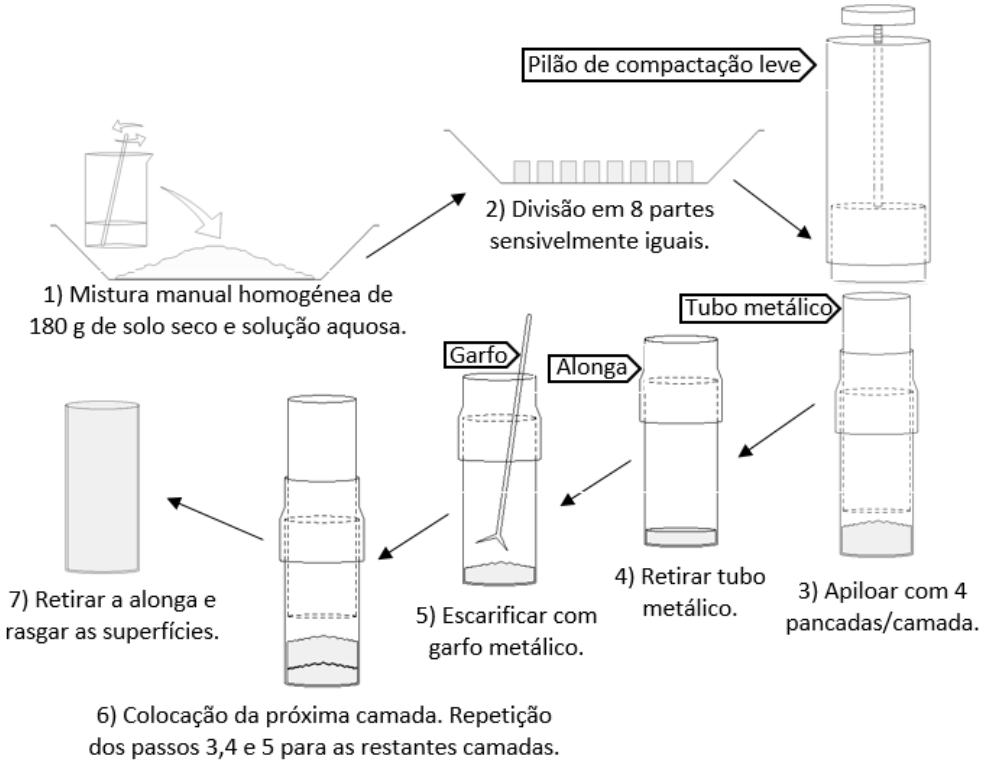


Figura 1 – Esquema ilustrativo do procedimento de compactação dos provetes

4 - PROGRAMA DE ENSAIOS

No Quadro 2 apresenta-se o programa de ensaios UCS efetuado. Os ensaios laboratoriais estão divididos em três subplanos, de maneira a estudar a variação da concentração equimolar de reagentes (ureia-$CaCl_2$), da dosagem de enzima *urease* e do tempo de cura. Para cada condição foram efetuados dois provetes, de modo a garantir a reprodutibilidade e a fiabilidade dos resultados.

5 - ANÁLISE DE RESULTADOS

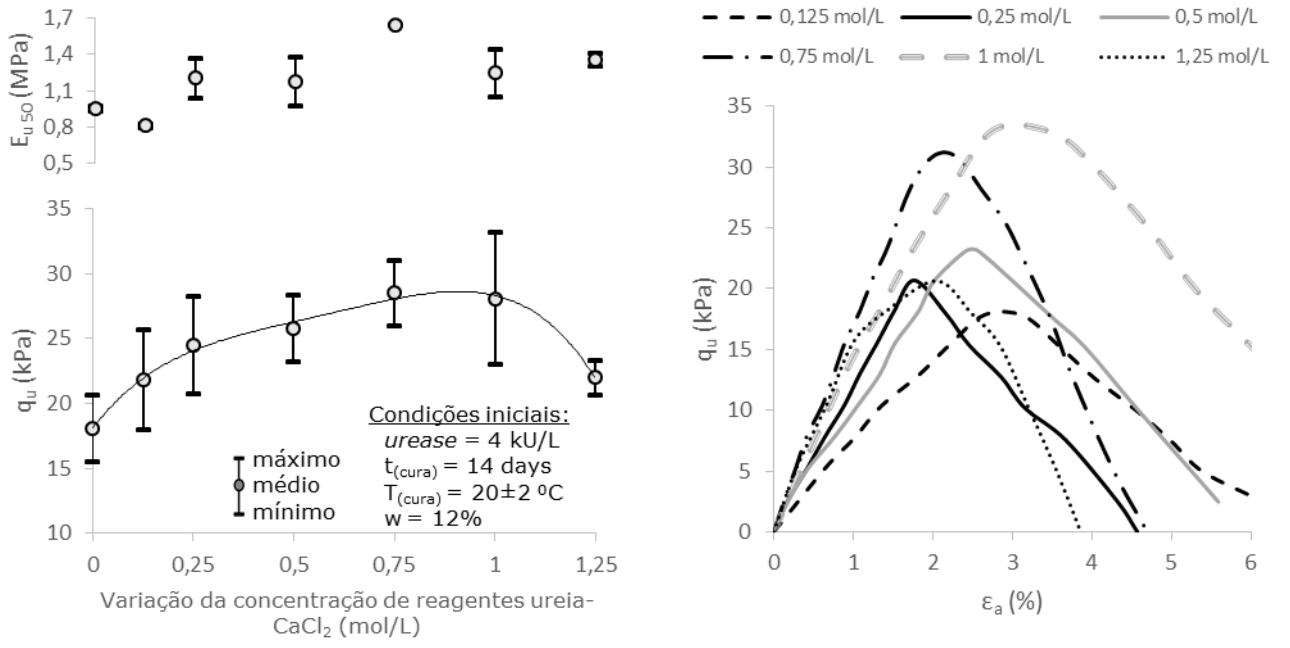
Nesta secção apresentam-se e analisam-se os resultados experimentais dos ensaios UCS, estabelecidos no programa de ensaios descrito no item 4. Para cada subplano em estudo apresentam-se a resistência à compressão não confinada na rotura (q_u) e o módulo de deformabilidade para 50% da carga de rotura (E_{u50}). São também apresentadas as curvas de tensão-extensão axial, estando representada apenas uma curva para cada combinação realizada, de forma a tornar a leitura gráfica mais simplificada.

Quadro 2 – Programa de ensaios para realização de provetes bioestabilizados

Subplano	Concentração ureia-$CaCl_2$ (mol/L)	Concentração *urease* (kU/L)	Tempo de cura (dias)
Variação da concentração equimolar de reagentes	0,125	4	14
	0,250	4	14
	0,500	4	14
	0,750	**4**	**14**
	1,000	4	14
	1,250	4	14
Variação da quantidade de *urease*	0,75	2	14
	0,75	**4**	**14**
	0,75	8	14
	0,75	12	14
	0,75	24	14
Variação do tempo de cura	0,75	4	1
	0,75	4	3
	0,75	4	7
	0,75	**4**	**14**
	0,75	4	21
	0,75	4	28

5.1 - Variação da concentração equimolar de reagentes

Na Figura 2 apresentam-se os resultados experimentais que ilustram a influência da variação da concentração equimolar de ureia-$CaCl_2$, mantendo contantes os restantes parâmetros (4 kU/L de *urease* e 14 dias de cura).



a) b)

Figura 2 – Ensaios UCS - influência da variação da concentração equimolar de ureia-$CaCl_2$
a) Evolução de q_u e E_{u50}. b) Curvas tensão-extensão axial

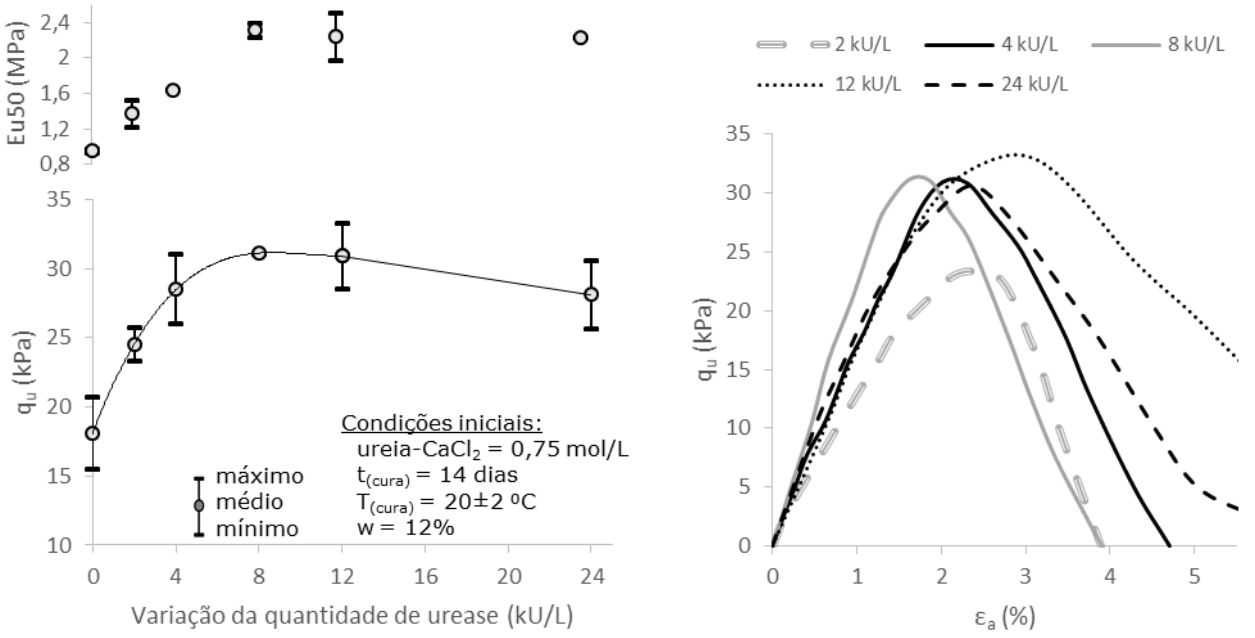
A influência da concentração de ureia-$CaCl_2$ no comportamento mecânico do solo bioestabilizado (Figura 2a) mostra, em termos médios, uma melhoria de resistência e rigidez até uma concentração de 0,75 mol/L, decrescendo após 1 mol/L. A existência de maior resistência e rigidez para 0,75 mol/L de ureia-$CaCl_2$ está, eventualmente, associada a uma maior produção de $CaCO_3$, que promove o incremento das ligações entre as partículas.

Na Figura 2b estão representadas as curvas de tensão-extensão axial, observando-se que a variação da concentração de ureia-$CaCl_2$ não origina alterações significativas ao nível do comportamento tensão-

deformação, registando-se em todos os provetes uma descida pronunciada da resistência pós-pico para valores nulos.

5.2 - Variação da quantidade de *urease*

Na Figura 3 apresentam-se os resultados que retratam a influência da variação da quantidade de *urease* na resistência e no módulo de deformabilidade, mantendo constante os restantes parâmetros (0,75 mol/L de ureia-$CaCl_2$ e 14 dias de cura).



a) b)

Figura 3 - Ensaios UCS - influência da variação da quantidade de *urease:* a) Evolução de qu e Eu50 com a quantidade de *urease*. b) Curva tensão-extensão axial

Em termos gerais, na Figura 3a observa-se com o aumento da quantidade de *urease* o incremento da tensão última e da rigidez até 8 kU/L de *urease*, seguindo-se um patamar aproximadamente horizontal ou uma ligeira descida (para q_u). Estes resultados mostram a utilização de 8 kU/L de *urease* maximiza a bioestabilização nas condições de ensaio, não existindo repercussão positiva com o aumento da dosagem de *urease*, muito possivelmente por escassez dos restantes reagentes (ureia e $CaCl_2$), os quais se mantiveram constantes nos diversos do presente subplano.

As curvas tensão-extensão axial (Figura 3b) são semelhantes em todos os provetes, evidenciando a existência de um trecho linear elástico até à rotura, seguindo de uma descida progressiva da capacidade resistente, em resultado da degradação da biocimentação.

5.3 - Variação do tempo de cura

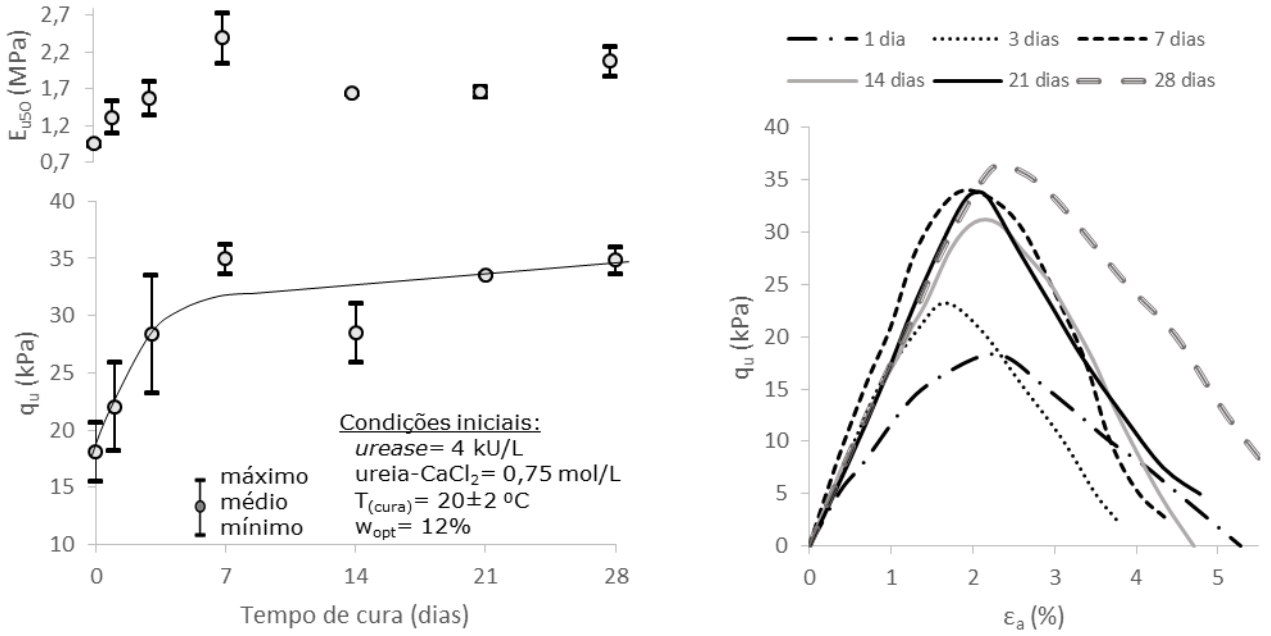
Na figura 4 apresentam-se os resultados que ilustram o efeito da variação do tempo de cura no processo de bioestabilização, mantendo-se constante a concentração de ureia-$CaCl_2$ (0,75 mol/L) e *urease* (4 kU/L). Na Figura 4a, constata-se um aumento notório de resistência mecânica nos primeiros sete dias, observando-se posteriormente uma tendência crescente, mas menos acentuada, até aos 28 dias de cura. Na Figura 4b estão representadas as curvas de tensão-extensão axial do presente subplano, revelando um comportamento semelhante ao descrito nos subplanos anteriores.

5.4 - Apresentação do pH dos planos de ensaios

Na Figura 5 apresentam-se os valores de pH dos provetes de solo bioestabilizados, medidos após os ensaio UCS. Na Figura 5a observa-se com o aumento da concentração de ureia-$CaCl_2$ a diminuição do valor de pH, relativamente ao solo natural (pH). Por outro lado, no caso da concentração de ureia-$CaCl_2$ ser constante (Figura 5b) observa-se um aumento da resistência à compressão não confinada com a acidificação do solo (diminuição de pH).

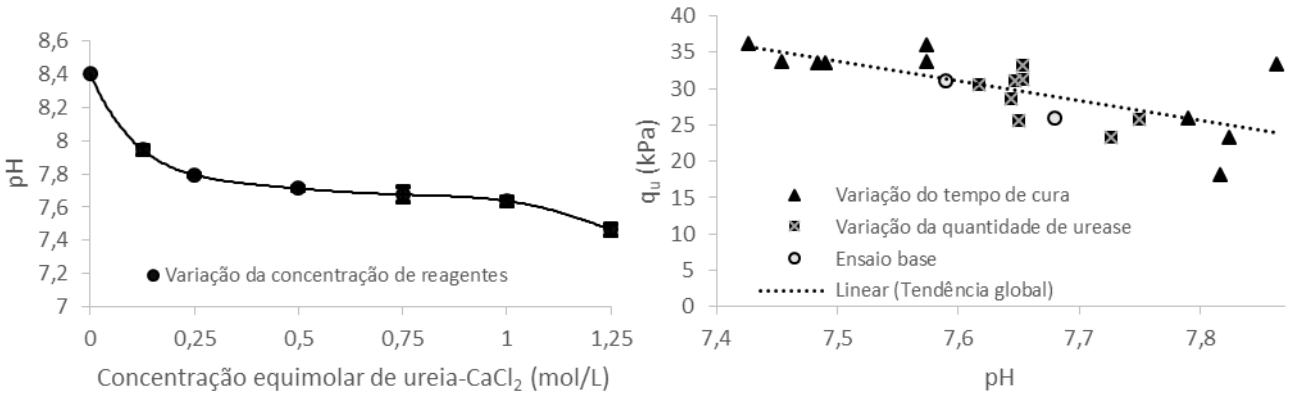
Apesar de a curto prazo o valor de pH tender a aumentar (equação 4), a longo prazo regista-se a sua diminuição (Figura 5), podendo estar relacionada com as reações entre os iões amónio e cloreto que produzirem cloreto de amónio, NH_4Cl, que possui um carácter mais ácido, levando a uma posterior redução

do pH do solo. Desta forma, pode concluir-se que a redução de pH está associada (embora de forma indireta) ao incremento da degradação da ureia, potenciando a precipitação de $CaCO_3$ e, naturalmente, o incremento de resistência e rigidez.



a) b)

Figura 4 - Ensaios UCS - influência da variação do tempo de cura: a) Evolução de qu e Eu50.
b) Curvas tensão-extensão axial



a) b)

Figura 5 – Variação do pH. a) Variação da quantidade de ureia-$CaCl_2$.
b) Variação q_u–pH (Concentração de ureia-$CaCl_2$ constante)

6 - CONCLUSÕES

Do presente trabalho podem retirar-se as seguintes conclusões:

- A concentração de ureia-$CaCl_2$ de 0,75 mol/L otimiza a resistência e rigidez do solo estabilizado.
- A dosagem de enzima *urease* de 8 kU/L potencia o efeito da bioestabilização.
- Os aumentos da resistência à compressão não confinada e da rigidez são mais significativos durante a primeira semana de cura, seguindo um patamar crescente, mas menos acentuado.

- O processo de precipitação de carbonato de cálcio provoca um decréscimo nos valores de pH a longo prazo, facto associado a uma maior degradação da ureia, o que potencia a precipitação de $CaCO_3$.

- O procedimento de bioestabilização utilizado, apesar de originar uma melhoria no comportamento mecânico dos provetes, remete para valores de aumento de resistência e rigidez pouco significativos do ponto de vista prático, talvez devido ao volume de solução estabilizadora ser também reduzido. No futuro, será necessário estudar o efeito do aumento do volume de solução estabilizadora, de maneira a induzir um maior ganho de resistência mecânica, que seja competitivo com o obtido com outras técnicas de melhoramento de solos.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de expressar os seus agradecimentos às instituições que suportaram financeiramente esta investigação: ISISE (UID/ECI/04029/2013) e ACIV.

REFERÊNCIAS

Al Qabany, A., e Soga, K. (2013). Effect of chemical treatment used in MICP on engineering properties of cemented soils. Géotechnique, Vol. 63, No. 4, pp. 331–339.

Al-Thawadi, S.M. (2011). Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand. J. Adv. Sci. Eng. Res., Vol. 1, No. 1, pp. 98–114.

ASTM D 2487 (1998). Standard classification of soils for engineering purposes (Unified Soil Classification System). American Society for Testing and Materials.

Blakely, R.L., e Zerner, B. (1984). Jack Bean *Urease*: The First Nickel Enzyme. Journal of Molecular Catalysis, Vol. 23, pp. 263–292.

BS 1377-3 (1990). Methods of test for soils for civil engineering purposes – part 3: chemical and electro-chemical tests. British Standards Institution, London.

Bull, A.T., Holt, G., e Lilly, M.D. (1982). Biotechnology International Trends and Perspectives. Organizations for Economic Co-operation and Development.

Carmona, J.P.S.F (2016). Utilização da Biotecnologia para a Estabilização de Solos: Precipitação de $CaCO_3$ por via Enzimática. Dissertação de mestrado, Dep. Engª Civil da FCTUC, Universidade de Coimbra.

Chou, C.W., Seagren E.A., Aydilek A.H., e Lai, M. (2011). Biocalcification of sand through ureolysis. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, Vol. 137, No. 12, pp. 1179-1189.

De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N., e Verstraete, W. (2008). Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. Cement Concr. Res., Vol. 38, No. 7, pp. 1005–1014.

DeJong, J.T., Mortensen, B.M., Martinez, B.C., e Nelson D.C. (2010). Bio-mediated soil improvement. Ecological Engineering, Vol. 36, pp. 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., e Weaver, T. (2013). Biogeochemical processes and geotechnical applications: progress, oportunities and challenges. Géotechnique Vol. 63, No. 4, pp. 287-301.

E196 (1966). Solos – Análise granulométrica. Especificação do LNEC, Lisboa, Portugal.

E197 (1966). Solos – Ensaios de compactação. Especificação do LNEC, Lisboa, Portugal.

Fujita, Y., Ferris, F.G., Lawson, R.D., Colwell, F.S., e Smith, R.W. (2000). Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria. Geomicrobiology Journal, Vol. 17, pp. 305- 318.

Hamdan N., Kavazanjian J.E., e O'Donnell, S. (2013). Carbonate Cementation via Plant Derived *Urease*. *Proceeding of the 18th International Conference on Soil Mechanics and Geotechnical Engineering,* Paris, France.

Hammes, F., e Verstraete, W. (2002). Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. Rev. Environ. Sci. Biotechnol., Vol. 1, No. 1, pp. 3–7.

Hammes, F., Boon, N., Villiers, J., Verstraete, W., e Siliciliano, S.D. (2003). Strain-Specific Ureolytic Microbial Calcium Carbonate Precipitation. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, No. 8, pp. 4901-4909.

Head, K.H. (1982). Manual of Soil Laboratory Testing, Volume 2: Permeability, Shear Strength and Compressibility Tests. Pentech Press Limited. Plymouth, London.

Mitchell, J. K. e Santamarina, J. C. (2005). Biological considerations in geotechnical engineering. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, Vol. 131, No. 10, pp. 1222-1233.

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

Neupane, D., Yasuhara, H., Kinoshita, N., e Unno, T. (2013). Applicability of enzymatic calcium carbonate precipitation as a soil-strengthening technique. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, Vol. 139, No. 12, pp. 2201-2211.

Neupane, D., Yasuhara, H., Kinoshita, N., e Unno, T. (2015). Distribution of mineralized carbonate and its quantification method in enzyme mediated calcite precipitation technique. Soils and Foundations, Vol. 55, No. 2, pp. 447-457.

NP EN 12390-1 (2010). Ensaios do betão endurecido. Parte 1: Forma, dimensões e outros requisitos para o ensaio de provetes e para os moldes. IPQ.

Tiano, P., Biagiotti, L., e Mastromei, G. (1999). Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: Methods of evaluation. Journal of Microbiological Methods, Vol. 36, pp. 139-145.

van Paassen, L.A., (2009). Biogrout. Ground Improvement by Microbially Induced Carbonate Precipitation. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Delft University of Technology, Netherlands.

Venda Oliveira, P.J., Costa, M.S., Costa, J.N.P., e Nobre, M.F. (2015). Comparison of the ability of two bacteria to improve the behaviour of a sandy soil. Journal of Materials in Civil Engineering, Vol. 27,. No. 1, pp. 06014025. DOI: 10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0001138.

Whiffin, V.S. (2004). Microbial $CaCO_3$ precipitation for the production of biocement. PhD Thesis. Murdoch University, Perth, Western Australia.

Whiffin, V.S., van Paassen, L.A., e Harkes, M.P. (2007). Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. Geomicrobiology Journal, Vol. 24, No. 5, pp. 417-423.

Yasuhara, H., Neupane, D., Hayashi, K., e Okamura, M. (2012). Experiments and predictions of physical properties of sand cemented by enzymatically induced carbonate precipitation. Soils and Foundations, Vol. 52, No. 3, pp. 539-549.