

4. **Metodologia experimental: Estudo em microcosmos**

O estudo de microcosmos permite estabelecer condições controladas necessárias para correlacionar a dinâmica da comunidade microbiana com as variações ambientais. Mas, apesar das informações descobertas serem de difícil extrapolação em ambiente natural, são extremamente importantes para aumentar o entendimento sobre esse ambiente.

A fim de investigar a ocorrência da biodegradação da mistura gasolina-etanol em zonas vadasas tropicais e a consequente redução do Fe(III), alguns parâmetros tiveram de ser elucidados, tais como mineralógicos, físico-químicos, biológicos e químicos.

Para a realização de tal estudo, este trabalho foi desenvolvido em laboratório a partir de coleta de amostra-matriz em campo e montagem de microcosmos, que mantiveram sua homogeneidade e anaerobiose.

Um primeiro ensaio foi montado e as amostras analisadas ao longo de aproximadamente 40 dias. Mas, devido a algumas falhas na metodologia o ensaio foi desconsiderado. Um novo ensaio foi montado com o solo armazenado em geladeira e a biodegradação nos microcosmos foi monitorada ao longo de 93 dias de incubação. Foram novamente analisadas a atividade microbiana degradadora, a queda da concentração dos contaminantes, os teores de ferro biodisponível total e Fe^{+2} , além do pH e potencial redox das amostras de solo. Os dados mineralógicos e geotécnicos foram obtidos anteriormente por Österreicher *et al.* (2004).

Como descrito neste, medidas geotécnicas como porosidade, granulometria e limites de liquidez, foram determinadas no Laboratório de Geotecnia e Meio Ambiente - PUC-Rio e seguiram as normas da ABMS (Tab. 13).

A mineralogia do solo foi analisada no CNPS - Embrapa-Solos e mostrou que a feição siltosa possui resíduos da rocha mãe e é constituída por silte, sendo o quartzo e a mica biotita seus principais minerais.

As medidas de carbono disponível também foram processadas em Österreicher-Cunha *et al.* (2004), a partir de oxidação com permanganato de

potássio segundo o método usado em Blair *et al.* (1995) e Tirol-Padre & Ladha (2004).

Tabela 13 - Tabela demonstrativa da caracterização da feição siltosa (Österreicher-Cunha *et al.*, 2004).

siltosas S			
média	dv pad		
0,000	0,000	%	Pedregulho Grosso
1,144	1,387		Pedregulho Médio
1,693	0,978		Pedregulho Fino
4,357	0,750		Areia Grossa
5,327	2,710		Areia Média
14,17	5,853		Areia Fina
31,38	7,067		Silte
40,92	13,04		Argila
69,98	8,636		g
44,07	0,086	Limite de Plasticidade	
25,91	8,722	Índice de Plasticidade	
2,769	0,001	/cm ³	densidade média dos grãos: Gs
2,774	0,001		dens. relativa média dos grãos: Gds
4,6		mg/kg	pH
0	0		CTC
2,5	0,548		Ca ²⁺
0,01	0,000		Mg ²⁺
0,073	0,111		K ⁺
0,267	0,052		Na ²⁺
0,85	0,345		soma: S
2,467	0,441		Al ³⁺
3,583	0,496		H ⁺
1,25	0,173		soma: T
0,2	0,000		Corg
6	1,155		N
1,167	0,408		C / N
			P assimilável
259,8	27,79	g/kg	SiO ₂
238,8	8,539		Al ₂ O ₃
120	8,679		Fe ₂ O ₃
14,33	4,13		TiO ₂
0,7	0		K ₂ O ₅
0,2	0		MnO
1,845	0,159		Ki = SiO ₂ /Al ₂ O ₃
1,395	0,101		Kr = SiO ₂ /R ₂ O ₃
3,13	0,2		Al ₂ O ₃ /Fe ₂ O ₃
			%
0,334	0,178		Cdisp

4.1 Amostra

A amostra estudada neste trabalho foi um tipo de solo natural residual jovem, com um teor médio de ferro e freqüente em todo o Brasil. Segundo estudos anteriores (Österreicher *et al.*, 2004) tem-se que este solo foi originado de rocha gnássica, presente no horizonte pedológico C, e apresenta grande heterogeneidade na profundidade explorada (3m). É rico em óxidos de ferro, pobre em argilas, apresenta pouca matéria orgânica, baixa atividade enzimática, populações bacterianas cultiváveis baixas e possui, inclusive, bactérias degradadoras de gasolina na sua microbiota nativa.

4.2 Coleta

A coleta foi realizada em um talude (Fig. 19) da Rodovia Washington Luís, no município de Duque de Caxias (região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro) no dia 4 de novembro de 2008, um dia após dois dias consecutivos de chuva.

Foram retirados, de forma deformada, aproximadamente 10kg da feição siltosa do solo insaturado de uma camada a 3 metros da superfície. Para tal, houve uma preocupação para que fosse retirada uma alíquota o menos intemperizada possível.

O solo foi conduzido ao laboratório em saco plástico fechado e mantido em baixa temperatura até ser analisado, visando evitar a atividade microbiótica. As análises para este trabalho ocorreram após três meses da refrigeração.

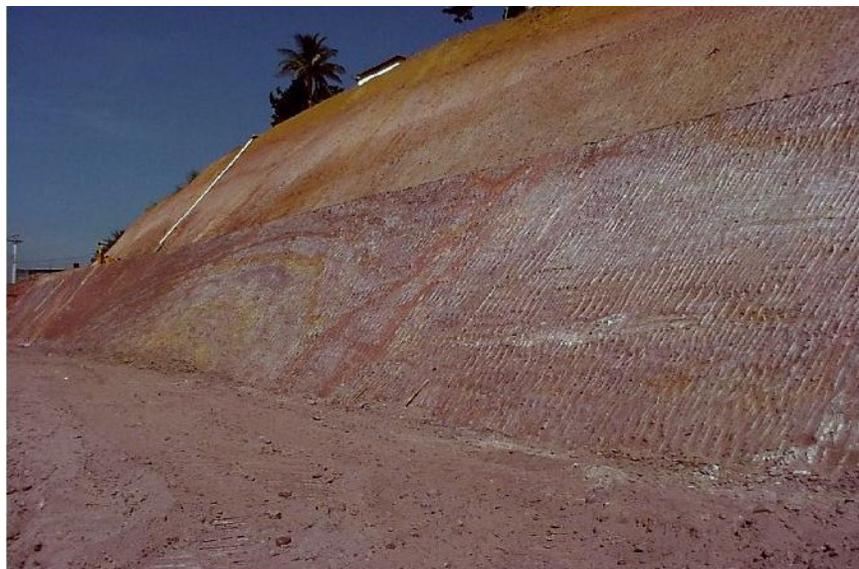


Figura 19 – Foto do talude.

4.4

Preparo da solução BTEX-Etanol

A fim de simplificar os procedimentos analíticos e, ao mesmo tempo, abordar mais especificamente a biodegradação dos compostos mais solúveis, tóxicos e recalcitrantes da gasolina, uma solução aquosa foi preparada a partir da mistura BTEX-Etanol e posteriormente diluída em água destilada a 10.000 mg.L^{-1} . A descrição deste preparo apresenta-se mais detalhada no capítulo anterior.

4.5

Ensaio Experimental

4.5.1

Montagem dos microcosmos

A fim de promover uma comparação sobre a atividade microbiológica e processos químicos e físicos entre solos saturados com água contaminada e não-

contaminada, foram montados dois microcosmos com solo deformado e compactado. Dois béqueres, um denominado “microcosmo C”, representando o solo controle (não contaminado), e o outro denominado “microcosmo E”, representando o solo contaminado, foram preenchidos com 1kg do solo ainda refrigerado.

Uma alíquota deste solo também foi separada para a medição da atividade microbiana degradadora aeróbia. Em seguida, os microcosmos foram conduzidos ao interior de uma câmara de atmosfera controlada (99,9 % N₂) e mantidos lá por 3 dias. Durante esse tempo, os solos foram homogeneizados esporadicamente com a finalidade de fazer o nitrogênio penetrar mais facilmente nos solos. O tempo aguardado serviu para que, ao retornar à temperatura ambiente (25 a 30°C), as populações anaeróbias e/ou facultativas fossem induzidamente selecionadas.

Após o tempo de ativação da microbiota, o microcosmo C foi saturado com 280mL de água destilada e homogeneizado (Fig. 20). Já o microcosmo E foi saturado com 290mL de água destilada contaminada com 10.000mg.L⁻¹ da mistura BTEX-Etanol e homogeneizado. Duas alíquotas de 5mL da água contaminada foram armazenadas para a quantificação dos contaminantes. Neste mesmo momento também foram retiradas alíquotas de ambos os microcosmos para as análises de atividade microbiana degradadora, quantificação de contaminantes, pH e potencial redox.

As análises seguintes ocorreram nos 8°, 21°, 35°, 49°, 65° e 93° dias de incubação. A partir do 21° dia os teores de ferro começaram a ser analisados. Todas as análises foram feitas em triplicata, exceto as medições de pH e potencial redox.



Figura 20 – Microcosmo C: solo saturado com água destilada.

4.5.2

Análises biológicas e químicas para caracterização de amostras.

4.5.2.1

Determinação da atividade microbiana por hidrólise de FDA

A estrutura e atividade das comunidades microbianas refletem a interação dinâmica entre a microbiota e o ambiente que ela habita. Avaliar seu estado metabólico permite monitorar processos de biodegradação (Zwolinski, 2000).

A atividade degradadora microbiana total foi quantificada a partir da medição da hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) realizada pelos microorganismos do solo. O método utilizado foi baseado numa modificação feita por Adam and Duncan (2001) e Green *et al.* (2006) em uma metodologia desenvolvida por Schnürer e Rosswall (1982).

A hidrólise de FDA é amplamente aceita como um método enzimático para medir todas as atividades microbianas, seja de populações cultiváveis ou não-cultiváveis, em uma grande variedade de amostras ambientais, visto que enzimas extracelulares como esterases, lipases e proteases, que são abundantes em solos e estão envolvidas na decomposição de muitos tipos de tecidos, possuem a capacidade de catalisar a hidrólise de FDA. Além disso, o método costuma

correlacionar-se bem com algumas das mais precisas medições de biomassa e incorporação de carbono, além de ser mais rápido, preciso, simples de se processar e reprodutível. A habilidade de hidrolisar FDA mostra-se muito difundida, especialmente entre os maiores decompositores, bactérias e fungos (Adam & Duncan, 2001; Brohon *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2006).

Algumas mudanças foram adotadas devido a dados obtidos com testes diversos, as mais importantes sendo:

- O solo não foi macerado nem peneirado. Elementos maiores como raízes e pedregulhos foram retirados manualmente;
- A incubação foi feita em ambiente escuro e temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) sem qualquer agitação.

A análise de atividade microbiana degradadora ocorreu em três situações distintas: medição da atividade aeróbia, medição da atividade anaeróbia em solo ainda não- saturado (véspera) e medições da atividade anaeróbia após a saturação. Estas últimas ocorreram nos tempos (dias) 0, 8, 21, 35, 49, 65 e 93 de incubação. Todas as amostragens foram feitas em ambiente anaeróbio (N₂).

Reagentes:

Diacetato de fluoresceína (FDA) (Sigma Aldrich)

Fluoresceína (Vetec)

Metanol (Isofar)

Clorofórmio (Vetec)

Fosfato de potássio monobásico (Vetec)

Fosfato de potássio dibásico (Proquímio)

Água destilada

Soluções:

- Tampão fosfato 60nM
- Solução de clorofórmio-metanol 2:1
- Solução estoque de FDA 1000µg.L⁻¹
- Solução estoque de fluoresceína 2000µg.mL⁻¹
- Solução padrão de fluoresceína 20µg.mL⁻¹

Procedimento:

Para cada amostra foram pesadas quatro replicatas de 2g de solo (contaminado e não contaminado) em tubos falcon previamente preenchidos com 15mL da solução tampão e identificados (1 controle e 3 replicatas da amostra). Separado o controle, foram acrescentados às três alíquotas 200 μ L de solução de FDA 1000 μ g.mL⁻¹. Agitou-se manualmente. Após a incubação por aproximadamente 8 horas em ambiente escuro, interrompeu-se a reação com 15mL de solução de clorofórmio-metanol 2:1 e agitação manual. Em seguida as amostras sofreram centrifugação a 2000 RPM por 3 minutos e foram filtradas em filtro quantitativo. Mediu-se o volume do filtrado. A fluoresceína formada nos filtrados durante a incubação foi medida em espectrofotômetro de UV-vis (Evolution 300-Vision Pro) a 490nm e sua concentração em cada amostra foi obtida a partir de uma curva padrão de fluoresceína feita anteriormente à amostragem. Cálculos foram feitos a fim de encontrar a quantidade de FDA hidrolisado por grama de amostra por minuto: (concentração medida x volume de filtrado) / massa de amostra / tempo de incubação).

Curva padrão de calibração:

Uma curva padrão de calibração foi preparada a partir de soluções de concentrações crescentes de sal de fluoresceína (0; 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 μ L.mL⁻¹) em tampão fosfato (Fig. 21).

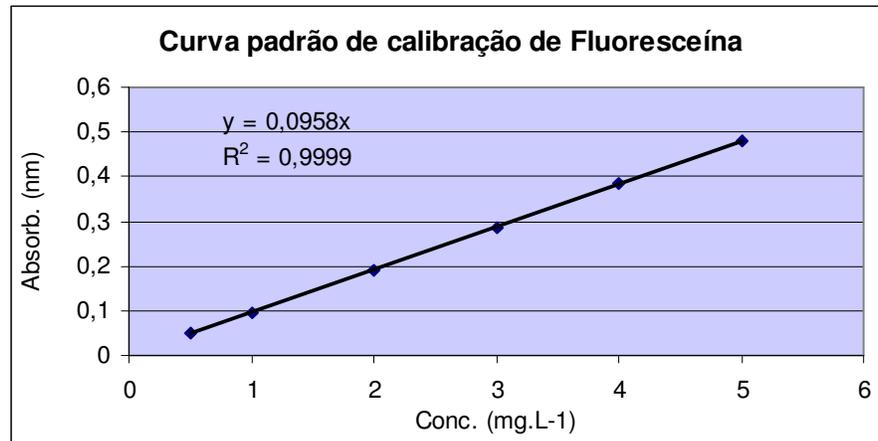


Figura 21 – Curva padrão de calibração de fluoresceína.

4.5.2.2 Medições de pH e potencial de redução

A medição do pH e do Eh representa um estudo típico para avaliar a existência de algum potencial geoquímico do ferro que esteja afetando o comportamento ambiental no solo (USEPA, 2003). As análises físico-químicas não são capazes de evidenciar o impacto causado no ecossistema, mas são indispensáveis para estimar alterações nas condições químicas e, conseqüentemente, biológicas.

A solução necessária para a medição de pH e potencial de redução foi preparada de acordo com (EMBRAPA, 1979).

Procedimento prévio

Foram transferidos 5g de solo de cada microcosmo para dois tubos falcon. Em seguida adicionaram-se 12,5mL de água deionizada em cada tubo. Após agitação manual, as soluções ficaram em repouso por 1h. Outra agitação manual foi necessária para que as medições fossem efetuadas com os solos em suspensão.

Medição do pH

Foi inserida em cada tubo uma tira de papel indicador universal de pH (Merck) por aproximadamente 10 segundos para a medição do pH.

Medição do potencial de redução

Um eletrodo de Eh, devidamente lavado com água deionizada e seco com papel, foi inserido em cada tubo. Foi considerado o primeiro valor (mais baixo) detectado pelo aparelho (ph-metro: Lutron - Modelo ph206).

4.5.2.3

Determinação de Fe⁺² e Fe biodisponível total

A identificação de condições redutoras de Fe(III) costuma ser baseada no aparecimento de elevadas concentrações de Fe(II) dissolvido nas amostras de água subterrânea.

Muitas técnicas têm sido usadas para estudar a mineralogia do ferro em sedimentos e solos (Heron *et al.*, 1994).

A metodologia empregada para a quantificação de Fe⁺² e de Fe biodisponível total das amostras de solo dos dois microcosmos foi através da determinação a partir de extração com presença de ligante (DTPA), referente ao segundo método testado no capítulo anterior.

Quantificação de Fe⁺²

Para a quantificação de Fe⁺² nos microcosmos, foram analisadas as amostras relativas ao 21º, 35º, 49º, 65º e 93º dia de incubação.

Todas as análises foram processadas em condições de atmosfera controlada (99,9% N₂).

Assim como ficou definido através dos testes com soluções padrão no capítulo anterior, não foi adicionada a solução extratora com DTPA em nenhuma das soluções padrão, somente soluções-estoque de Fe^{+2} e Fe^{+3} , solução de 1,10-fenantrolina e água.

Quantificação de Fe biodisponível total

A análise foi processada em um laboratório da EMBRAPA Solos-RJ. Para tal, a mesma solução, originada da extração de Fe biodisponível dos solos com o uso de agente quelante, foi injetada e analisada em ICP-OES.

4.5.2.4

Quantificação das concentrações dos BTEX-Etanol em solo contaminado

Para analisar as concentrações de BTEX-Etanol em amostras de solo, é necessário separar o analito da matriz através de métodos de extração, como dentre outros, a diluição em solventes, aquecimento da amostra e purgação de amostra com gás inerte e, em seguida, injetá-lo em cromatógrafo (Weisman, 1998). A cromatografia gasosa com detector de ionização por chama é o método analítico predominantemente usado para determinar a composição de gasolinas (GDCh, 1996).

Atualmente existem muitas técnicas para melhorar a eficiência de extração de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis contidos em amostras líquidas ou sólidas, tais como *headspace* dinâmico (*purge and trap*), micro extração em fase sólida (SPME) e micro extração com solvente (SME). Por serem técnicas mais modernas, sua prática muitas vezes, requer aparelhos mais sofisticados e caros. A seringa de SPME, por exemplo, possui um tempo de vida muito limitado devido ao desgaste da sua fibra com o uso contínuo, sem contar com a limitação de tipos de fases estacionárias para sua utilização (Melquiades *et al.*, 2006).

A técnica de *headspace* estático é relativamente simples e de fácil operação. Nela a amostra no *headspace* é preparada em um frasco que, além da amostra, contem o solvente de diluição e a solução modificadora (Melquiades *et al.*, 2006). Neste trabalho também foi adicionado o padrão interno.

Para monitorar a biodegradação da mistura BTEX-Etanol no solo, foram quantificadas e analisadas as concentrações destes compostos em cada alíquota de solo contaminado, sendo possível acompanhar seu decaimento a partir da técnica de extração por *headspace* estático e injeção em cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC - SHIMADZU 17A).

A metodologia empregada para extrair e quantificar os hidrocarbonetos monoaromáticos e o etanol das amostras de solo contaminado foi baseada em Melquiades *et al.* (2006). Algumas alterações foram feitas a fim de adaptar o método às condições de trabalho, tais como:

- Visto ser possível extrair valores significantes dos compostos, as medidas foram usadas pela metade;
- Por indisponibilidade de uso contínuo de lacrador, foi usado tubo de rosca de 15mL com septo na tampa. Após o fechamento também foi passado parafilm em torno da tampa;
- Para ajudar na extração, foi colocado um magneto junto à amostra para agitação da mesma durante o aquecimento;
- Por indisponibilidade de vaselina líquida, o banho de aquecimento foi feito com água e agitador, para que a água mantivesse a temperatura homogênea;
- Como as concentrações dos analitos com o tempo tendem a baixar muito, foram injetados 2mL do gás ao invés de 1mL;
- As análises foram feitas em triplicatas de amostras e também em quantidade de injeções;
- Devido a tempos de retenção próximos e para encurtamento do tempo gasto para a corrida, a rampa de aquecimento foi modificada;
- Uma vez que a injeção foi feita manualmente, adotou-se o método de adição de padrão interno (terc-butanol), como na Resolução ANP n°42 (ANP, 2005), com a intenção de reduzir os erros de áreas devido à variação de volumes injetados. O volume de padrão interno a ser utilizado deve ser

testado a fim de que produza um pico com área próximo a dos compostos analisados. Neste trabalho utilizamos 16 μ L;

- A coluna utilizada foi Equity-1 [poli(dimetilsiloxano)], 30m x 0,25mm x 0,251m (Supelco);
- Gás de arraste utilizado foi o hélio e não o nitrogênio;
- Após cada corrida de amostra, fez-se uma corrida de aquecimento para certificar a saída do vapor de água.

As amostras de solo foram analisadas primeiramente no dia em que o microcosmo foi contaminado e em seguida nos 9°, 21°, 36°, 49°, 65° e 93° dias de incubação. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Reagentes e soluções:

Os reagentes e soluções utilizados para estes processos foram os mesmos utilizados no capítulo anterior.

Procedimento:

Os procedimentos para a extração e determinação dos compostos também foram os mesmos adotados no capítulo anterior para o desenvolvimento do teste de recuperação do método escolhido, sendo que o solo já havia sido contaminado durante a montagem dos microcosmos. Todas as análises foram feitas em triplicata, tanto no que se refere à retirada de alíquotas de solo do mesmo tempo de incubação, quanto ao número de injeções do conteúdo volatilizado da amostra referente à mesma alíquota.

Curvas de calibração:

Foram utilizadas as mesmas curvas de calibração processadas no capítulo anterior.

Condições cromatográficas:

As condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas no capítulo anterior durante o teste de recuperação do método de extração.

4.6 Ensaio estéril

4.6.1 Montagem dos microcosmos estéreis

Com o objetivo de confirmar a mobilização do ferro e a atenuação dos BTEX-Etanol como processos controlados pela atividade microbiana, foram montados dois microcosmos com o mesmo solo utilizado no ensaio natural, porém esterilizados. O ensaio foi montado nas mesmas condições que o ensaio experimental com solo biótico (não estéril), ou seja, dois béqueres, um denominado “microcosmo Ce”, representando o solo estéril controle (não contaminado), e o outro denominado “microcosmo Ee”, representando o solo estéril contaminado, foram preenchidos com 1kg do solo ainda refrigerado. Os solos, ainda insaturados, foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 kgf/cm² (1 atm). Seguindo a metodologia utilizada em Gaidzinski *et al.* (2009), as amostras foram submetidas a 3 seções consecutivas de 1 hora de autoclavagem com um período de 2 dias de incubação entre as seções. Além do solo, todo o material instrumental para manuseio destas amostras, incluindo a água destilada para a saturação e tampas de algodão hidrofóbico revestidas de gase e papel pardo, também foram autoclavadas.

Em seguida, os béqueres com solo estéril foram conduzidos ao interior do fluxo laminar (ambiente mantido estéril por um fluxo de ar filtrado), onde foram preparados os microcosmos.

A umidade perdida do solo foi restabelecida após adições de 150mL de água e homogeneizações, até que sua massa voltou a apresentar os valores obtidos anteriormente à autoclavagem.

Os microcosmos foram saturados da mesma forma que os microcosmos de solo biótico. Um deles (CE) foi saturado com água destilada estéril e o outro (Ee) com a mesma solução utilizada no ensaio biótico, também com a mesma proporção de volumes. Uma alíquota de 5mL da água contaminada foi armazenada para a análise cromatográfica dos contaminantes. Após a saturação os

microcosmos foram levados à câmara de anaerobiose, onde foi procedida a incubação e o preparo de alíquotas para análise.

4.6.2

Análises biológicas e químicas para caracterização das amostras estéreis.

As mesmas análises feitas com as amostras do ensaio experimental foram processadas com as amostras estéreis, com exceção da medição de pH e potencial redox, visto que apresentaram valores constantes ao avaliar o mesmo solo no ensaio anterior.

Amostragens para todas as determinações biológica e química ocorreram no dia inicial, no 16º, 19º e 29º dia de incubação.