

### **3**

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1.**

#### **Considerações Gerais**

Como foi apresentado na Tabela 2.3, são diversos os trabalhos que se referem ao estudo sobre a interação de microrganismos com o solo, em escala de laboratório, sob condições controladas, utilizando diversos materiais como meio poroso e como biocolóides; microrganismos ou modelos representativos deles.

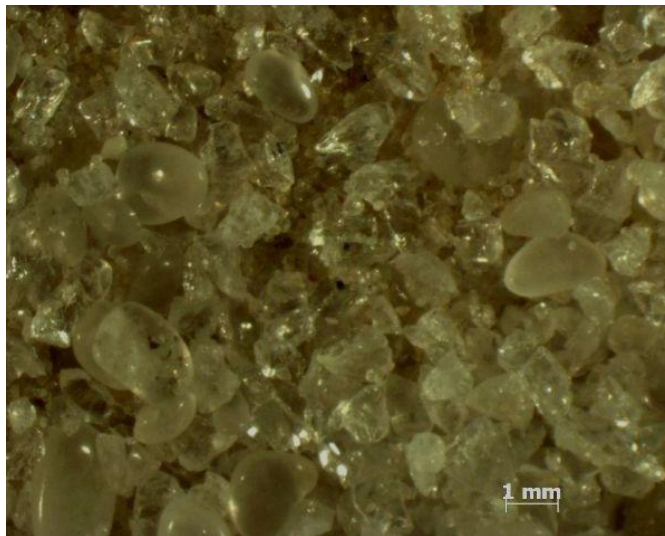
O estudo do transporte no presente trabalho é realizado através de ensaios Adveção-Dispersão-Sorção (ADS). Com esta finalidade, inicialmente foram escolhidos os materiais a serem utilizados nos ensaios de transporte, e desenvolvido no Laboratório de Geotecnia e Meio Ambiente da PUC-Rio, um equipamento destinado à realização dos ensaios ADS. Nesta seção serão apresentadas as propriedades dos materiais escolhidos, os métodos e as técnicas microbiológicas utilizadas e a descrição do equipamento.

Previamente à realização dos ensaios ADS foi necessária a execução de ensaios microbiológicos, assim como de ensaios de batelada. A metodologia utilizada nestes ensaios preliminares e nos ensaios ADS propriamente ditos também será apresentada nesta seção.

### **3.2.**

#### **Meio poroso**

O meio poroso utilizado foi areia de quartzo industrial, limpa e seca, utilizada por Pessôa (2006). Esta areia é resultado da mistura homogênea de vários tipos de areias com distribuição uniforme de grãos com a finalidade de obter uma areia bem graduada. As imagens da Figura 3.1, feitas em microscópio estereoscópico (lupa) mostram a morfologia e tamanho dos grãos. O aspecto da areia foi descrito por Pessôa (2006) como uma areia formada por grãos de quartzo hialinos (incolor, transparente) e leitosos (branco translúcido, embaçado), em geral angulosa.



**Figura 3.1.** Areia de quartzo. Lupa ZEISS Stereo Discovery V8 x10 de aumento

### **3.2.1. Caracterização geotécnica do meio poroso**

A caracterização geotécnica do meio poroso foi feita através da determinação das seguintes propriedades: massa específica, distribuição do tamanho dos grãos, relação de vazios e permeabilidade. O resumo dos resultados obtidos está disposto na Tabela 3.2, ao final desta seção.

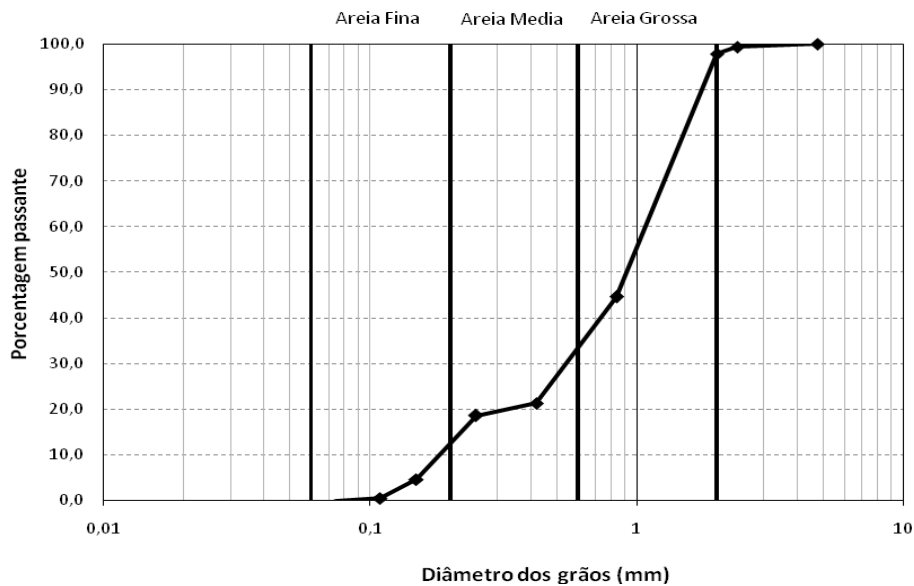
As análises foram realizadas no Laboratório de Geotecnia e Meio Ambiente da PUC-Rio, utilizando protocolos padrão indicados para cada ensaio.

A massa específica dos grãos (G) ou densidade relativa dos grãos foi determinada de acordo com o procedimento indicado na norma brasileira ABNT/NBR 6508/84. O valor médio de 2,64, assim determinado, considera-se coerente com a densidade teórica do quartzo (2,65).

Devido à dependência do tamanho dos grãos sobre os diferentes processos de transporte, foi feita a medida da distribuição do tamanho dos grãos através do ensaio de análise granulométrica, de acordo com o procedimento especificado pela Norma Brasileira ABNT/NBR 7181/84, utilizando uma mesa vibratória horizontal.

A Figura 3.2 ilustra a curva granulométrica da areia de quartzo usada nos experimentos deste estudo. De acordo com a curva granulométrica, o solo apresenta 12% de areia fina (0,06 até 0,2 mm), 22% de areia média (0,2 até

0,6 mm) e 64% de areia grossa (0,6 até 2 mm). Assim, de acordo com a classificação indicada na Norma Brasileira ABNT/NBR 6502/95, o solo é classificado como areia grossa.



**Figura 3.2.** Distribuição de tamanhos dos grãos de quartzo

A partir da curva granulométrica são determinados graficamente os diâmetros característicos  $d_{10}=0,18\text{mm}$ ,  $d_{30}=0,55\text{mm}$ ,  $d_{50}=0,92\text{mm}$  e  $d_{60}=1,10\text{mm}$ , e através deles os seguintes parâmetros:

- Coeficiente de uniformidade  $C_u=d_{60}/d_{10}=6,11$
- Coeficiente de curvatura  $(d_{30}^2)/(d_{60}\times d_{10})=1,82$

De acordo com o Sistema Unificado de Classificação de Solos, um solo que apresenta um coeficiente de uniformidade maior do que 6, pode ser classificado como um solo bem graduado. Desta forma a areia de quartzo pode ser classificada como areia bem graduada (SW), ou seja, os diâmetros dos grãos estão distribuídos de forma uniforme em todas as faixas granulométricas.

A existência de grãos com diversos diâmetros permite melhor arranjo das partículas (bom entrosamento) e ocupação dos espaços vazios. A heterogeneidade dos grãos possui, por sua vez, uma importância considerável na porosidade. Os grãos menores tendem a se concentrar nos espaços intersticiais deixados pelos grãos maiores, diminuindo o índice de vazios.

Uma estimativa do diâmetro médio dos grãos corresponde ao valor do diâmetro característico  $d_{50}$ . Porém, para determinar o diâmetro a ser utilizado nas equações de filtração ( $d_g$ ) quando o meio poroso é composto por diferentes tamanhos de partículas, como é o caso do presente estudo, será usado o valor

do diâmetro efetivo  $d_{10}$ , que de acordo com Martin *et al.* (1996), descreve de modo mais exato o transporte de bactérias através de um meio heterogêneo.

O índice de vazios máximo e mínimo da areia de quartzo foi determinado através dos métodos indicados pelas normas brasileiras ABNT/NBR 12004/90 e ABNT/NBR 12051/91 respectivamente, sendo obtidos os resultados de 0,31 para o  $e_{\min}$  e 0,66 para o  $e_{\max}$ . Nos ensaios ADS, o índice de vazios se manteve em torno de 0,4, valor que permitiu a determinação da porosidade do meio poroso através da equação (3.1), obtendo o valor de porosidade ( $n$ ) igual a 0,29.

$$n = \frac{e}{1 + e} \quad (3.1)$$

O coeficiente de permeabilidade ou condutividade hidráulica saturada  $K_s$  foi determinado usando o método da carga constante e parede rígida, de acordo com a norma ABNT/NBR 13292/95. De forma sucinta, o procedimento envolveu o uso da Garrafa de Mariotte, a partir da qual o fluxo de saída foi conectado à válvula de ingresso no fundo do permeâmetro de parede rígida, gerando fluxo ascendente e constante através da coluna de areia, conforme ilustra a Figura 3.3. O volume de saída do efluente foi medido através da determinação do peso do efluente em intervalos de tempo constante.



**Figura 3.3.** Aparato para a determinação da condutividade hidráulica saturada

O valor da condutividade hidráulica  $K_s$  foi determinado a partir da Lei de Darcy:

$$K_s = \frac{Q \cdot L \cdot A}{\Delta H} \quad (3.2)$$

onde  $Q$  é a vazão de saída medida por peso de água através do tempo,  $L$  é o comprimento,  $A$  é a seção transversal da amostra, e  $\Delta h$  a diferença de carga entre o ingresso e saída da água do permeâmetro. O ensaio foi realizado três vezes, sendo o valor adotado a média dos resultados dos três ensaios, como é apresentado na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Determinação da condutividade hidráulica saturada

Ensaio	$i$ [-]	$K_s$ [cm/s]
1	0,25	2,91E-02
2	0,22	3,05E-02
3	0,20	2,75E-02
	<b>Média</b>	<b>2,91E-02</b>

A condutividade hidráulica pode ser calculada também antecipadamente utilizando a equação de Hazem  $K_s = d_{10}^2$ , que para a areia de quartzo utilizada corresponde ao valor de 3,24E-02 cm/s. Esta equação determina que para areias soltas, a condutividade hidráulica é igual ao quadrado do diâmetro do grão, para o qual só 10% da amostra tem um diâmetro menor. É interessante notar que Pekdeger e Matthes (1988), citado em Foppen *et al.*, (2005) relacionam a filtração mecânica com a inversa do  $d_{10}$ . Assim, o percentual de 10% da areia mais fina impacta tanto a condutividade como na filtração mecânica. Esta relação tem lógica desde que estes grãos mais finos irão a preencher os espaços entre aqueles maiores e assim influenciar o tamanho médio do poro da coluna compacta inteira.

**Tabela 3.2.** Características físicas da areia de quartzo limpa

Propriedade	Valor
Massa específica dos Grãos, $G$ (-)	2,64
Relação de vazios máxima, $e_{max}$ (-)	0,66
Relação de vazios mínima, $e_{min}$ (-)	0,31
Diâmetro médio, $d_{50}$ (mm)	0,92
Diâmetro efetivo, $d_{10}$ (mm)	0,18
Condutividade hidráulica saturada, $K_s$ (cm/s)	2,91E-2

### 3.3. Bactéria

Neste estudo irão ser avaliados, os principais processos conhecidos que determinam a movimentação e distribuição da *E. coli* em aquíferos sob condições de saturação, através da determinação de parâmetros de transporte como a adsorção e a filtração, com o objetivo de esclarecer a importância relativa dos vários fatores que influenciam o transporte.

O biocolóide usado como objeto de estudo foi a bactéria *Escherichia coli* ATCC (*American Type Culture Collection*) 11229, gentilmente cedida pelo Professor Doutor Marco Antônio Lemos Miguel do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A determinação das propriedades das células, como densidade específica, densidade seca e determinação do tamanho das células foram realizadas, mas não fazem parte dessa dissertação.

As dimensões da bactéria foram obtidas do estudo realizado por Matthess *et al.* (1991b) citado em Foppen *et al.*, (2005) e Foppen e Shijven, (2006), que estudaram o transporte de *E. coli* ATCC 11229, determinando um comprimento médio de 2-4  $\mu\text{m}$ , diâmetro médio de 1  $\mu\text{m}$  e a densidade da bactéria variando entre de 1-1,05  $\text{g}/\text{cm}^3$ .

#### 3.3.1. Manutenção da cepa de *Escherichia Coli*

A cepa de *E. coli* foi mantida e transferida por repique mensal, para tubos de ensaio de 20 mL, contendo 5 mL de meio sólido *Trypticase Soy Agar* (TSA) inclinado e também para tubos contendo 10 mL de meio líquido *Trypticase Soy Broth* (TSB). As células dos repiques, conservados em geladeira, foram ativadas para serem usadas nos ensaios, através de preparo do pré-inóculo, pela transferência de alíquotas dos repiques para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio TSB. Após a inoculação, os tubos (pré-inóculo) eram incubados a temperatura ambiente por 48 horas após as quais eram imediatamente usados nos ensaios.

A partir destes tubos contendo o pré-inóculo, foram preparados inóculos, número de bactérias necessárias para a realização dos ensaios, multiplicando numericamente a população bacteriana. Para tal inoculou-se uma alíquota do pré-inóculo, de volume igual ao 1% (v/v) do volume de meio TSB, necessário em

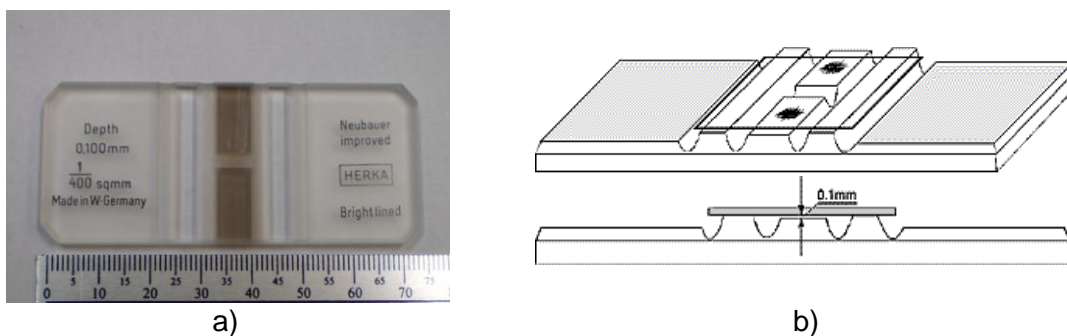
função do ensaio que será realizado. Esse conjunto é incubado até que as bactérias atinjam o final da fase exponencial da curva de crescimento.

### 3.3.2. Determinação do número de bactérias

A estimativa numérica de células bacterianas foi feita através da contagem de células por microscopia em Câmara de Neubauer, pela densidade óptica da suspensão celular e por contagem de células viáveis em meio de cultura através da técnica dos Tubos Múltiplos e por Contagem em Placas, dependendo do ensaio a ser realizado. Essas técnicas serão descritas a seguir.

#### 3.3.2.1. Contagem celular em Câmara de Neubauer

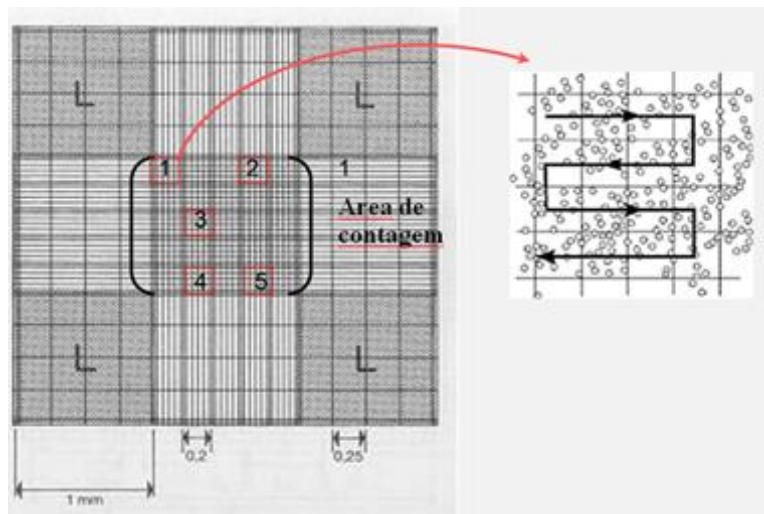
A câmara de Neubauer (CNB) consiste numa lâmina de microscopia com espessura bem maior que uma lâmina normal, onde existe marcação de área que permite, através de uso de uma lamínula de cobertura, determinar o volume da amostra contida em cada espaço determinado por quadrantes. Por conseguinte é possível, após contagem do número de bactérias nesses quadrantes, se determinar o número de bactérias em cada mL da amostra referentes a cada ensaio ou condição. Neste estudo foi utilizada uma câmara de Neubauer modelo  $1/400 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$  (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** a) Câmara de Neubauer utilizada, b) Esquema da CNB com a lamínula sobre a área de contagem

A seguir, a Figura 3.5 mostra que a área de contagem de  $1 \text{ mm}^2$  está dividida em 25 quadrados cada um deles com área de  $0,04 \text{ mm}^2$  ( $1/25 \text{ mm}^2$ ). A contagem é realizada em pelo menos 5 desses quadrados, escolhidos

aleatoriamente. Por sua vez, estes últimos quadrados estão subdivididos em 16 quadrados menores de área igual a  $0,0025 \text{ mm}^2$  ( $1/400 \text{ mm}^2$ ).



**Figura 3.5.** Área de Contagem da CNB e esquema da metodologia de contagem.

O número total de bactérias é calculado multiplicando por 25 a média do número de bactérias contadas nos 5 quadrados escolhidos, obtendo assim o número de bactérias em  $1 \text{ mm}^2$ . Considerando a profundidade da câmara de  $0,1 \text{ mm}$  o valor pode ser calculado para  $1 \text{ mm}^3$ .

### 3.3.2.2.

#### Leitura da densidade óptica por espectrofotometria

A espectrofotometria é uma técnica utilizada para determinar a quantidade de uma substância ou elementos em solução ou suspensão em uma amostra. Ela é baseada na absorção de radiação dos comprimentos de onda entre as regiões que variam desde a faixa do ultravioleta, passando pela luz visível, até a zona do infravermelho.

Desse modo, a absorbância  $A$  é uma medida indireta da concentração bacteriana numa suspensão. A relação linear que existe entre absorbância e concentração é conhecida como a relação de Beer-Lambert, que pode ser expressa como:

$$A = abc \quad (3.3)$$

onde  $a$  é uma constante que depende do tamanho e índice de refração da bactéria, e do comprimento de onda da luz incidente (Deshpande e Shonnard,



1999);  $b$  é distância percorrida pelo feixe luminoso através da amostra e finalmente  $c$  a concentração bacteriana.

Assim, a absorvância da luz a cada comprimento de onda é diretamente proporcional à concentração da solução contida na cubeta. Esta linearidade deixa de ocorrer em concentrações muito baixas e muito elevadas da substância, podendo-se, neste último caso, diluir previamente a amostra a medir. Uma curva padrão deve ser estabelecida para que seja possível correlacionar o valor da absorvância com a quantidade numérica de bactérias, determinada por contagem em Câmara de Neubauer ou por contagem de unidades formadoras de colônias em meio de cultura.

Neste estudo a absorvância foi determinada utilizando o espectrofotômetro *Spectronic Genesys* (*Spectronic Instruments Inc.*) e como recipientes, cubetas retangulares de quartzo, de 1 cm de comprimento.

### **3.3.2.3.**

#### **Contagem de microrganismos pela Técnica dos Tubos Múltiplos**

A técnica dos Tubos Múltiplos também é conhecida como Técnica do Número Mais Provável (NMP) e permite estimar o número de células viáveis numa suspensão celular através do uso de indução matemática. O princípio deste método consiste na inoculação de várias réplicas de diluições em série de uma mesma amostra, em tubos de ensaio com meio de cultura líquido e na detecção e contagem do número de réplicas nas quais for detectado crescimento. Assume-se que cada tubo de ensaio onde se detecta crescimento terá recebido pelo menos uma célula microbiana viável e cultivável. Interpreta-se que os tubos nos quais não ocorre crescimento microbiano não devem ter recebido nenhuma célula viável. Os tubos com crescimento distinguem-se facilmente daqueles onde não ocorreu crescimento, pela presença de turbidez e/ou mudanças de coloração apresentada pelo meio de cultura específico para cada espécie ou grupo a ser detectado. A determinação do número mais provável de células é feita através da aplicação de tabelas publicadas, preparadas através de cálculos estatísticos, levando-se em consideração uma combinação do número de réplicas, onde se detecta crescimento e as respectivas diluições.

Para a determinação do NMP, as amostras foram diluídas sucessivas vezes e inoculado 1 mL de cada diluição, em triplicata, em tubos com 10 mL de meio líquido (TSB ou Caldo *Fluorocult*), de tal forma que se obtivesse uma última

diluição de 3 tubos que apresentasse pelo menos um resultado negativo. O arranjo de número de tubos positivos das 3 diluições foi transposto para Tabelas estatísticas que informam o NMP para as diferentes combinações de tubos positivos e que também incluem os limites de confiança dos números mais prováveis dos microrganismos pesquisados em função da Tabela em questão.

#### **3.3.2.4.**

#### **Contagem de Número de Unidades Formadoras de Colônias em Placas de Petri**

A contagem em placas permite a visualização de colônias de microrganismos, que são consideradas, cada uma como tendo sido originária de uma única célula. Como é possível que algumas colônias se originem de células não separadas, considera-se então não o número de células, mas sim o número de Unidades formadoras de colônias.

Neste trabalho foi utilizada a técnica de contagem em placa por derramamento em profundidade ou "*pour plate*". Neste, a suspensão da amostra contendo microrganismos em água sofria diluições sucessivas e uma alíquota de 0,1 mL dessas diluições era aplicada, em triplicata, no fundo de placas de Petri de plástico, previamente esterilizadas como mostra o esquema da Figura 3.6. Sobre esta alíquota era aplicado uma quantidade de meio TSA (*tripticase soy agar*) fundido, a temperatura de aproximadamente 45°- 50°C e o conjunto cuidadosamente homogeneizado, através de movimentos circulares. Após a solidificação do meio, as placas tampadas eram invertidas e incubadas a temperatura ambiente (25°C) por 24 a 48 horas, para proceder à contagem do número de colônias.

Na técnica de contagem em placa, as placas adequadas para contagem devem ter entre 30 a 300 colônias. Assim, após a contagem, o resultado médio do número de colônias das placas referentes a cada diluição era registrado e multiplicado corrigido pelo fator da diluição.

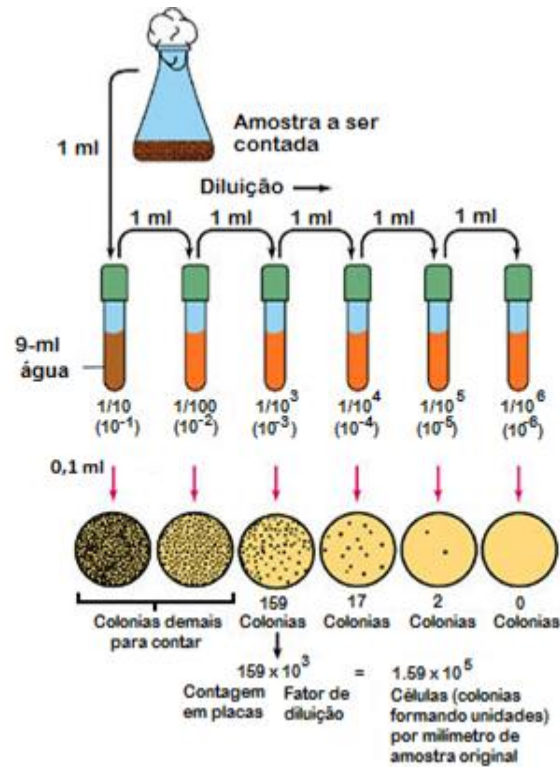


Figura 3.6. Esquema da Técnica de Contagem em Placa

### 3.4. O equipamento para o ensaio ADS

O estudo de laboratório implementado para determinar os parâmetros de transporte da bactéria *E. coli* ATCC11229 em areia saturada, denominado ensaio ADS (Advecção-Dispersão-Sorção), adotou um sistema baseado na passagem contínua de uma suspensão bacteriana através de uma coluna de solo, com fluxo vertical constante da base para o topo da coluna, reduzindo os efeitos gravitacionais sobre o transporte bacteriano e facilitando a saída de gases na coluna durante sua saturação.

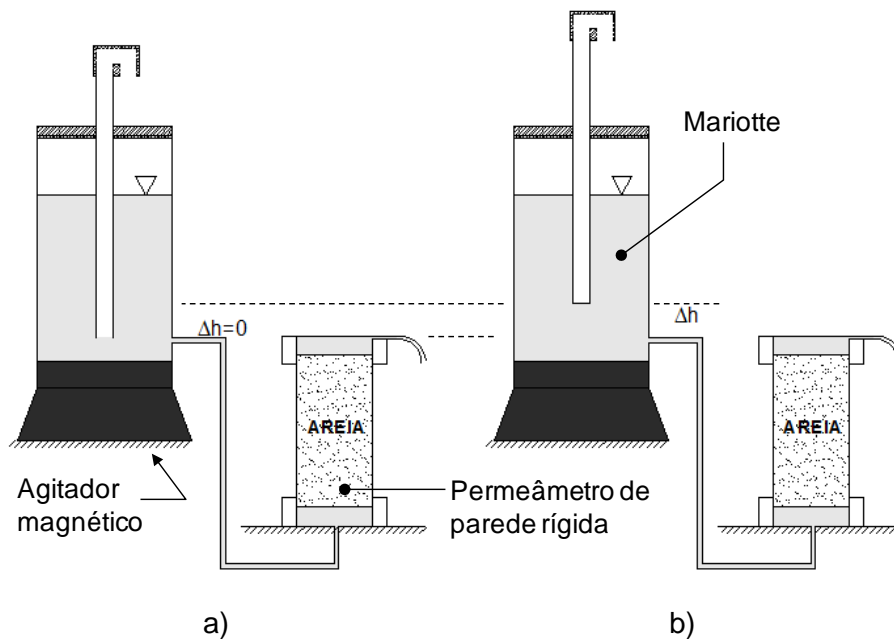
Com este objetivo, no laboratório de Geotecnia da PUC-Rio e como parte do presente estudo, foi desenvolvido o equipamento necessário para a realização do ensaio ADS.

Para que fosse possível realizar os ensaios sob condições assépticas foram utilizados materiais resistentes ao ataque químico e a temperaturas maiores do que  $121^{\circ}\text{C}$ , visando à esterilização do equipamento por autoclavação. Sendo assim foram escolhidos o teflon, resistente a uma grande variedade de produtos químicos usados durante os ensaios, podendo ser usado

entre  $-200^{\circ}\text{C}$  e  $+200^{\circ}\text{C}$  em serviços intermitentes, o polipropileno, que tem boa resistência química e resistência ao calor de até  $120^{\circ}\text{C}$  e finalmente o silicone.

O equipamento, semelhante ao utilizado para o ensaio de permeabilidade de solos granulares à carga constante, consiste basicamente de uma coluna de parede rígida e um reservatório (Frasco de Mariotte), ligados entre si por mangueiras de silicone. O reservatório está destinado ao armazenamento de água destilada estéril na etapa de saturação da coluna ou da suspensão bacteriana durante os ensaios.

O Frasco de Mariotte é um dispositivo usado em laboratório para manter constante a carga hidráulica do líquido a ser inserido na coluna, sem precisar de qualquer sistema suplementar ou de bombeamento (Thorel *et al.* 2002). Assim, este dispositivo foi utilizado para gerar o fluxo ascendente através da coluna de areia.



**Figura 3.7.** Esquema de funcionamento do equipamento para os ensaios ADS a)  $\Delta h=0$ , b)  $\Delta h>0$

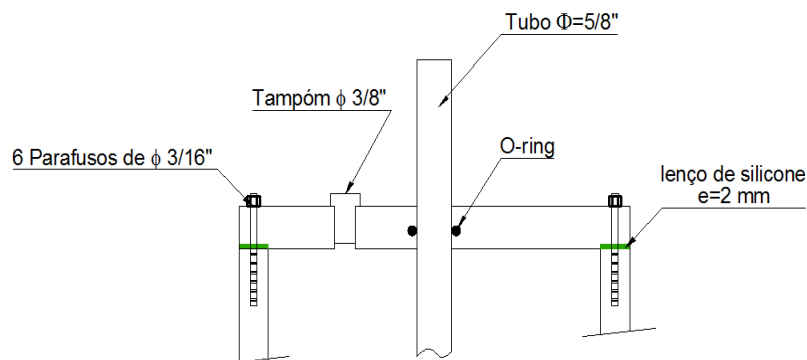
Devido ao funcionamento hidráulico do equipamento, mostrado na Figura 3.7 é preciso determinar a posição da coluna com relação ao Mariotte, de forma que a solução contida no frasco de Mariotte flua até a coluna, da base para o topo, por efeito da diferença de carga hidráulica  $\Delta h$ . Para isto, a parte inferior do tubo do frasco de Mariotte deve ficar por cima da válvula de saída da coluna. Esse sistema permite que a pressão, no final do tubo dentro do frasco, seja o valor da pressão atmosférica, enquanto que a pressão acima do nível de

água no interior do frasco de Mariotte se torna negativa. A Figura 3.7 (a) mostra a configuração do equipamento para a condição estacionária do sistema ( $\Delta h=0$ ) e na Figura 3.9 (b) no caso que o gradiente hidráulico é maior que um ( $\Delta h>0$ ).

A seguir são descritas as características do Frasco de Mariotte e da coluna.

### 3.4.1. Características do frasco de Mariotte

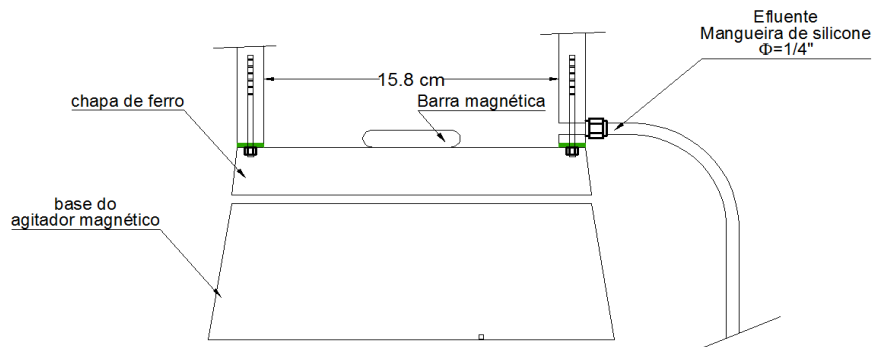
Os Mariottes consistiram de cilindros de teflon com 15,8 cm de diâmetro interno e comprimento de 29 cm. Foram construídos para conter aproximadamente 5 litros de material fluido (água ou suspensão bacteriana). A tampa de cada Mariotte, também de teflon, é acoplada à abertura superior do Mariotte de forma a não permitir nenhuma passagem de ar. Para garantir o fechamento hermético, foi disposto um lenço de silicone entre a tampa e o cilindro. Essa tampa é atravessada por um tubo de polipropileno de 5/8" de diâmetro sujeita à tampa através de um *O-ring* como mostra a Figura 3.8. É importante apontar que foi colocada uma peça adicional no extremo exterior do tubo em forma de U, com o objetivo de minimizar a entrada de ar contaminado, durante a execução dos ensaios.



**Figura 3.8.** Corte transversal e detalhe da tampa do Mariotte

Assume-se que o valor da concentração da suspensão bacteriana se mantém constante no ingresso da coluna para o ensaio inteiro, nesse sentido para manter a suspensão bacteriana homogeneizada foi acoplada como base do Mariotte, na parte inferior do cilindro, uma placa agitadora com um bastão magnético (Agitador magnético Fisatom mod. 753), conseguindo-se a agitação contínua da suspensão e, portanto sem variações da concentração inicial. Entre

o cilindro e a base também foi colocado um lenço de silicone para a vedação do reservatório (ver Figura 3.9).

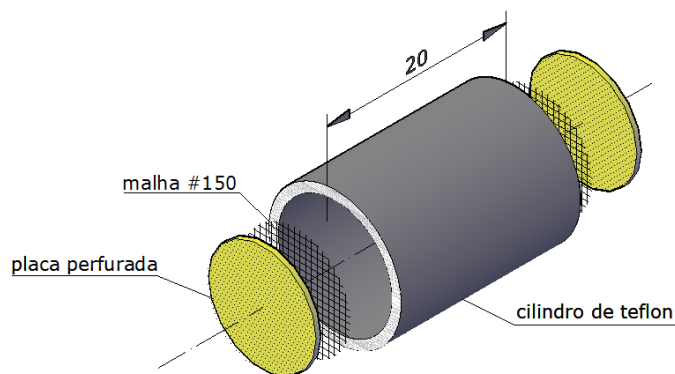


**Figura 3.9.** Corte transversal e detalhe da base do Mariotte

A saída do fluxo do Mariotte está situada na parte lateral inferior do cilindro através de uma válvula de aço inoxidável conectada a uma mangueira de silicone ( $\phi_{int} = 1/4''$ ), que conduz o fluxo até a base da coluna.

### 3.4.2. Características da coluna

O diâmetro das colunas atendeu a relação mínima de  $d/d_{10}$  de 50, recomendada para estudos de filtração de água. A finalidade do uso dessa relação é minimizar os efeitos sobre a porosidade e a distribuição de fluxo em colunas empacotadas (Knappett *et al.*, 2008).

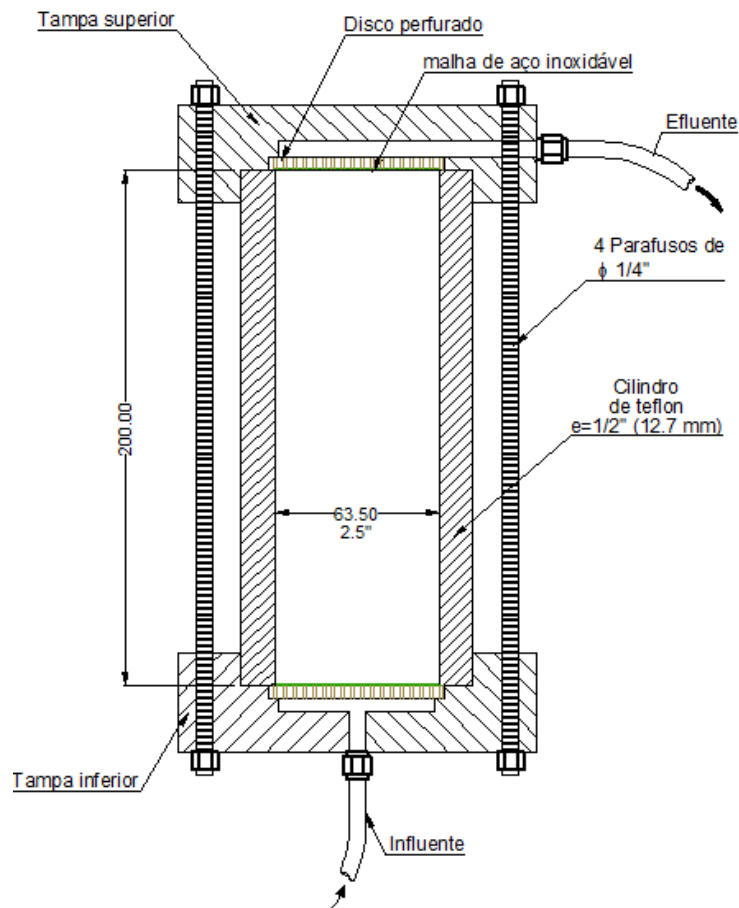


**Figura 3.10.** Esquema dos componentes da coluna

Como se observa na Figura (3.10) as colunas eram constituídas por cilindros de teflon com 6,35 cm de diâmetro interno e 20 cm de comprimento. Discos de alumínio perfurado foram colocados no topo e base das colunas para uma distribuição uniforme do fluxo e sustentação da coluna de areia. Para evitar

a perda de grãos de areia durante o funcionamento da coluna, foi utilizada uma tela de aço inoxidável com abertura de 0,109 mm (equivalente a malha #150) também no topo e base da coluna.

A base e a tampa encaixam perfeitamente nos extremos da coluna através de *O-ring's*. A válvula de ingresso do fluxo está situada no centro da tampa inferior, uma vez que a solução ingresa à base da coluna é acumulada em um espaço de dimensões relativamente pequenas antes de iniciar sua passagem através da coluna de areia. Isto permite que a solução seja uniformemente distribuída, além da placa de alumínio perfurada colocada também com este mesmo objetivo. A mesma configuração foi projetada para a tampa superior, com a única diferença que a válvula de saída está situada na parte lateral da tampa. A Figura (3.11) mostra a seção transversal da coluna completamente montada.



**Figura 3.11.** Corte transversal da coluna

Durante a montagem da coluna os comprimentos das mangueiras do influente e efluente foram mantidos constantes para todos os ensaios, para reduzir a variabilidade entre eles devido às perdas nas tubulações.

### 3.5. Ensaio Microbiológicos

Os ensaios microbiológicos foram realizados sob condições de assepsia, utilizando para isto uma capela de fluxo laminar durante a manipulação das culturas bacterianas. Os materiais usados durante os ensaios, tais como meios de cultura, vidrarias, água, etc., foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C, equivalente a uma pressão de 1 atm, por 15 a 20 minutos.

A esterilização da areia foi realizada com a finalidade de destruir a população de microrganismos com a mínima alteração das propriedades físicas e químicas do solo, sendo a esterilização com calor úmido (em autoclave) um dos métodos mais utilizados.

Com este objetivo foram colocados aproximadamente 1250 gramas de areia seca numa bandeja de vidro coberta por papel alumínio. As dimensões da bandeja permitiram que a espessura de solo já distribuído não fosse maior do que 2 cm como recomendado pelo procedimento padronizado no Methods of Soil Analysis (SSSA, 1994), permitindo a penetração de vapor durante a autoclavação. O solo foi assim, autoclavado a 0,10 MPa = 1 atm = 1 kgf/cm<sup>2</sup> a 121°C durante 1 hora. Como controle e para verificar a eficiência do processo de esterilização, alíquotas do solo já autoclavado foram retiradas com espátula estéril, colocadas em três tubos de ensaio contendo 10 mL de meio TSB cada um deles, e incubadas por 2 dias (48 horas) a 25°C não sendo observado crescimento bacteriano nestes meios.

#### 3.5.1. Correlação entre Número de Células e Absorbância

A determinação do número de células pela densidade óptica da suspensão bacteriana é um método simples, de fácil manipulação e de resposta rápida. Entretanto os valores de absorbância não resultam diretamente no número de células existentes nas culturas. Assim, para se conhecer o número de células presentes em cada uma das amostras avaliadas nas diferentes etapas de cada ensaio, a partir de determinações espectrofotométricas, é necessário estabelecer uma correlação gráfica entre o valor da densidade óptica por absorbância e o número de células de uma suspensão determinado por uma metodologia que possibilite a contagem de células, como por exemplo, a contagem em Câmara de Neubauer.

Foram estabelecidas curvas de correlação tanto para células suspensas em meio TSB, como para aquelas ressuspensas em água destilada, após



centrifugação. As análises da água usada para a saturação das colunas foram feitas para serem usadas como referência nas determinações do número de células nos efluentes dos ensaios de batelada e ADS sem a introdução do inoculo de *E. coli*.

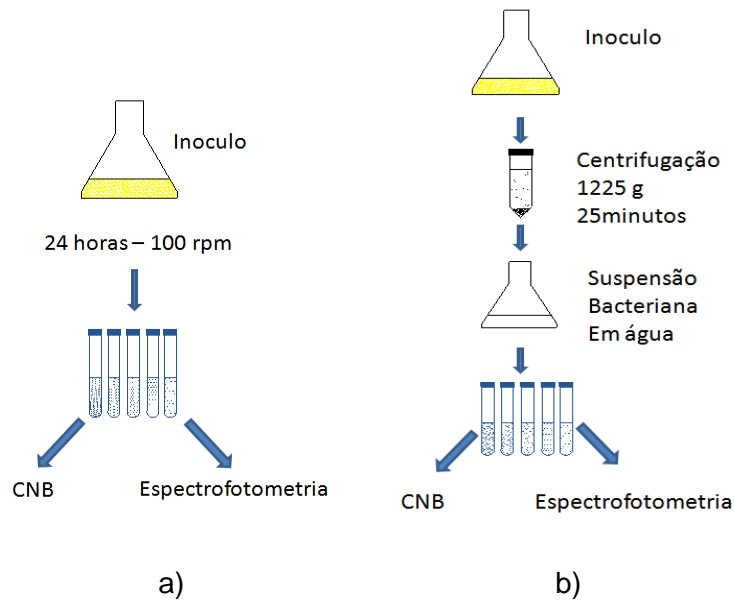
Para a obtenção de massa celular para as determinações a serem efetuadas, alíquotas de 1,5 mL de pré-inóculo de *E. coli* foram inoculadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de meio TSB estéril. Esse conjunto foi incubado em banho-maria a 25°C, com agitação constante de 100 rpm por 24 horas. Experimentos prévios, realizados no laboratório de Geotecnia e Meio Ambiente, apontaram que a massa celular da cultura de *E.coli* ATCC 11229 se estabilizava a partir de 24 horas de incubação nas condições descritas neste item.

O meio TSB apresenta uma cor amarelada e absorve melhor a luz em comprimentos de onda diferentes daqueles absorvidos com água destilada. Como, para alguns ensaios a absorbância foi determinada diretamente dos tubos de TSB com crescimento bacteriano e, em outros, as células estavam suspensas em água, foi necessário realizar a correlação entre a absorbância e o número de células nas duas condições.

No caso do estabelecimento da correlação entre o número de células e a absorbância medida diretamente em meio TSB, uma alíquota de 10 mL retirada do crescimento de 24 horas foi diluída sucessivas vezes em meio estéril, e a absorbância relativa a cada diluição lida em espectrofotômetro a 600 nm (Ling *et al.*, 2002). As mesmas diluições foram lidas em Câmara de Neubauer para a determinação da concentração celular, como se mostra na Figura 3.12 a.

Para a construção da curva de correlação entre a concentração de células e a absorbância, em amostras suspensas em água destilada, alíquotas de 10 mL do crescimento de 24 horas foram retiradas, centrifugadas a 1225 xg equivalente 3500 rpm na centrífuga *Bio Eng* Modelo BE-4000 por 25 minutos e ressuspensas no mesmo volume de água destilada, como é mostrado no esquema da Figura 3.12 b. Essa suspensão foi então diluída sucessivas vezes para a contagem de células em Câmara de Neubauer e para a leitura da absorbância a 410 nm (Foppen, *et al.*, 2005).

Com os dados obtidos foram traçadas curvas, onde se procurou estabelecer a faixa de correlação linear entre os dois parâmetros, para que as leituras dos ensaios fossem realizadas dentro desses limites de confiança, onde a Lei de Beer- Lambert é válida.



**Figura 3.12.** Esquema da metodologia seguida para a obtenção das curvas de correlação entre absorbância e a) Suspensão bacteriana em meio TSB; b) Suspensão bacteriana em água destilada

### 3.5.2. Curva de crescimento

A curva de crescimento da *E. coli* ATCC 11229 foi feita com o objetivo de conhecer a cinética do crescimento da referida bactéria sob as condições determinadas nessa dissertação. O ensaio consistiu na determinação da concentração de células para diferentes períodos crescentes de incubação.

Para a obtenção da curva de crescimento, alíquotas de 1,5 mL do pré-inóculo de 24 horas, foram introduzidas em erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de TSB estéril. Esse conjunto foi incubado em banho-maria a 25°C, com agitação constante de 100 rpm pelo período de duração do ensaio. Para cada ensaio foram feitas triplicatas desses conjuntos.

Imediatamente após o procedimento de inoculação foram, então, retiradas, de forma asséptica, em fluxo laminar, alíquotas de 5 mL de cada frasco, para determinar o número de bactérias correspondente ao tempo inicial ( $T_0$ ) e, novamente após diferentes e crescentes períodos de incubação, para a determinação do crescimento bacteriano ao longo do tempo. Esse crescimento foi avaliado através da determinação da densidade óptica, lendo-se a absorbância a 600 nm diretamente no material retirado dos erlenmeyers. Caso a absorbância lida ultrapassasse a faixa do momento linear, a alíquota era diluída até que caísse numa faixa de leitura confiável.

O ensaio foi realizado em triplicata, sendo preparados simultaneamente três inóculos e incubados paralelamente por um tempo superior a 24 horas. A concentração final de células para cada ponto da curva de crescimento é resultante do valor médio de absorbância dos três valores obtidos.

### **3.5.3. Ensaio de Sobrevivência**

O ensaio de sobrevivência da bactéria *E. coli* ATCC11229 em água destilada, foi realizado com o objetivo de estabelecer o tempo que, as células que seriam introduzidas na coluna de areia, permaneceriam na fase estacionária e, desta forma garantir que o número de células não experimentaria variações devido ao crescimento ou decaimento, durante a execução do ensaio ADS.

Consistiu na determinação do número de células viáveis coletadas do final da fase logarítmica de crescimento, ressuspensas em água destilada, através da contagem de microrganismos pela técnica de tubos múltiplos, para diferentes períodos de tempo.

Previamente foi preparado o inóculo, adicionando 1 mL do pré-inóculo em um erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL de meio TSB estéril, este conjunto foi incubado em banho maria a 25° C e 100 rpm durante 24 horas. Após 24 horas de incubação foi retirada uma alíquota de 5 mL deste crescimento para realizar determinação da biomassa através da leitura de absorbância no espectrofotômetro. Imediatamente o inóculo é transferido para tubos falcon estéreis, para ser centrifugado a 1225 xg equivalente 3500 rpm por 25 minutos. Após este tempo o sobrenadante foi descartado, e o precipitado ressuspense em 120 mL de água destilada em um erlenmeyer de 250 mL. A suspensão assim preparada foi homogeneizada, para posteriormente iniciar a preparação das diluições sucessivas, requeridas para efetuar a contagem através da técnica dos tubos múltiplos, correspondentes ao tempo  $T_0$ . Neste instante também foi retirada uma alíquota de 5 mL para controle das quantidades de células totais presentes na ressuspensão.

Uma vez realizadas as diluições sucessivas, para cada diluição considerada, foram inoculados 3 tubos contendo 10 mL de caldo *Fluorocult* para a identificação de *E. coli*, através da transferência de 1 mL para cada um dos três tubos contendo o meio específico. Finalmente os tubos são incubados em banho-maria à temperatura de 36°C. As leituras dos tubos que apresentaram crescimento são realizadas a 24 e 48 horas. Esta leitura corresponde ao tempo

inicial  $T_0$ . Posteriormente o procedimento foi repetido para diferentes períodos de tempo.

### **3.6. Ensaio de Adsorção em Batelada**

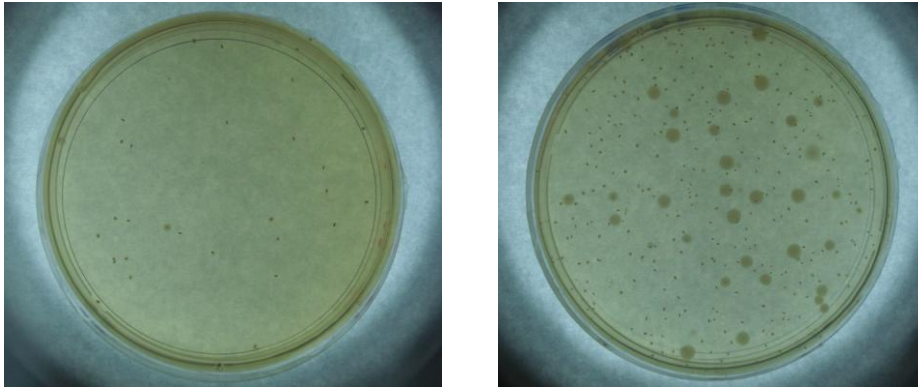
Este ensaio foi realizado com o objetivo de analisar a participação do processo de adsorção físico-química na retenção de bactérias *E. coli* na areia de quartzo, sob condições de ensaio escolhidas. Os ensaios foram executados de acordo com o procedimento indicado por Jiang *et al.*, (2007) e modificado para as concentrações de  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ , e  $10^9$  cel/mL, conforme descrito a seguir.

A areia foi homogeneizada com auxílio de uma espátula, para que fossem acrescentados 2 gramas deste material em tubos plásticos cônicos de 50 mL com tampa de rosca (tubos Falcon), procedendo em seguida à esterilização do conjunto em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 1 hora.

A massa de células de *E.coli* foi obtida a partir do crescimento do inóculo, durante 24 horas em banho-maria a  $25^\circ\text{C}$  e agitação constante de 100 rpm, preparado utilizando 1 mL de pré-inóculo em 100 mL de meio TSB. Ao final da incubação, uma alíquota de aproximadamente 5 mL era retirada assepticamente, para leitura da absorbância a 600 nm e posterior correlação entre Absorbância e Número de células, para a determinação dos volumes e das diluições da cultura bacteriana a serem utilizados para a obtenção do número de células necessário para cada concentração celular testada. Esse volume de suspensão bacteriana era distribuído em tubos falcon estéreis, centrifugação, por 25 minutos a 1225 xg equivalente 3500 rpm e ressuspensão em água destilada estéril.

Em seguida, 20 mL da ressuspensão bacteriana, preparada na concentração desejada, foram adicionados aos tubos falcon com os 2 g de areia estéril. Esse conjunto foi homogeneizado vigorosamente em um vortex durante 10 segundos e incubado a temperatura ambiente em agitação constante de 100 rpm durante uma hora. Após este período, os tubos foram centrifugados por 30 segundos a 120 xg equivalentes a 1100 rpm na centrífuga Bio Eng Modelo BE-4000. Após a centrifugação, foram retirados 10 mL do sobrenadante e colocados em outro tubo falcon de 50 mL vazio e estéril. A concentração de células neste sobrenadante foi determinada através de diluição serial para a contagem em placa com a técnica de derramamento em profundidade, conforme descrito no item 3.3.2.4. Este ensaio foi realizado em duplicata para cada concentração. A Figura 3.13 mostra a aparência das placas de Petri após o

crescimento das colônias (UFC) de *E. coli* em meio sólido TSA para duas diluições diferentes.



**Figura 3.13.** Crescimento das colônias de *E. coli* no ensaio de adsorção para diferentes concentrações iniciais

O coeficiente de partição  $K_D$  (mL/g) ou coeficiente de distribuição é um valor relativo que representa a razão entre o número de bactérias aderidas à superfície da fase sólida  $C_s$  (UFC/g) e o número de bactérias que permanece em suspensão  $C_w$ . (UFC m/L), calculado segundo a seguinte equação:

$$K_D = \frac{C_s}{C_w} \quad (3.4)$$

A concentração de células na fase sólida, a concentração de células em suspensão, e a porcentagem de adsorção  $P_a$ , são dadas pelas seguintes equações:

$$C_s = \frac{[N_t - N_s]}{W} \quad (3.5)$$

$$C_w = \frac{N_s}{V} \quad (3.6)$$

$$P_a = \frac{[N_t - N_s]}{N_t} \times 100 \quad (3.7)$$

onde  $N_t$  é o número total de bactérias adicionadas ao solo (UFC),  $N_s$  o número total de bactérias no sobrenadante (UFC),  $W$  a massa do solo utilizada (g) e  $V$  o volume de fluido na mistura (mL).

### 3.7. Ensaio Advecção-Dispersão-Sorção (ADS)

O objetivo dos ensaios ADS foi avaliar os processos de transporte da bactéria *E.coli* em areia saturada, através da obtenção da curva de chegada

(*Breakthrough curve*) para diferentes velocidades de fluxo. Os ensaios foram executados no equipamento projetado neste estudo (Figura 3.14), exclusivamente com esta finalidade e cujas características foram descritas no item 3.4.



**Figura 3.14.** Foto do equipamento utilizado no ensaio ADS

O procedimento do ensaio é semelhante ao ensaio de permeabilidade de solos granulares à carga constante, porém com percolação contínua da suspensão bacteriana em água destilada, numa concentração inicial conhecida. Na medida em que a solução permeia através do solo (areia de quartzo), o efluente é coletado e determinado o valor da concentração celular. O grande diferencial deste ensaio com outro de transporte de contaminantes, reside nos cuidados específicos que exige a manipulação da bactéria, devendo se cumprir um protocolo de esterilização antes de cada ensaio e prever qualquer tipo de contaminação externa durante o ensaio. A areia e a água destilada e componentes da coluna tais como, mangueiras, discos perfurados, malha de aço, tubo de polipropileno foram esterilizados com antecedência a cada ensaio, assim como toda a vidraria e materiais a serem utilizados.

Basicamente cada ensaio foi dividido em duas etapas: saturação da areia e injeção contínua da suspensão bacteriana, cada uma destas descritas a seguir.

### 3.7.1. Saturação da areia

O procedimento inclui a montagem do equipamento e conformação da coluna de areia.

Inicialmente o interior do frasco de Mariotte foi esterilizado utilizando uma solução de acetona, preparado assim para verter imediatamente após este tratamento, 3,5 litros de água destilada já estéril, reservada para a saturação da areia. Em seguida a tampa era colocada, e ajustados os parafusos para seu fechamento hermético, introduzindo finalmente o tubo de polipropileno.

Posteriormente a base da coluna também foi esterilizada com acetona, mantendo fechada a válvula da base da coluna e colocados o disco perfurado, a malha de aço, e o cilindro de teflon. Em seguida a mangueira de silicone era conectada na válvula de saída do Mariotte. Abrindo-se esta válvula deixava-se fluir a água destilada até que toda a mangueira estivesse preenchida e sem a presença de bolhas de ar, para finalmente ligar a mangueira à base da coluna. A partir daqui inicia-se o processo de conformação da coluna de areia.

A areia já esterilizada e previamente seca na estufa a 105°C e passada pela malha #150, foi vertida dentro da coluna em 4 camadas de aproximadamente 300 g (5 cm) com ajuda de um Becker e um funil de vidro. Antes de colocar a primeira camada de areia deixou-se fluir um volume de água equivalente ao volume de poros necessários para preencher os poros da areia desta primeira camada, considerando o volume adicional que é mantido na base da coluna. Para as camadas subsequentes, antes de colocar a camada de areia correspondente, água estéril foi adicionada aos poucos, com o auxílio de uma proveta graduada de 100 mL. Entre camada e camada foram aplicadas 25 batidas laterais na coluna. Esta prática minimizou a formação de regiões heterogêneas no empacotamento da coluna.

Concluída a conformação da coluna de areia, o topo da coluna era nivelado utilizando uma barra metálica apoiada nas bordas do cilindro, para a imediata colocação da malha de aço, disco metálico perfurado e a tampa superior da coluna. As fotografias da Figura 3.15 mostram a coluna antes de colocar a tampa superior. Finalmente eram ajustados os parafusos para o fechamento hermético da coluna, e a partir de aqui, iniciava-se a saturação da areia, através da passagem contínua de aproximadamente 4 volume de poros de água destilada, com a aplicação de uma carga hidráulica constante, determinada pela posição do tubo de polipropileno no interior do Mariotte.



**Figura 3.15.** Vista superior e lateral da coluna após do processo de conformação da coluna de areia

Concluída a saturação eram medidos o pH e a condutividade elétrica da água. E antes de dar início ao ensaio ADS propriamente, a válvula superior e inferior da coluna eram fechadas até efetuar a conexão da mangueira que permitirá a injeção da suspensão bacteriana.

### **3.7.2. Injeção contínua da suspensão de *E. coli***

Paralelamente à etapa de saturação foi preparada a suspensão de *E. coli* a ser injetada na coluna, com o objetivo de obter uma concentração da suspensão em torno de  $1 \times 10^8$  cel/mL. Esta foi considerada a concentração inicial de células injetadas para cada ensaio. Para isto, primeiro foi preparado o inóculo bacteriano de *E. coli* mediante a inoculação de 5 mL do pré-inóculo em 500 mL de meio TSB, sendo o conjunto incubado em agitação constante de 100 rpm e temperatura aproximada de 25°C. A quantidade de inóculo preparado foi determinada com base no número de células crescidas até 24 horas de incubação e em função da quantidade de células necessárias para obter a concentração inicial desejada ( $1 \times 10^8$  cel/mL). A foto da Figura 3.16 mostra o inóculo sendo incubado no banho Maria e a turvação do meio, relativa ao crescimento no final do tempo de incubação. A determinação da concentração de bactérias no inóculo foi feita através da medida de densidade óptica e posterior correlação na curva de calibração.





**Figura 3.16.** Crescimento do inóculo de *E. coli* em 500 mL de meio de cultura TSB

Após o crescimento, o inóculo foi distribuído uniformemente em tubos falcon estéreis de 50 mL de capacidade, para serem centrifugados, sob condições assépticas, a 1225 xg equivalente 3500 rpm por 25 minutos. Através desse processo as células são precipitadas no fundo do tubo e desse modo a suspensão separada em material precipitado e o sobrenadante. Após a centrifugação o sobrenadante era descartado assepticamente em algum recipiente dentro da capela de fluxo laminar. Em seguida as células precipitadas eram ressuspensas com auxílio de um agitador mecânico (vortex), adicionando-se 1 ou 2 mL de água destilada estéril. Após a total ressuspensão do precipitado, era acrescentada água destilada para completar um volume de 500 mL de suspensão bacteriana.

Todos os 500 mL da suspensão bacteriana eram colocados no interior do Frasco de Mariotte, previamente desinfetado com uma solução de acetona e com o bastão magnético no interior. Imediatamente depois era adicionada água estéril até completar os 4 litros de suspensão de *E. coli*. O reservatório então era fechado e a altura do tubo regulada em função do gradiente a ser imposto, de acordo com cada ensaio. A partir deste momento era ligado o agitador magnético para a homogeneização contínua dos 4 litros de suspensão bacteriana a ser injetada na coluna de areia.

Antes do início da injeção da suspensão bacteriana, porém, e encontrando-se a coluna já saturada, todas as válvulas eram fechadas para proceder-se à troca da mangueira utilizada para a saturação da coluna, por outra que conduzia a suspensão de bactérias do Mariotte até a base da coluna. Da mesma forma que durante a etapa de saturação a mangueira era colocada de forma a evitar a formação de bolhas de ar. A partir de aqui o equipamento estava

preparado para iniciar a passagem contínua da suspensão de *E. coli* através da coluna de areia. A injeção da suspensão bacteriana foi efetuada de forma contínua, passando entre 12 e 14 volume de poros, variando de acordo com cada ensaio. A duração de cada ensaio foi determinada pela forma da curva de chegada (*Breakthrough curve*) quando a concentração normalizada ( $C/C_0$ ) tornava-se constante.

O fluxo foi medido frequentemente durante todo o ensaio (aproximadamente a cada 10 minutos), com o objetivo de controlar o volume de saída do efluente da coluna e de forma simultânea observar o comportamento da condutividade hidráulica durante a injeção da suspensão bacteriana. Para tal, utilizou-se uma proveta graduada e um cronômetro, sendo calculado o valor da vazão ( $Q$ ) através da relação Volume/ Tempo. Posteriormente, com o valor do gradiente hidráulico constante ao longo da execução do ensaio e através da Lei de Darcy, foram calculados os valores de velocidade de Darcy ( $v_d$ ) e condutividade hidráulica ( $K_s$ ).

Durante todo o ensaio o agitador magnético se manteve em contínuo funcionamento e na mesma velocidade de agitação, isto com a finalidade de causar o mínimo de interferências no fluxo de saída.

A coleta de amostras foi realizada em provetas de vidro graduadas, de 25 mL, previamente esterilizadas. O volume coletado foi de 15 mL a intervalos de 15 ou 30 minutos variando em função do gradiente imposto. Para a determinação da concentração do efluente, foi medida a absorvância no espectrofotômetro, durante cada intervalo de amostragem. Uma vez lida a absorvância as amostras foram mantidas na geladeira para a um posterior controle através da contagem na câmara de Neubauer seguindo o procedimento detalhado no item 3.3.2.1.

É importante salientar que foi realizado um controle da concentração do influente da coluna, extraindo para isso, com uma seringa, uma alíquota da mangueira no setor de saída do Mariotte e lida a absorvância para posterior correlação na curva de calibração. Esse controle foi feito em decorrência que é assumido que o valor da concentração inicial é mantido constante durante a totalidade do ensaio.

Para a determinação da densidade seca total do solo ( $\rho_{Bulk}$ ) uma vez desmontada a coluna, a areia foi esterilizada e depois seca na estufa a 105°C, para a obtenção do peso seco. Sendo conhecido o volume ocupado pela areia, o valor da densidade seca total foi calculado dividindo o peso da areia seca entre o volume da coluna.

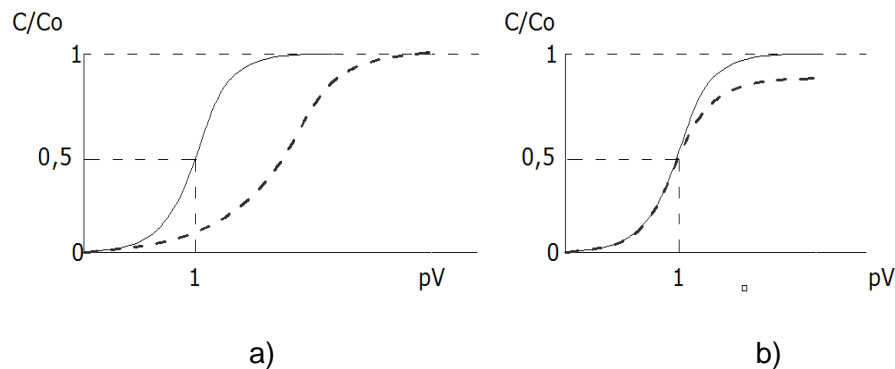
### 3.7.3. Obtenção das curvas de chegada

Como foi explicado na revisão bibliográfica, o transporte de biocolóides através de um meio poroso saturado é representado matematicamente através da equação (2.5). A solução analítica desta equação, proposta por Ogata e Banks (1961), citada em Azevedo *et al.* (2002), é apresentada a seguir:

$$\frac{C}{C_o} = \frac{I}{2} \left[ \operatorname{erfc} \left( \frac{RL - vt}{2\sqrt{D_h t R}} \right) + \exp \left( \frac{vL}{D_h} \right) \operatorname{erfc} \left( \frac{RL + vt}{2\sqrt{D_h t R}} \right) \right] \quad (3.8)$$

onde  $L$  é o comprimento da coluna de solo,  $\operatorname{erfc}$  é a função de erro complementar,  $R$  o fator de retardamento,  $D_h$  a dispersão hidrodinâmica,  $t$  o tempo e  $v$  a velocidade intersticial.

A representação gráfica da equação de transporte ADS equação (2.5) é denominada curva de chegada ou curva de transporte (*Breakthrough curve*), a forma da curva e mostrada na Figura 3.17.



**Figura 3.17.** Linha contínua - Forma da curva de chegada sem retardamento nem decaimento; Linha tracejada - a) Forma da curva de chegada com retardamento b) Forma da curva de chegada com decaimento

O valor de retardamento pode ser obtido da curva de transporte, assumido como igual ao valor de volume de poro  $PV$ , correspondente à concentração relativa ( $C/C_o$ ) igual a 0,5 na curva de chegada. Esta suposição foi definida a partir da solução analítica apresentada na equação (3.8), na qual se negligencia o segundo termo do lado direito da equação e substituindo alguns termos da mesma, tem-se, segundo explicação matemática mostrada por Azevedo *et al.* (2002):

$$\frac{C}{C_o} = \frac{1}{2} \operatorname{erfc} \left[ (R-T) \left( \frac{P}{4RT} \right)^{\frac{1}{2}} \right] \quad (3.9)$$

onde  $T$  é igual a  $v \cdot t/L$  e  $P$  é igual a  $v \cdot L/D_h$ . Tomando  $T=R$  na equação (3.9), o argumento da função de erro complementar toma-se nulo e a função é, então, igualada à unidade. Assim tem-se a concentração relativa igual a 0,5. Na determinação do coeficiente de dispersão hidrodinâmica, para o ponto de concentração relativa de 0,5 é traçada uma tangente a este ponto. Com isto é possível estabelecer o valor de  $b$ , como dado por Azevedo *et al.* (2002):

$$\left( \frac{d(C/C_o)}{dT} \right)_{T=R} = b = \sqrt{\frac{v_x L}{4\pi R D_h}} \quad (3.10)$$

A equação acima mostra que a representação matemática do lado esquerdo da equação nada mais é do que uma derivada, obtida a partir da equação (3.9). Observa-se, portanto, que o valor de  $b$  é a tangente tomada na curva de chegada na concentração relativa de 0,5. Com o valor  $b$  é possível, a partir da igualdade mostrada na equação (3.10), obter o coeficiente de dispersão hidrodinâmica, dado por:

$$D_h = \frac{v_x L}{4\pi R^2 b^2} \quad (3.11)$$

### 3.8. Ensaio de controle

No final dos ensaios ADS observou-se a necessidade de realizar alguns controles com uma forma de verificar os procedimentos realizados e auxiliar na posterior análise dos resultados.

Foi realizado o controle da concentração de ingresso da suspensão durante os últimos ensaios ADS, aproximadamente na metade e no final do ensaio, através da retirada de alíquotas de aproximadamente 5 mL, com a utilização de uma seringa, para a posterior determinação da concentração inicial mediante a medida da densidade óptica e posterior correlação entre absorvância e número de células.

Um segundo controle foi realizado, imediatamente após a finalização do ensaio ADS, que consistiu na determinação da concentração de bactérias retidas na areia e a distribuição granulométrica dos grãos de areia, ao longo da coluna.

Para isto, foram determinados três pontos de amostragem, na base, na metade e no topo da coluna (este controle foi realizado para o ensaio ADS 1).

Para a retirada das amostras de forma asséptica, a coluna foi levada para a capela de fluxo laminar, onde foi cuidadosamente desmontada. Uma vez retirada a tampa superior, foram coletadas as amostras de areia do topo da coluna, em torno de 1 grama para a determinação da concentração de bactérias e aproximadamente 100 gramas para a análise granulométrica. A seguir foi colocada uma tampa de encaixe perfeito no interior da coluna, ocupando o espaço deixado pela areia que foi retirada, e assim, a coluna foi virada para a obtenção das amostras correspondentes à base, e por último à metade da coluna, da mesma maneira como foi feito no topo da coluna. Imediatamente depois foram realizadas as diluições sucessivas requeridas para a aplicação da técnica dos Tubos múltiplos e para determinar as concentrações da bactéria na areia. Posteriormente, foi obtida a curva granulométrica mediante peneiramento para cada ponto de amostragem através do procedimento padronizado pela Norma Brasileira ABNT/NBR 7181/84.

Finalmente, uma vez concluídos todos os ensaios programados, foi realizado um último ensaio, que permitiu determinar o diâmetro médio dos poros da coluna de areia. Dessa forma, foram montadas quatro colunas de areia com densidade seca média de  $1,74 \text{ g/cm}^3$ , em cilindros de acrílico de dimensões de aproximadamente 6 cm de diâmetro interno e 9 cm de comprimento. Os cilindros foram colocados dentro de uma bandeja, cada um deles disposto sobre uma pedra porosa e papel filtro situado na base do cilindro de areia.

No início do ensaio, a bandeja foi preenchida com água de forma que a pedra porosa fosse totalmente coberta para a água começar a ascender nas colunas, por capilaridade. Depois de observada a estabilização foi medida a altura de capilaridade  $h_c$ . Considerando a média dessa altura foi calculado o diâmetro médio  $d_m$  de poro conforme a equação seguinte:

$$d_m = \frac{\delta}{h_c g} \quad (3.12)$$

onde,  $\delta$  é a tensão superficial da água  $0,0728 \text{ N/m}$  a  $20^\circ\text{C}$  (valor extraído de Myers, 1999), e  $g$  a aceleração da gravidade ( $9,81 \text{ m/s}^2$ ).