

5 ESTUDOS EM LABORATÓRIO SOBRE A INFLUÊNCIA DO CALOR NA MICROBIOTA DO SOLO

5.1. Introdução

Os ensaios relacionados ao estudo da microbiota foram realizados com amostras de solo extraídas diretamente do CE-01 e consistiram em:

1. Determinação do teor de umidade;
2. Determinação do teor de matéria orgânica;
3. Contagem de bactérias cultiváveis e viáveis;
4. Determinação das atividades metabólicas;
5. Simulação da dessorção térmica em laboratório;
6. Tentativas de recuperação do solo após a aplicação de calor.

Estes ensaios, realizados no **Laboratório de Microbiologia**, anexo ao **Laboratório de Geotecnia e Meio Ambiente da PUC-Rio**, contaram com o fundamental apoio da bolsista microbióloga **Anna Carolina Magdaleno**, sob supervisão da professora **Denise Maria Mano Pessôa**.

No dia 23 de janeiro de 2006, amostras naturais de solo do CE-01 foram coletadas sob profundidades de 20 e 40 cm a partir de anéis de ponta biselada cravados. Estes anéis, por sua vez, foram acondicionadas em frascos previamente esterilizados para, em seguida, serem tampados adequadamente de forma a sofrerem o mínimo de contato possível com o meio externo durante o seu transporte até o laboratório. Estas amostras foram ensaiadas de acordo com os itens 1 a 4.

Já as sub-amostras retiradas do bloco de solo indeformado, extraído do CE-01, estavam sob a faixa de 50 a 80 cm de profundidade. Porém, como havia material suficiente, além dos itens 1 a 4 também foram feitas simulações da aplicação da

dessorção térmica a partir da utilização de uma Mufla de Ball. Logo, puderam-se comparar os resultados antes e após a aplicação de calor.

Por fim, foram realizadas algumas tentativas em se recuperar este solo, sob o ponto de vista da sua aptidão à existência de novos seres vivos, a partir de combinações de adição de água, nutrientes inorgânicos e orgânicos.

Estes ensaios e seus respectivos resultados e comentários estão mostrados a seguir.

5.2. Procedimentos adotados

A seguir, serão apresentados os materiais e métodos utilizados para cada um dos ensaios.

5.2.1. Determinação do Teor de Umidade

- Três amostras deformadas são acondicionadas em frascos destampados e deixadas por 24 horas em estufa a 110°C;
- Compara-se a massa de solo antes e depois e, com isso, determina-se a massa de água contida no solo e a sua massa seca (as pesagens são realizadas em balança com precisão de 0,1g);
- O teor de umidade será a média aritmética das três divisões entre massa de água e massa seca das amostras.

5.2.2. Determinação do Teor de Matéria Orgânica

- Três amostras de solo seco são acondicionadas em frascos destampados e deixadas por 4 horas em uma mufla de Ball a 400°C.
- Compara-se a massa de solo seco antes e depois e, com isso, determina-se a massa orgânica ausente nas amostras (as pesagens são realizadas em balança com precisão de 0,1g);

- O teor de matéria orgânica será a média aritmética destas três determinações.

5.2.3.

Contagem de Microrganismos Viáveis e Cultiváveis

Chamada de UFC – Unidade Formadora de Colônias, a técnica utilizada foi a de derramamento em profundidade ou “*Pour Plate*”, segundo Brock et al (1994).

- Uma amostra de solo (01 grama) é suspensa em água estéril e diluída sucessivamente (diluições de 10 vezes);
- Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição é colocada em uma placa de *petri* estéril e vazia;
- Sobre esta placa é derramado um meio sólido (TSA 10%), previamente fundido e mantido sob uma temperatura de aproximadamente 56°C, com o auxílio de um fogo a gás;
- São feitas triplicatas para cada diluição;
- Após uma semana de incubação sob temperatura ambiente, contam-se as colônias de microrganismos com o auxílio de uma lupa acoplada a um transluminador.
- Somente são aproveitadas como resultado as placas que contêm entre 30 e 300 colônias. As demais são descartadas;
- Todas pesagens são realizadas em balança com precisão de 0,1g.

5.2.4.

Atividade Microbiana Total

A atividade microbiana total foi determinada por meio da hidrólise de Diacetato de Fluoresceína (FDA), como proposto por Adam & Duncan (2001). O seu princípio preza que este diacetato, inicialmente incolor, seja hidrolisado por enzimas livres do material liberando então a fluoresceína que, por sua vez, é colorida. Este produto final absorve fortemente um comprimento de onda visível (490 nanômetros) que pode ser medido por meio de espectrofotometria.

Seu procedimento descreve que:

- Pesam-se 2 gramas de solo peneirado em *erlenmeyers* com capacidade de 50 mL;
- São acrescentados 15 mL de “solução tampão” fosfato 60nm e, exceto nos “brancos” das amostras, 200µL de “solução estoque” de diacetato de fluoresceína (FDA) 1.000µg/mL;
- O conjunto é incubado em agitação orbital a 100 rotações por minuto, por 20 minutos a 30°C;
- Após a incubação, são acrescentados 15mL de solução Clorofórmio/Metanol (2:1) para que a reação seja interrompida;
- A seguir, amostras são centrifugadas a 2.000 rotações por minuto durante 3 minutos;
- O sobrenadante é filtrado em papel Whatmann n°02, a partir do qual mede-se a sua absorbância em espectrofotômetro a 490 nanômetros.
- Para o cálculo da concentração de fluoresceína em cada uma das amostras, é feita uma curva padrão por meio da diluição de uma “solução estoque” de fluoresceína 2.000 µg/mL em “solução tampão” fosfato 60 nanômetros. Esta curva é linear, do tipo $y = ax + b$. Logo, determina-se o FDA;
- Todas as pesagens são realizadas em balança com precisão de 0,1g.

5.2.5.

Simulações da Dessorção Térmica em Laboratório

- Amostras indeformadas pesando cerca de 500 gramas e sub-amostras menores, sob umidade natural, são acondicionadas em frascos destampados e colocadas em uma mufla de Ball, onde são submetidas a 400°C por 24 horas.
- Pesam-nas antes e após a aplicação do calor;
- Após os ensaios elas são imediatamente levadas para os ensaios de microbiologia.

5.2.6.

Recuperação do Solo

Após serem retiradas da mufla de Ball, e verificada quase nulidade em seus números de microrganismos e respectivas atividades metabólicas, dois tipos de

tratamento foram realizados, como tentativas de se melhorar a aptidão destas amostras de solo a novos seres vivos:

5.2.6.1. Adição de água

De acordo com estudos anteriores, Mano (2006) observou que a quantidade ótima de água destilada a ser adicionada às amostras de solo corresponde a 20% do seu teor de umidade.

5.2.6.2. Adição de nutrientes inorgânicos

Os nutrientes inorgânicos a serem introduzidos nas amostras de solo, sob as mesmas proporções, são os N-P-K (nitrogênio, fósforo e potássio), sob a forma de 2,26 g/kg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,21 g/kg de KH_2PO_4 , segundo Evans et al (2004). As soluções são preparadas e esterilizadas em autoclave.

5.2.6.3. Adição de nutrientes orgânicos

O nutriente orgânico introduzido nas amostras de solo, após o 134º dia, corresponde à glicose.

5.3. Resultados e Comentários

Para as amostras coletadas em janeiro de 2006, os resultados obtidos foram os seguintes:

Tabela 5.1 – Resultados das amostras de solo superficiais

Tipo	Prof. (cm)	Teor de Umidade (%)	Teor de Matéria Orgânica (%)	UFC (nº microrganismos/ grama de solo seco)	FDA (µg fluoresceína/grama de solo seco)
Solo #1	20	16,52	n/d	$4,21 \times 10^6$	11,181
Solo #2	40	15,65	n/d	$23,10 \times 10^6$	5,020

Considera-se que estes sejam os dados naturais do solo do CE-01, indicando uma baixa concentração de microrganismos e uma baixa atividade metabólica. Isto pode ser, principalmente, pelo fato deste solo mais superficial ser típico de aterro e, portanto, com maior concentração de material inerte. Além disso, sua umidade é baixa, o que também dificulta a sobrevivência de seres vivos no local.

Para as sub-amostras extraídas do bloco de solo indeformado, não se têm os dados imediatamente após a aplicação de 400°C pela mufla. Porém, antes delas serem aquecidas, foram obtidos os seguintes resultados:

Tabela 5.2 – Resultados de sub-amostra do bloco de solo antes de ser levada à mufla

Tipo	Prof. (cm)	Teor de Umidade (%)	Teor de Matéria Orgânica (%)	UFC (n° microrganismos/ grama de solo seco)	FDA (µg fluoresceína/grama de solo seco)
Bloco	50-80	14,89	1,10	n/d	n/d

Tanto o UFC, quanto o FDA não foram determinados para esta sub-amostra. Porém, para efeitos de comparação, podem ser considerados os dados do Solo #2, devido a sua maior proximidade com a faixa de solo de onde foi extraído o bloco (entre 50 e 80 cm) no CE-01.

Por outro lado, conforme se observou ao longo do Capítulo 2 do presente trabalho, tem-se o fato de que, quanto maior a profundidade do solo, menor é a presença de microrganismos, o que indica que, possivelmente, estas quantidade e atividade metabólica sejam ainda mais baixas.

Após as amostras terem sido deixadas por 24 horas na mufla, sob 400°C, considerou-se que os seus UFCs e FDAs eram nulos ou muito próximos de zero (abaixo dos limites de sensibilidade de detecção). Logo, iniciaram-se as tentativas de se recuperá-las introduzindo-se água e nutrientes inorgânicos (N-P-K), conforme mostra a Tabela 5.2 a seguir.

Tabela 5.3 – Resultados das tentativas de recuperação das sub-amostras do bloco de solo indeformado (entre 50 e 80 cm de profundidade) após serem postas na mufla

Tipo de recuperação	Nº dias após a queima	Teor de Umidade (%)	Teor de Matéria Orgânica (%)	UFC (nº microrganismos/ grama de solo seco)	FDA (µg fluoresceína/grama de solo seco)
20% w	01	13,52	n/d	0,00367x10 ⁶	0,88
	08	13,79		n/d	0,38
	19	12,48		3,44x10 ⁶	0,94
	33	13,33		3,73x10 ⁶	1,09
	119	12,81		4,22x10 ⁶	0,35
	134	n/d		n/d	0,83
20% w + NPK	01	15,12		0,024x10 ⁶	n/d
	08	15,42		n/d	0,78
	19	14,21		0,167x10 ⁶	0,98
	33	13,97		3,38x10 ⁶	1,49
	119	13,82		0,855x10 ⁶	0,23
	134	n/d		n/d	2,77
20% w + NPK	01	14,41		n/d	2,04
	08	13,95		n/d	0,73
	19	13,70		10,1x10 ⁶	1,00
	33	13,70		n/d	1,20
	119	12,82		1,91x10 ⁶	0,35
	134	n/d		n/d	2,73
Valores médios de (20% w +NPK)	01	14,76		0,024x10 ⁶	2,08
	08	14,69		n/d	0,76
	19	13,96		0,167x10 ⁶	0,99
	33	13,97		3,38x10 ⁶	1,35
	119	14,34		1,38x10 ⁶	0,29
	134	n/d		n/d	2,75

A seguir, foram plotados gráficos relacionando as determinações acima e o tempo, os quais estão apresentados nas Figuras 5.1 e 5.2 a seguir.

Recuperação das Unidades Formadoras de Colônia

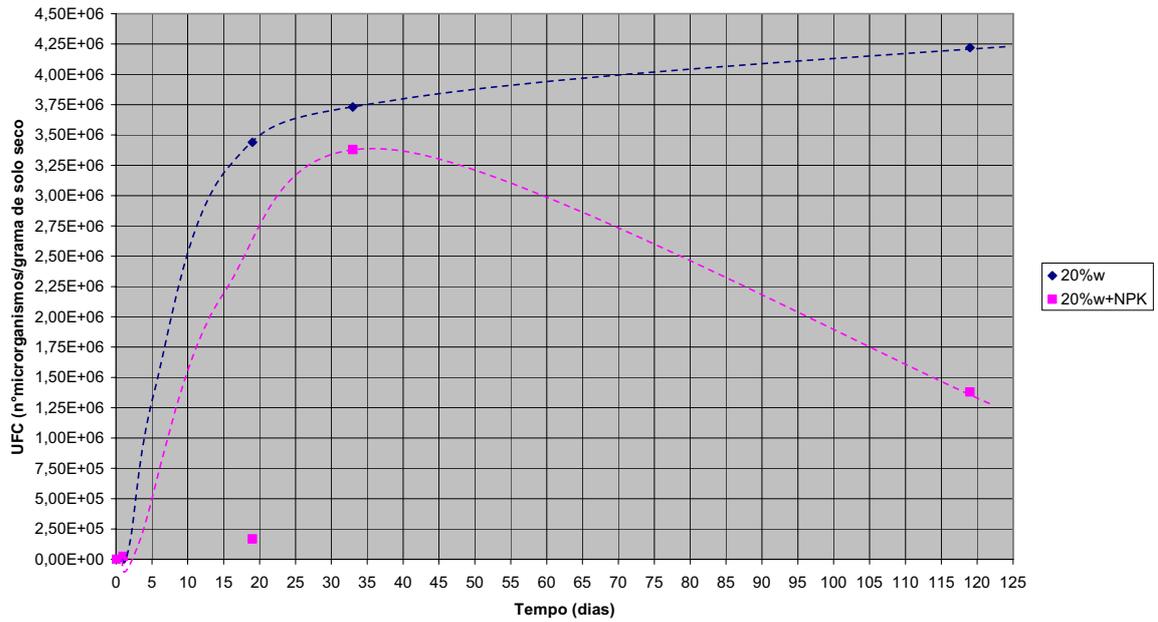


Figura 5.1 – Gráfico UFC versus tempo

Diacetato de Fluoresceína (FDA)

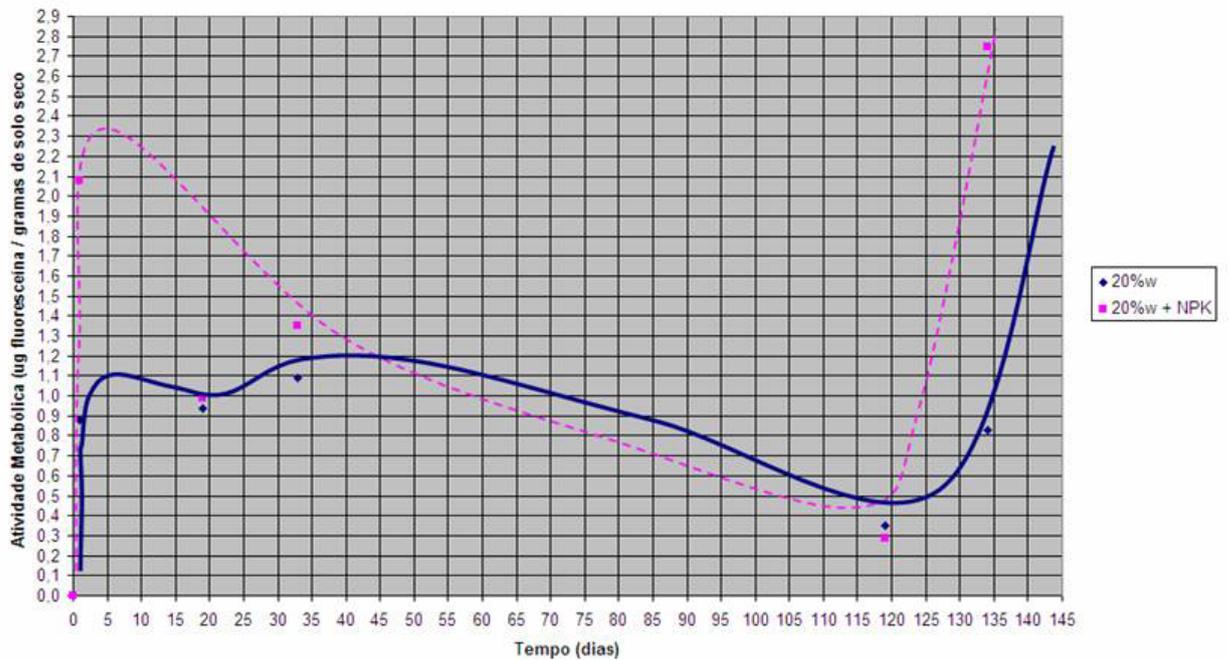


Figura 5.2 – Gráfico FDA versus tempo

Os gráficos indicam tendências de comportamento da microbiota nas amostras de solo. O primeiro indica que, apenas com água, o número de microrganismos tende a crescer ao longo do tempo, diferentemente do meio de cultura que contém água e NPK que, após mais de quatro semanas, tende a diminuir. Já as atividades metabólicas de ambos os meios decrescem após certo tempo, sendo que, quando só há água, essa atividade se mantém por mais tempo, indicando uma correspondência com o gráfico anterior. Porém, após a adição de nutrientes orgânicos (após o 134º dia), observou-se uma tendência em se recuperarem as atividades metabólicas do solo.

Alguns dados entre as datas marcadas não puderam ser determinados. Já os dados correspondentes aos 08 dias sofreram contaminação e, portanto, tiveram que ser descartados.

Apesar disso, ainda foi possível se obterem algumas conclusões acerca dos resultados apresentados.

1. De acordo com os valores de UFC, ocorre a revitalização do solo em aproximadamente 03 semanas e, após isso, uma tendência à estabilização;
2. De acordo com os resultados de FDA, inicialmente ocorre uma recuperação da atividade metabólica. Porém, com o passar do tempo, ocorre uma perda gradual desta atividade, o que pode ser explicado pela falta de matéria orgânica no solo, apesar dos microrganismos permanecerem viáveis no solo.
3. Após a injeção de glicose (nutrientes orgânicos), os níveis de FDA do solo se aproximaram muito dos observados no solo original.

Para próximas atividades, sugere-se que:

1. Teste de recuperação com nutrientes orgânicos (palha, restos vegetais, melaço, compostos orgânicos ou solo não tratado);
2. Teste de recuperação com combinações entre duas ou mais soluções, entre água, nutrientes inorgânicos e nutrientes orgânicos.