

# **ANÁLISE MECÂNICA E AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SOLOS MELHORADOS COM ENZIMAS PARA APLICAÇÃO EM PAVIMENTAÇÃO**

## **MECHANICAL ANALYSIS AND MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF ENZYME IMPROVED SOIL FOR USE ON PAVEMENTS**

Malko, José Adriano Cardoso; *PUC-Rio, Rio de Janeiro, Brasil, adrmalko@gmail.com*  
Österreicher-Cunha, Patricia; *PUC-Rio, Rio de Janeiro, Brasil, osterr@esp.puc-rio.br*  
Casagrande, Michéle Dal Toé; *PUC-Rio, Rio de Janeiro, Brasil, michele\_casagrande@puc-rio.br*

### **RESUMO**

Nesta pesquisa, estudou-se a utilização de enzimas em diferentes solos, buscando seu melhoramento. Foi utilizado um simulador de tráfego portátil (Load Wheel Test) para avaliar as características resistência-deformação. Foram investigados três solos lateríticos e três tipos de enzimas, com o solo no estado puro e tratado com variações na dosagem de aplicação das enzimas, bem como em diferentes tempos de cura. Na avaliação microbiológica foram montados microcosmos contendo os solos na condição natural, que constituíram os controles. Foram analisados a atividade microbiana de degradação, populações bacterianas cultiváveis e formação de biofilme dos solos. As enzimas foram efetivas no aumento de resistência dos solos, onde quanto menor for a dosagem das enzimas, melhor será o comportamento da mistura, porém os resultados mecânicos não estão diretamente ligados ao teor em matéria orgânica dos solos, nem à maior atividade microbiana, nem à capacidade de formar biofilme da população.

### **ABSTRACT**

The present research evaluated the use of additive application to soils aiming for their stabilization. For this study, a portable traffic simulator (Load Wheel Test) was used to determine the effect of compression and their deformation characteristics. Three different types of soils were investigated with three different types of enzymes - soil samples in their natural state, treated with three enzyme dosage variations and four curing times. Tests were subsequently conducted to evaluate the effect of enzyme solutions on the autochthonous microbial populations of the studied soils. In both the natural soils and the microcosm samples were analyzed microbial degrading activity, culturable bacterial population and biofilm soil formation. The lower the dosage of the enzymes, the better the behavior of the mixture and enzymes were effective in soil strength increase for all cases, but the mechanical results are not directly related with the content of soil organic matter, or the higher microbial activity or the ability of the population to form biofilms.

### **1 - INTRODUÇÃO**

O tema estabilização de solos com aditivos patenteados (enzimas) na pavimentação é um assunto, pelo menos no Brasil, desprezado pela maioria dos engenheiros rodoviários. Esses agentes estabilizantes que ninguém sabe ao certo suas formulações especiais e secretas, mas que estão sobrevivendo desde o início do século passado, década após década, à rejeição por parte dos estudiosos da área, vêm atualmente sendo disponibilizados através de centenas de produtos num mercado mundial que se torna bastante lucrativo e está em franca expansão.

Produtos nacionais e importados estão sendo extensivamente comercializados, principalmente para órgãos municipais e estaduais além da iniciativa privada, os quais muitas vezes desperdiçam consideráveis recursos devido ao mal desempenho gerado pela aplicação deficiente do aditivo. Incompatibilidade de materiais, ou outra causa, afetam a credibilidade desses inovadores agentes específicos para a importante e necessária ação de melhoria da qualidade dos solos para fins de construções civis.

Os aditivos, como agentes estabilizantes, estão cada vez mais sendo utilizados, inclusive indiscriminadamente e, com frequência, investimentos destinados a obras não têm o retorno esperado. Produtos com o potencial e as características desses novos materiais, os quais podem ser usados para melhorar as propriedades de engenharia de solos do próprio local onde a obra será concebida, é o sonho de qualquer engenheiro.

Tentar entender e solucionar o desafio, pelo menos até o presente momento, é de importância crucial. O maior problema que se enfrenta com relação à eficácia ou desempenho desses materiais é a avaliação técnica. Vários grupos de estudo vêm se interessando no assunto.

Todos os tipos distintos de ensaios convencionais já foram utilizados; ora endossam, ora não, ou seja, não conseguem caracterizar as propriedades destes aditivos não convencionais (Rauch et al., 2002; Andrew et al., 2003; Brandon et al., 2009). Pelo menos até o presente momento não se tem notícia de algum tipo de ensaio ou teste apropriado que reproduza adequadamente o desempenho de solos melhorados com enzimas nas condições de campo.

Muitos autores têm interesse nestes relativamente novos agentes estabilizantes e já tentaram (e tentam) ainda que sem sucesso, propor novas metodologias de avaliação (Martin et al., 2003; Jones, 2003; Petry e Khaled, 2003; Visser, 2007).

Trabalhar e desenvolver mais este assunto é imprescindível, pois o país precisa melhorar muito suas estradas, principalmente e em especial as vicinais, por onde escoam todas as riquezas de origem agrícola (Brazetti, 2013).

A necessidade de elucidar fenômenos importantes na área de geotecnia vem gerando estudos sobre o papel da química e da mineralogia nas propriedades e no comportamento dos solos; no entanto, poucos estudos avaliam a extensão, a importância e a utilidade dos processos biológicos na engenharia e geo-engenharia. Os microrganismos do solo têm um papel primordial nos ciclos bio-geo-químicos, sendo responsáveis pela ciclagem dos compostos orgânicos no ambiente. Dessa forma, influenciam os ecossistemas na superfície contribuindo para a manutenção da fertilidade do solo, a nutrição e a saúde dos vegetais, assim como na estrutura do solo. Considerando os avanços recentes da microbiologia ambiental, torna-se relevante avaliar a importância de estudos nas interfaces entre geotecnia e biologia que podem ser úteis na pesquisa e na prática da engenharia (Holden & Fierer, 2005, Mitchell & Santamarina, 2005).

Neste contexto, a presente pesquisa é de extrema relevância, pois a matéria prima, o solo, é um recurso natural abundante e barato, o que justifica plenamente seu uso como material de construção rodoviária, sem contar o benefício proporcionado na minimização do impacto ambiental causado por extrações de materiais mais nobres como britas e areias.

## 2 - MATERIAIS UTILIZADOS

### 2.1 - Solos

Os solos estudados são procedentes de uma jazida localizada no bairro Parque Capivari, no município de Duque de Caxias na região metropolitana da capital do Rio de Janeiro (Figura 1 e Figura 2).

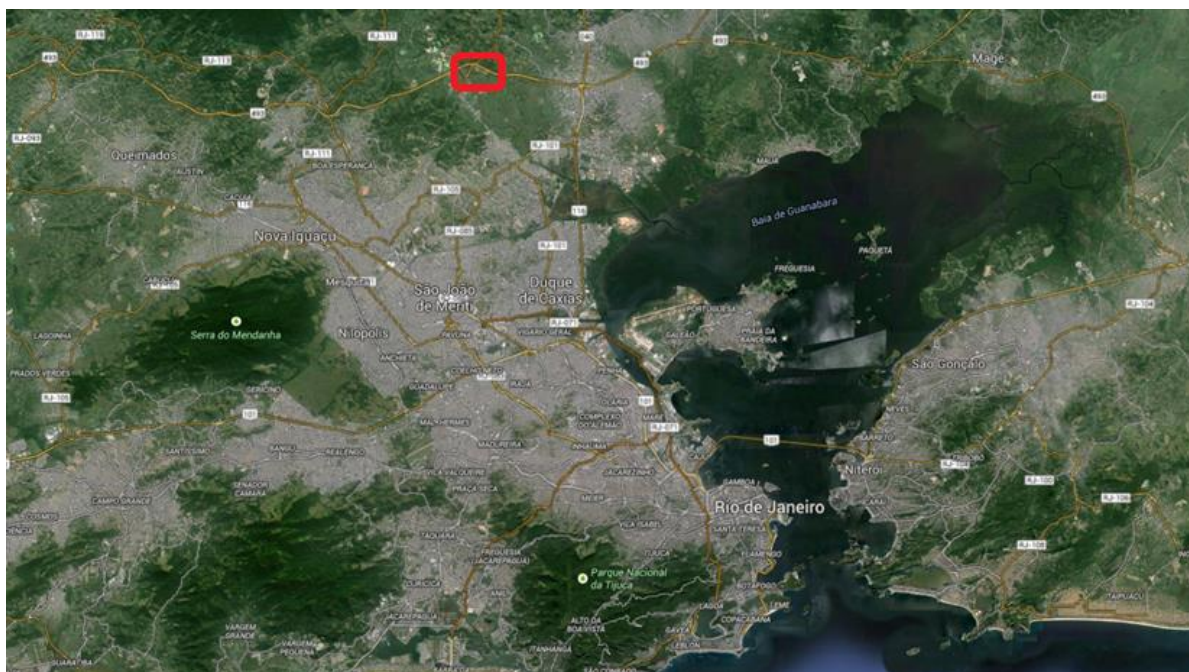


Figura 1 - Localização da jazida onde foram retirados os solos do presente estudo

Esta jazida foi utilizada para retirada de solos para a construção da Rodovia Raphael de Almeida Magalhães, conhecida como Arco Metropolitano do Rio de Janeiro (que pode ser identificado na Figura 2), importante obra rodoviária para a cidade do Rio de Janeiro com a missão de desviar o intenso tráfego de veículos que atravessam o município, diminuindo assim os congestionamentos nas principais vias de acessos à cidade.

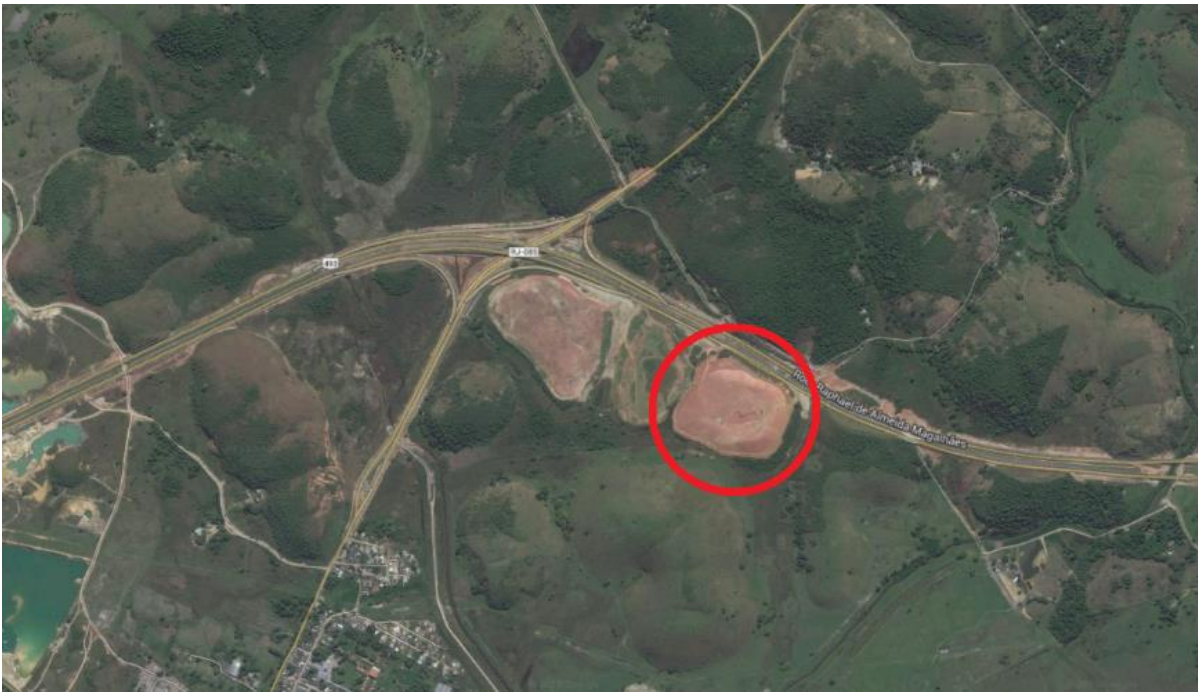
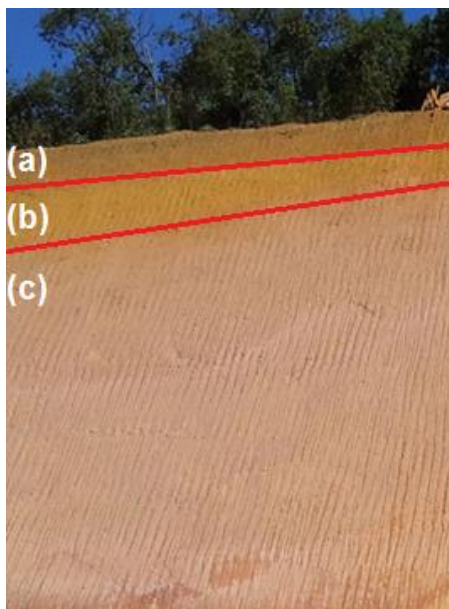


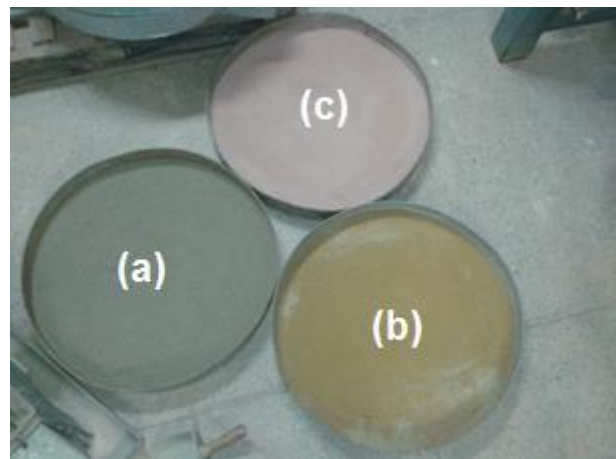
Figura 2 - Detalhe da jazida onde foram retirados os solos do presente estudo

Pela jazida ter sido utilizada apenas para a obra do Arco Metropolitano, justifica-se sua escolha na presente pesquisa, visto que pode-se avaliar o comportamento de um material que estava justamente sendo utilizado em uma obra rodoviária.

Foram coletados três diferentes tipos de solo de um mesmo perfil como pode ser visto na Figura 3(1) e 3(2).



(1)



(2)

Figura 3 - Perfil com os três diferentes solos desta pesquisa (1) e prontos para início dos ensaios em laboratório (2)

(a) Solo preto

(b) Solo amarelo

(c) Solo vermelho

## 2.2 - Enzimas

Os produtos enzimáticos utilizados na presente pesquisa, foram obtidos junto às empresas que os comercializam no Brasil, são produtos patenteados, comercializados sob a forma líquida. Para uma melhor identificação, serão utilizadas as siglas TZ, PZ e EMC respectivamente ao longo do trabalho. Na Figura 4 pode-se visualizar solução de 3% em volume de água nas três enzimas utilizadas neste estudo.



Figura 4 - Enzimas em solução de 3% (em volume) em água utilizadas no presente estudo

## 2.3 - Misturas

As misturas estudadas estão apresentadas no Quadro 1. Buscou-se avaliar os três tipos de solos com os três tipos de enzimas em três dosagens diferentes, o que resultou em 30 diferentes misturas.

A justificativa pelo valor da dosagem é pelo fato dos fabricantes estipularem o valor de 1:30 no momento da aplicação, isto é, 1 litro de enzima em solução de água para cada 30m<sup>3</sup> de solo tratado. Tendo este valor, assumiu-se valores acima e abaixo para avaliar seu comportamento, resultando em 1:20, 1:30 e 1:40.

Para cada mistura, foram feitos no mínimo 3 corpos de prova, a fim de obter um valor médio de avaliação.

Os corpos de prova (CPs) possuem tamanho padrão de 380mm x 50mm x 10mm. Todos os corpos de prova para todas as misturas foram produzidos idênticos, ou seja, sob as mesmas condições de temperatura e umidade. Foram executados também corpos de prova no estado puro, para comparação dos resultados.

Alguns resultados podem ser influenciados pelo ambiente, mesmo tomando todos os cuidados para que os corpos de prova sejam produzidos idênticos. Isso ocorre pela enzima ser de origem biológica e ser composta por bactérias que possam a vir reagir com outras bactérias presentes no ar, por exemplo.

Essa influência pode ser até do próprio equipamento, ferramentas ou acessórios utilizados, pois estes não foram esterilizados para a fabricação de cada corpo de prova, podendo ficar resquícios microscópicos e influenciar em outros resultados.

Quadro 1 - Misturas solo-enzimas estudadas

	Enzima	Dosagem	
Solo preto	PURO		
	EMC	1:20	
		1:30	
		1:40	
	PZ	1:20	
		1:30	
		1:40	
	TZ	1:20	
		1:30	
		1:40	
	Solo amarelo	PURO	
		EMC	1:20
1:30			
1:40			
PZ		1:20	
		1:30	
		1:40	
TZ		1:20	
		1:30	
		1:40	
Solo vermelho		PURO	
		EMC	1:20
	1:30		
	1:40		
	PZ	1:20	
		1:30	
		1:40	
	TZ	1:20	
		1:30	
		1:40	

### 3 - ENSAIOS REALIZADOS

#### 3.1 - Ensaios Mecânicos

O LWT (Figura 5) é um simulador de trafego, que simula em laboratório o esforço de tráfego em amostras ou corpos de prova de microrrevestimentos asfálticos. Com essa ação pode-se determinar deformações e estabelecer o limite máximo do teor de asfalto da mistura objetivando-se minimizar deslocamentos laterais e verticais.

O ensaio prescrito pela NBR-14841 (ABNT, 2002), verifica o excesso na quantidade de asfalto via o uso de areia, a qual penetra e adere ao corpo de prova forçada pelo vai e vem da carga padrão sobreposta à roda. A massa de areia aderida é então quantificada e correlacionada com o teor de asfalto.

O sistema mecânico do LWT possui os ciclos controlados, garantindo um ensaio uniforme e preciso nas condições em que os corpos de prova são submetidos na simulação de tráfego. O equipamento tem uma massa de aproximadamente 96 kg e dimensões em torno de 410 x 430 x 1430 mm (largura x altura x comprimento).

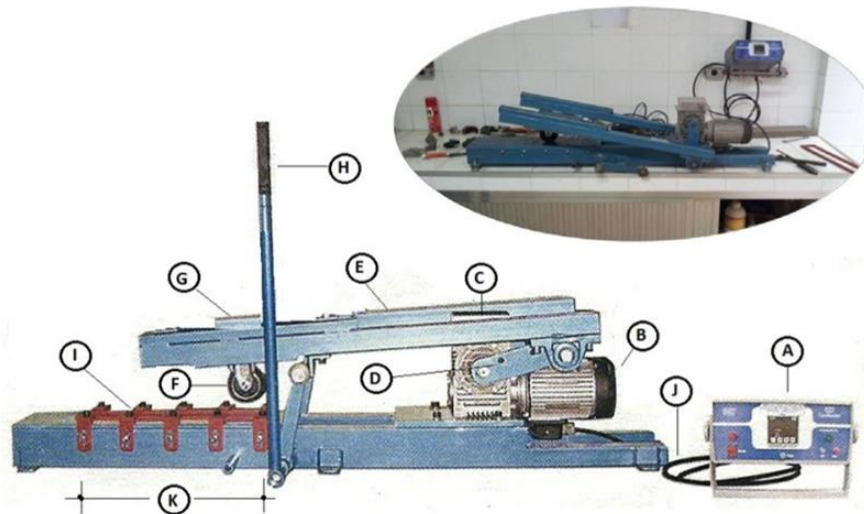


Figura 5 - Equipamento LWT - detalhes

A - Controlador digital (liga/desliga, reseta, exibe ciclos no visor, etc.); B - Motor elétrico; C - Caixa redutora de rotação com uma chave contadora dos ciclos; D - Braço rotativo; E - Braço horizontal; F - Roda de tráfego; G - Local para acomodar a carga (56 kg max); H - Alavanca para levantar o braço e a carga; I - Local de posicionamento (pista) do corpo de prova e os grampos que seguram seu suporte; J - Cabo elétrico do motor e da chave contadora de ciclos; K - Espaço da pista (30 cm) percorrido pela roda (Brazetti, 2013).

O sistema mecânico do LWT é composto de um motor elétrico (B) acoplado a uma caixa redutora de rotação (C) de onde parte um eixo onde está fixado um braço rotativo (D) que por sua vez impulsiona outro braço horizontal (E) que se apoia em uma roda (F). Cada ciclo que o braço rotativo completa, que equivale a um vai e vem de duas passadas de aproximadamente 30 cm cada (K) da roda padrão (3,0 pol x 1,0 pol) na amostra, demora cerca de 0,73 segundos, ou seja, temos 44 ciclos ou 88 passadas por minuto atingindo 5.280 passadas por hora, tudo registrado pela controladora digital (A). Esse tipo de equipamento simula o trânsito de cerca de um milhão de veículos em menos de 25 minutos quando carregado com a carga máxima preconizada de 56 kg (Brazetti, 2013).

O simulador de tráfego LWT foi concebido para estudos de microrrevestimentos asfálticos, porém, adaptou-se o equipamento para o estudo de corpos de prova de solos a fim de se verificar o efeito dos aditivos no desempenho das propriedades de uma massa de solo compactado e sujeita à ação das cargas geradas pelo equipamento, simulando assim o tráfego de veículos.

Desta forma, o ensaio efetuado com materiais asfálticos através do LWT pode ser facilmente adaptado, consistindo basicamente na substituição do material preconizado pelo solo tratado com enzimas e submetido à ação do movimento de vai e vem da roda padrão sob condições de carga e de número de ciclos fixados, simulando o que ocorre em campo e fornecendo condições de avaliar o desempenho de solos tratados.

Toda a metodologia de adaptação do equipamento e criação de novas ferramentas que permitiram avaliar o comportamento de solos tratados com aditivos foi proposta por Brazetti (2013)

Todos os corpos de prova foram executados no tamanho padrão de 380mm x 50mm x 10mm (Figura 6). As duas primeiras medidas (380mm e 50mm) são padrões do equipamento e não podem ser alteradas. Já a espessura, pode ser modificada, tanto maior ou menos do que 10mm. Optou-se por 10mm por estes terem apresentado resultados satisfatórios durante o desenvolvimento da metodologia utilizada por Brazetti (2013).

Ainda a respeito dos corpos de prova, todos foram executados na umidade ótima dos solos, respectivamente obedecendo aos ensaios de compactação executados e dimensionados, levando em conta o peso específico encontrado no ensaio de compactação.

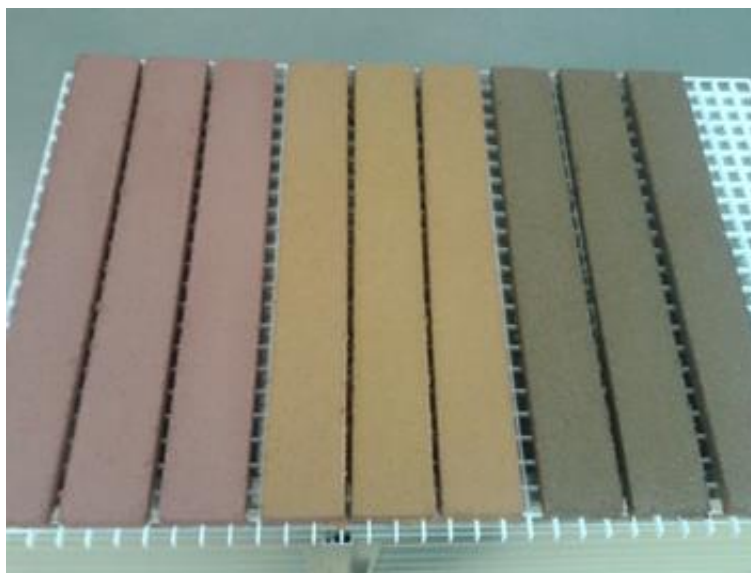


Figura 6 – Corpos de Prova para Ensaio LWT

### 3.2 - Avaliação Microbiológica

O objetivo deste estudo foi avaliar eventuais mudanças causadas pela adição das soluções de enzimas sobre a microbiota natural dos solos estudados.

Até o momento, foram ensaiadas duas soluções de enzimas, TZ e EMC, nos solos preto e amarelo. Estudos com a terceira enzima e o terceiro solo estão em andamento.

#### 3.2.1. Metodologia experimental

Os estudos foram conduzidos em microcosmos contendo aproximadamente 1 kg de solo deformado. Cada ensaio teve 14 dias de duração, sendo os microcosmos mantidos em temperatura controlada (entre 20 e 22°C), sem reposição de água, cobertos de maneira a impedir contaminação por via aérea mas permitindo troca gasosa e perda de umidade para o ar.

Soluções a 3% de enzimas foram preparadas com água destilada estéril.

Três microcosmos foram montados para cada solo: um tratado com 150mL de solução a 3% de TZ, outro com o mesmo volume de solução a 3% de EMC, e um controle, ao qual foram adicionados 150mL de água destilada estéril. Os solos foram destorroados e macerados com as respectivas soluções, e os microcosmos montados, em ambiente estéril.

#### 3.2.2. Monitoramento e análises

Foram analisadas amostras do solo natural, antes de processado, assim como no início, no meio e no final de cada período de incubação. Algumas análises foram igualmente feitas nas soluções diluídas (3%).

##### *Medidas de potencial de atividade microbiana degradadora total*

Foi utilizado o método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA), seguindo protocolo modificado do GeoBioSolo (Österreicher-Cunha *et al.*, 2012) a partir dos métodos adaptados por Adam e Duncan (2001) e Green *et al.* (2006); alíquotas de solo incubadas com FDA geram fluoresceína em quantidades proporcionais à atividade degradadora da microbiota daquele solo, a qual é medida em seguida por espectrofotometria a 490nm (espectrofotômetro Spectronics, Merck). O método permite quantificar o potencial degradador total da microbiota, parâmetro relevante haja vista que 90% do fluxo de energia passam pelos microrganismos ambientais (Adam e Duncan, 2001).

##### *Determinação gravimétrica de umidade do solo*

Pelo método do peso seco (EMBRAPA Solos, 1997): alíquotas de solo secas em estufa a 110°C até seu peso estabilizar-se permitem determinar o teor de água.

##### *Quantificação de estirpes cultiváveis*

As estirpes cultiváveis são aquelas que têm capacidade de crescer em condições controladas no laboratório, em geral as mais flexíveis, que se adaptam fácil e rapidamente a mudanças bruscas e drásticas de seu ambiente. Estas estirpes representam entre 1 e 10% das populações naturais do solo e não são

representativas da comunidade natural. Contudo, para este tipo de estudo, onde o solo é altamente manipulado e estocado antes de utilizado, a composição da microbiota já está alterada, favorecendo essas espécies mais flexíveis. Assim sendo, avaliar a população cultivável pode fornecer informações relevantes ao estudo.

Foi utilizado o método estatístico do Número Mais Provável (NMP) (Blodget, 2005; Cochran, 1950) em microplacas. As células do solo foram extraídas mediante agitação orbital (30 min) em tampão fosfato 10mM. A suspensão de células obtida foi diluída sequencialmente até 10<sup>-5</sup>, as três diluições mais elevadas inoculadas em microplacas, cinco poços por diluição. Após incubação até cinco dias a 30°C, o crescimento foi observado e o NMP determinado pela tabela de MacGrady.

#### Potencial de formação de biofilme

As amostras foram incubadas em meio de cultura líquido (Tryptone Soy Broth, Merck, a 10%) a 30°C e observadas diariamente por sete dias, sendo observado o crescimento e a eventual formação de biofilme (Christensen et al., 1982).

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados dos ensaios realizados no simulador de tráfego LWT serão apresentados a seguir Figuras 7, 8 e 9. Todos os gráficos possuem, à sua esquerda, o primeiro resultado sendo o solo no estado puro para uma melhor visualização.

O valor de cada barra apresentada nos gráficos significa o número de passadas que o simulador de tráfego obteve até a ruptura, lembrando que a cada 1000 passadas a carga é aumentada. Todos os corpos de prova foram curados ao ar livre, com um tempo de cura de sete dias.

Os gráficos estão organizados com os três melhores valores de ruptura encontrados dispostos do menor para o maior.

Na dosagem 1:40, a quantidade de enzimas na mistura é menor, talvez por isso atinjam menores valores de ruptura, quando comparado às outras dosagens.

No comparativo entre os resultados da dosagem 1:40 (Figura 7), a enzima PZ apresentou um melhor resultado para os três solos, aumentando em até 250% os valores de ruptura em relação ao solo no estado puro.

O solo que apresentou os melhores resultados nessa dosagem foi o solo preto, suportando maior número de passadas, consequentemente mais cargas com valores maiores (1848 e 1346 passadas), quando comparado ao solo amarelo (1568 e 1320 passadas) e ao solo vermelho (1020 e 912 passadas).

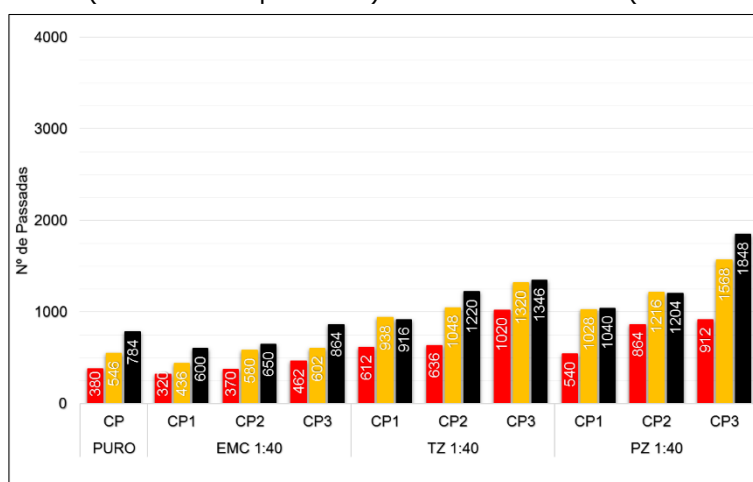


Figura 7 – Resultados dos Ensaio LWT utilizando a dosagem 1:40

A dosagem 1:30 é a utilizada pelos fabricantes e recomendada aos consumidores pelos mesmos.

De fato, os corpos de prova ensaiados nessa dosagem (Figura 8) mostraram melhores resultados em relação à dosagem 1:40, tendo valores acima de 2000 passadas nos solos preto e amarelo, quando tratados com as enzimas TZ e PZ.

Já a enzima EMC não mostrou um desempenho favorável quando comparado às outras duas estudadas. Isso pode ocorrer por alguma diferença do produto, pois as três enzimas são provenientes da mesma



matéria prima, o bagaço da cana-de-açúcar, porém cada fabricante tem os seus procedimentos e segredos a respeito da fabricação das mesmas, o que pode levar a diferenças na composição e conseqüentemente no seu desempenho.

Percebe-se que, como visto nos outros resultados, os melhores corpos de prova são os ensaiados com os solos preto e amarelo. Os resultados com o solo vermelho apresentam menores valores de ruptura. Isso pode ser explicado pelo teor de matéria orgânica presente no solo, visto que a enzima precisa de um substrato orgânico para suas reações. Se o solo possui um teor maior de matéria orgânica, as reações se desenvolvem mais facilmente do que um solo que possui uma porcentagem menor.

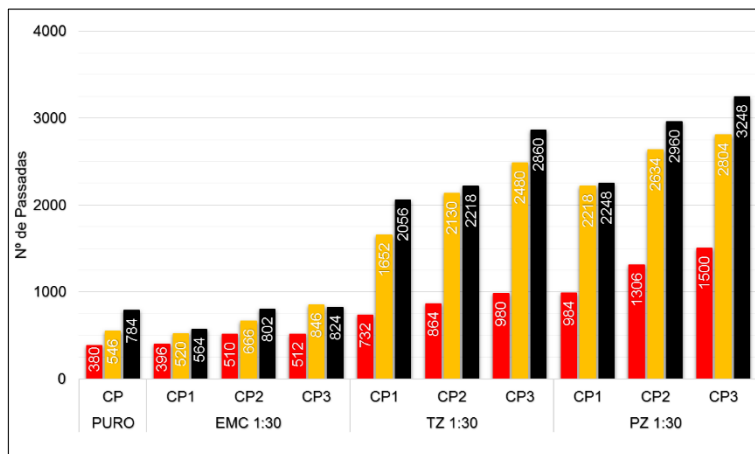


Figura 8 – Resultados dos Ensaio LWT utilizando a dosagem 1:30

Como já era esperado, em relação à dosagem, os melhores resultados foram apresentados na relação 1:20 (Figura 9), onde os valores dos solos amarelo e preto ficaram próximos de 3000 passadas ou até mesmo ultrapassaram. Tendo uma melhora muito significativa, devido à quantidade maior de enzima na mistura.

O solo vermelho novamente ficou abaixo dos resultados dos outros dois solos estudados, mas não menos importantes, pois mesmo assim apresentou melhoras acima de 400% em relação ao estado puro.

Já a enzima EMC, em todos os três solos e nas três dosagens (1:20, 1:30 e 1:40) não apresentou resultados expressivos quando comparado aos outros valores, não ultrapassando as 1486 passadas do solo preto com dosagem 1:20. Isso pode ser explicado novamente pela quantidade de matéria orgânica presente no solo, visto que a enzima precisa de um substrato orgânico para suas reações e o solo vermelho apresentou o menor teor de matéria orgânica entre os três solos estudados.

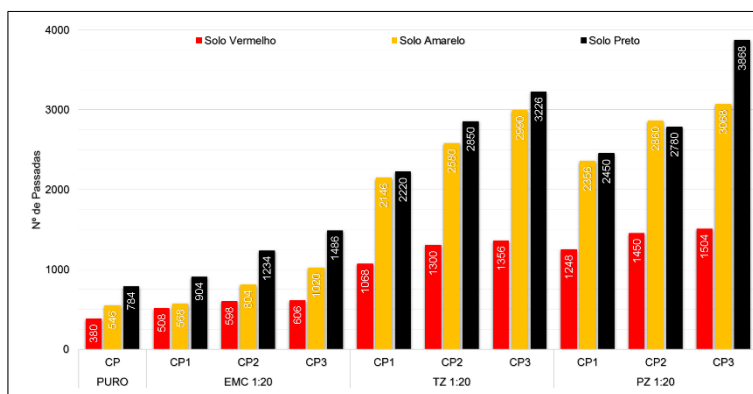


Figura 9 – Resultados dos Ensaio LWT utilizando a dosagem 1:20

Os solos naturais apresentaram população bacteriana cultivável condizente com sua origem e o fato de estarem armazenados há algum tempo:  $2,8 \cdot 10^6$  células/g solo para o preto e  $7,71 \cdot 10^5$  para o amarelo, mostrando pouca diferença nesses contingentes, apesar das diferenças nos solos. A manipulação dos solos reduziu a população do solo amarelo, mostrando a proteção conferida pela matéria orgânica do solo preto, onde o número de cultiváveis se manteve.

As soluções a 3% de TZ e EMC apresentaram, respectivamente, contingentes de  $6,3 \cdot 10^5$  e  $4,9 \cdot 10^4$  células por mL de solução, mostrando haver células viáveis e cultiváveis nas soluções comerciais.

A adição de enzimas alterou pouco os contingentes cultiváveis dos solos (exceto EMC no solo preto) e seus comportamentos, apesar do acréscimo de estirpes provenientes das soluções (Figura 10).

No solo preto não tratado, o número de células cultiváveis se manteve ao longo do ensaio; a adição de TZ não alterou os contingentes de bactérias cultiváveis, enquanto a adição de EMC acarretou queda de duas ordens de grandeza, indicando impacto. Ao longo do ensaio, os contingentes se mantiveram no controle e no solo com TZ, enquanto no solo com EMC há uma recuperação da população (Figura 10).

No solo amarelo, a adição das enzimas não alterou o contingente cultivável, apresentando tendência a aumentarem ao longo do ensaio, independentemente do tratamento.

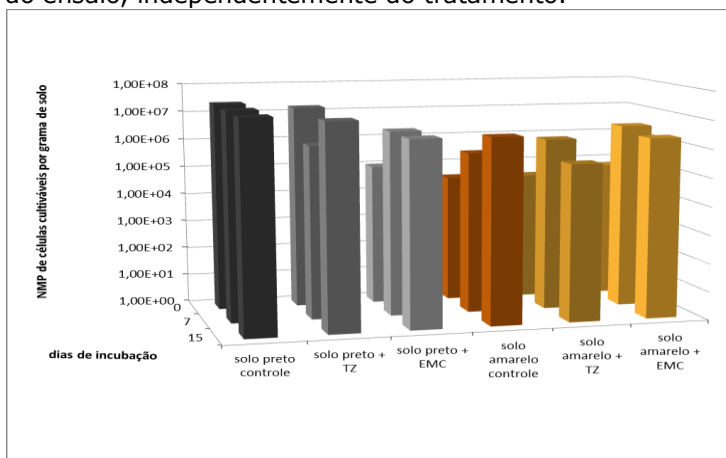


Figura 10 – Contingentes bacterianos cultiváveis ao longo dos ensaios (Número Mais Provável de células / g de solo)

Os solos preto e amarelo em estado natural apresentaram, respectivamente, atividade de  $0,6011 \pm 0,1712$  e de  $0,4404 \pm 0,05517$   $\mu\text{g}$  de fluoresceína formada / g solo / minuto. Conforme esperado em um solo mais orgânico, o preto tem atividade degradadora mais elevada. A manipulação dos solos reduziu a atividade do solo amarelo, ficando esta abaixo dos níveis habituais para solos sub-superficiais da região estudada (Figura 11). Mais uma vez constata-se a proteção conferida à microbiota pela matéria orgânica.

As soluções de enzimas não apresentam atividade pelo método utilizado, indicando que, mesmo havendo células viáveis no produto comercial, estas não têm atividade degradadora de imediato, sugerindo a presença de células dormentes ou encistadas, logo, viáveis e podendo ser reavivadas rapidamente quando as condições se tornam favoráveis, mas que requerem tempo para ativar seu metabolismo e começar a utilizar a matéria orgânica disponível no meio.

No solo preto, a adição de TZ inibe a atividade, que permanece mais baixa durante o ensaio. A EMC estimula, ao contrário, a atividade microbiana, aumentando até um nível mais elevado do que o controle.

No solo amarelo, a atividade sofre impacto relevante com a adição de TZ. A EMC não tem efeito de início, mas estimula a atividade em seguida, alcançando o nível do solo preto. O aumento é proporcionalmente mais importante no solo amarelo do que no preto, haja vista sua atividade inicial bem mais baixa.

Algo na TZ impacta a atividade microbiana, sem relação aparente com a matéria orgânica do solo nem com a população cultivável – mas pode ser devido a alguma mudança na população não cultivável.

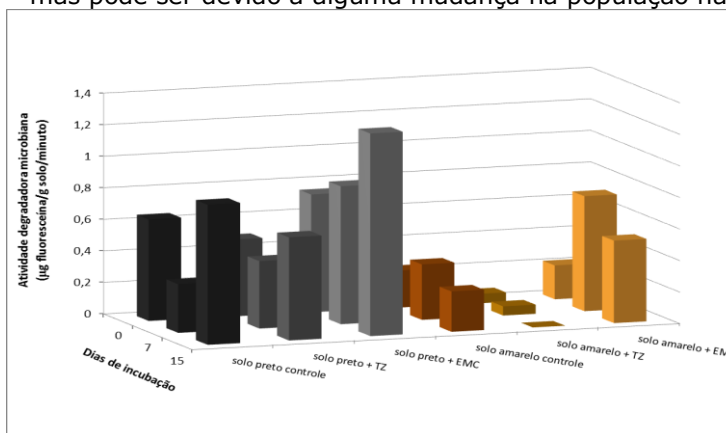


Figura 11 - Atividade degradadora total nos solos durante os ensaios ( $\mu\text{g}$  de fluoresceína formada / g solo / minuto)

O solo preto tem umidade inicial menor do que o amarelo. A adição das enzimas não altera a perda de umidade ao longo do ensaio, a qual tende a diminuir menos no solo com EMC (Figura 12). O solo amarelo perde umidade somente no início do ensaio. As enzimas não parecem influenciar a evolução da umidade,

os solos apresentam, todos, o mesmo comportamento. A atividade e os contingentes cultiváveis não parecem relacionados com as oscilações na umidade dos solos.

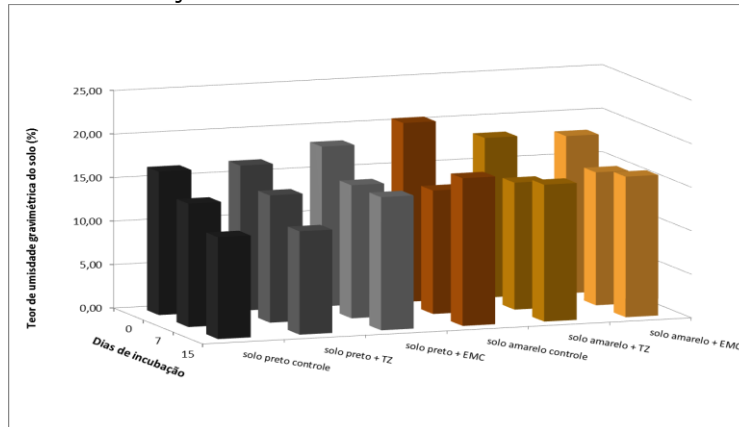


Figura 12 – Teor de umidade gravimétrica nos solos durante os ensaios (% em peso)

Os testes de formação de biofilme foram negativos para os solos naturais, para as soluções de enzimas puras e os solos com TZ, mas positivos nos solos com EMC – indicando que a presença de biofilme não provém dos solos (composição e estrutura) nem às soluções de enzimas propriamente ditas, mas à combinação da EMC com os solos.

Estes resultados iniciais mostram população mais ativa e possivelmente mais numerosa no solo preto, como esperado. A adição de enzimas tem efeitos similares nos dois solos, a atividade sendo, em geral, estimulada pela EMC e impactada pela TZ.

É interessante observar que a EMC misturada ao solo foi o único caso observado de biofilme, sendo essa a enzima com o pior desempenho mecânico. A formação de biofilme é uma estratégia para reter melhor os nutrientes em meio pouco propício à adesão adequada das células; o biofilme se forma, por exemplo, para preencher vazios em um solo muito poroso. Em caso de compactação do solo, como neste estudo, formar biofilme não é uma capacidade de interesse para a microbiota (Foster, 1988, Or *et al.*, 2007).

## 5 - CONCLUSÕES

- Os ensaios com o LWT foram totalmente satisfatórios, concluindo que a metodologia desenvolvida para avaliação em solos é completamente utilizável e recomendada;
- O solo vermelho apresentou os piores resultados quando comparado aos outros. Os solos amarelo e preto apresentaram melhores resultados chegando o preto quase a capacidade máxima do equipamento de 4000 passadas. Resultado explicado pelo maior teor de matéria orgânica presente nos solos preto e amarelo, levando as enzimas a reagirem com os substratos presentes. Diferente do solo vermelho que possui um teor de matéria orgânica menor;
- Quanto à avaliação das enzimas, as que se mostraram mais favoráveis foram a PZ e TZ;
- A dosagem de aplicação da enzima exerceu um fator importante nas misturas, concluindo que quanto menor essa dosagem, isto é, mais quantidade de enzima na mistura, melhor é o seu comportamento, tendo assim a dosagem 1:20 como melhor avaliada;
- Através de todas as análises e estudos realizados nesta pesquisa, conclui-se que há sim viabilidade técnica para utilização de enzimas em obras de pavimentação, porém, muitos estudos e entendimentos acerca de como esses aditivos atuam devem ser realizados, a fim de se entender melhor a respeito do seu comportamento;
- As soluções de enzimas TZ e EMC a 3% apresentam população cultivável de crescimento normal em laboratório, sem apresentar, contudo, atividade degradadora;
- De maneira geral, a adição de EMC estimulou a atividade microbiana nos solos preto e amarelo, enquanto a TZ a impactou;
- Ainda não há dados suficientes, mas os primeiros resultados sugerem que o melhor desempenho nos ensaios mecânicos não está diretamente ligado ao teor em matéria orgânica dos solos, nem à maior atividade microbiana nem à capacidade de formar biofilme da população autóctone.

## REFERÊNCIAS

- Adam, G., Duncan, H. (2001). Development of a Sensitive and Rapid Method for the Measurement of Total Microbial Activity Using Fluorescein Diacetate (FDA) in a Range of Soils. *Soil Biol. Biochem.* 33:943-951.
- Andrew, R.T., Fadi, M.S., Nicholas, E.H., Elahe, M. (2003). An Evaluation of Strength Change on Subgrade Soils Stabilized With An Enzyme Catalyst Solution Using CBR and SSQ Comparisons. *University Transportation Center, South Carolina State University, Orangeburg, SC, USA.*
- Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR-14841 (2002). Microrrevestimentos a Frio - Determinação de Excesso de Asfalto e Adesão de Areia pela Máquina LWT. Rio de Janeiro-RJ: *Associação Brasileira de Normas Técnicas.*
- Blodgett, R.J. (2005). Serial Dilution with a Confirmation Step. *Food Microbiology* 22:547-552
- Brandon, T.L., Brown, J.J., Daniels, W.L., Defazio, T.L., Filz, G.M., Mitchell, J. K., Musselman, J., Forsha, C. (2009). Rapid Stabilization Polymerization of Wet Clay Soils: Literature Review. *Technical Project 4915, Air Force Research Laboratory Materials and Manufacturing Directorate.* Performed by Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
- Brazetti, R. (2013). Contribuição ao Entendimento dos Mecanismos de Estabilização de Solos com Enzimas. Relatório Final de Projeto de Pesquisa de Pós-Doutorado, Rio De Janeiro-RJ: *Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.*
- Christensen G.D, Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H. (1982). Adherence of Slime Producing Strains of Staphylococcus Epidermidis to Smooth Surfaces. *Infect Immun* 37:318-26.
- Cochran, W.G., (1950). Estimation of Bacterial Densities by Means of the "Most Probable Number." *Biometrics* 6:105-116.
- Embrapa (1997). Manual de Métodos de Análise de Solo. 2ª Ed., *Centro Nacional de Pesquisa de Solos*, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 212P.
- Foster, R. C. (1988). Microenvironments of Soil Microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* 6:189-203.
- Green V.S., Stott, D.E., Diack M. (2006). Assay for Fluorescein Diacetate Hydrolytic Activity: Optimization for Soil Samples. *Soil Biology & Biochemistry* 38:693-701.
- Holden, P. A., Fierer, N. (2005). Microbial Processes in the Vadose Zone. *Vadose Zone J.* 4, 1-21.
- Jones, D. (2003). Toward Fit-For-Purpose Certification of Road Additives. *Journal of Transportation Research Record 1819, TRB, National Research Council, Washington, D.C., pp.* 208-217.
- Martin, P., Anand, J.P., Keith, M. (2003). Development of Stabilizer Selection Tables for Low Volume Roads Arlington, Texas. *Journal of Transportation Research Record 1819, TRB, National Research Council, Washington, D.C, pp.* 84-95.
- Mitchell, J.K., Santamarina, J.C. (2005). Biological Considerations in Geotechnical Engineering. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering ASCE* 31(10), 1222-1233.
- Or, D., Smets, B.F., Wraith, J.M., Dechesne, A., Friedman, S.P. (2007). Physical Constraints Affecting Bacterial Habitats and Activity in Unsaturated Porous Media – A Review. *Advances in Water Resources*, 30, 1505-1527.
- Österreicher-Cunha, P., Vargas Jr., E.A., Antunes, F.S., Mothé, G.P.B., Guimarães, J R.D., Coutinho, H.L.C. (2012). Influence of Soil and Climate on Carbon Cycling and Microbial Activity of a Heterogeneous Tropical Soil. *Geomicrobiol J.* 29:5, 399-412. Doi 10.1080/01490451.2011.575914.
- Petry, T.M., Khaled S. (2003). Evaluation of Chemical Stabilizers - State-of-The-Practice Report. Transportation Research Circular E-C086. *Transportation Research Board. Chemical and Mechanical Stabilization Committee.* Washington.
- Rauch, A.F., Harmon, J.S., Katz, L.E., Liljestrang, H.M. (2002). Measured Effects of Liquid Soil Stabilizers on Engineering Properties of Clay. Presented at the 81st Annual Transportation Research Board Conference and Published in the *Transportation Research Record Research Board 1787, National Research Council, Pp* 33-41, Washington.
- Visser, A.T. (2007). Procedure for Evaluating Stabilization of Road Materials with Non-Traditional Stabilizers. *Transport Research Record 1989. Low Volume Roads. National Research Council, Washington, D.C, 2, P* 21, 2007.