

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta, Caracterização e Preparação da Amostra do Solo Estudado

A amostra de solo foi coletada no quilômetro 40 da Rodovia Raposo Tavares (Figura 9).



Figura 9: Perfil de solo de onde foi coletada amostra da superfície.

A escolha do local e a coleta da amostra foram realizadas com o auxílio da Profa. Dra. Sidneide Manfredini da área de Pedologia da Faculdade de Geografia da Universidade de São Paulo (USP), que já tinha observado os cortes efetuados durante as obras de ampliação da rodovia e constatado tratar-se de um Latossolo, tipo de solo escolhido na presente pesquisa, por ter ampla distribuição no Brasil.

Foram coletados aproximadamente cinco quilos de solo. Essa quantidade de amostra foi necessária não só para os testes de respirometria, mas também para sua caracterização geotécnica, mineralógica e química. A amostra foi coletada numa profundidade aproximada de 10 a 15 cm e armazenada em sacos plásticos. Esta profundidade foi escolhida, pois, como os hidrocarbonetos aromáticos polinucleares são muito pouco solúveis em água, na ocorrência de uma contaminação, estes contaminantes ficariam adsorvidos e concentrados na camada mais superficial do solo durante alguns anos. Foi coletada, também, uma quantidade menor de amostra, de aproximadamente 200 g, representativa de todo o volume de solo estudado, para contagem de organismos heterotróficos indígenas no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Esta amostra foi armazenada primeiramente em um saco plástico e depois em um isopor com gelo.

Como estava chovendo no dia da coleta, foi necessário retornar ao local num outro dia, para a descrição no campo dos diversos horizontes. Foram identificados seis horizontes, a partir da superfície: A₁, A₁₂, B₁, B₂₁, B₂₂ e B₂₃. Além disso, amostras destes horizontes (Figura 10) foram coletadas para realização de análises químicas, para fins de avaliação de fertilidade, de levantamento e de micronutrientes no Laboratório do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Os métodos analíticos utilizados foram:

- extração pela resina trocadora de íons, para determinação dos teores de P, K, Ca, e Mg;
- extração com KCl 1N, para determinação do teor de Al;
- extração com acetato de amônio 0,5N em ácido acético 0,25 N, para a determinação do teor de S-SO₄²⁻;
- extração DTPA – TEA a pH 7,3, para determinação dos teores de Cu, Fe, Mn, Zn e
- ataque sulfúrico, para determinação dos teores de Si, Al, Ti, Fe, Mn.

Estes procedimentos são padronizados e encontram-se descritos no Manual de Análise do Instituto Agronômico de Campinas (RAIJ et al., 2001) e no Manual de análises da Embrapa (EMBRAPA, 1999).

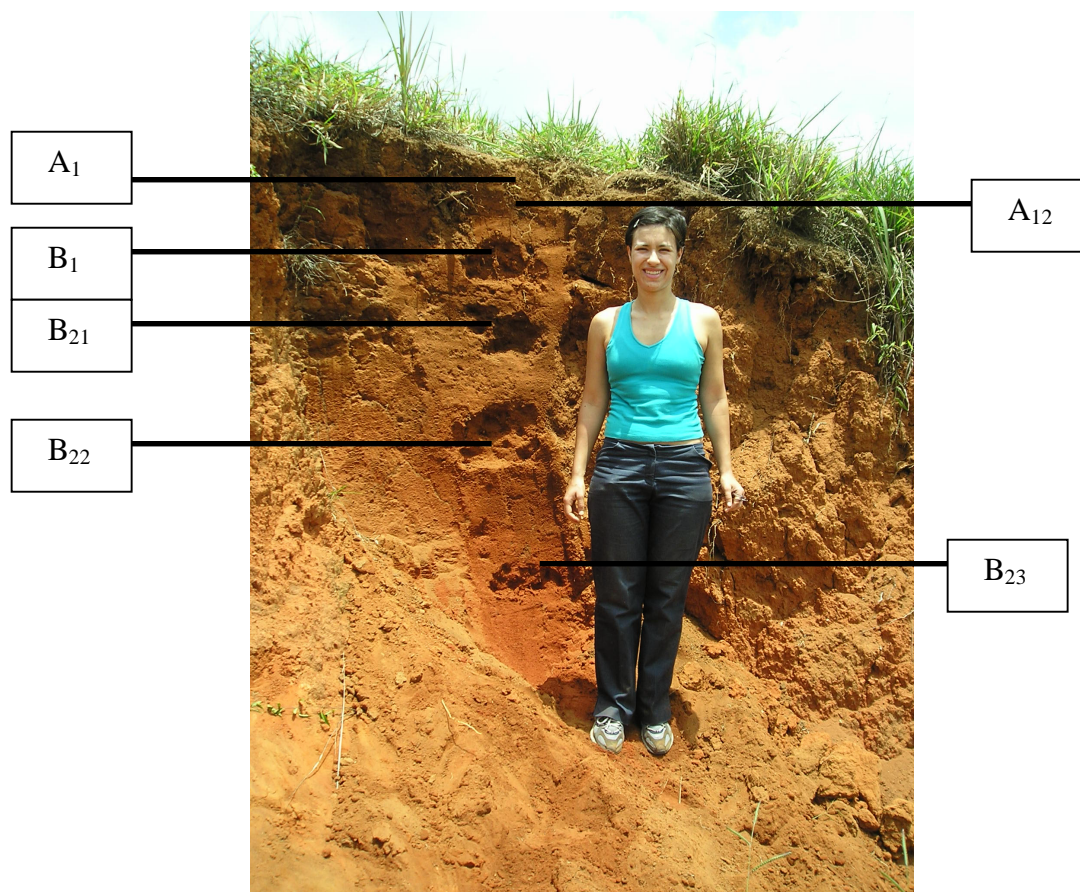


Figura 10: Perfil do solo com os pontos de retirada de amostras de cada horizonte identificado.

Amostras dos quatro primeiros horizontes do perfil também foram encaminhadas ao Laboratório de Caracterização Tecnológica do Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da USP para realização das análises por Difractometria de Raios X, efetuada através do método do pó e, semi-quantitativa por Fluorescência de Raios X.

No ensaio de difratometria de Raios X (método do pó), a amostra de solo foi quarteada para a obtenção de uma fração de aproximadamente 20g. Em seguida, foi reduzida granulometricamente para aproximadamente mesh 200 e uma alíquota entre 1 e 3 g foi compactada em uma cavidade de 27 mm de diâmetro por 2,5 mm de profundidade de um suporte metálico. Posteriormente, foi introduzida num difratômetro.

A metodologia do ensaio de fluorescência de Raios X incluiu as etapas de secagem e quarteamento das amostras para a obtenção de uma fração de aproximadamente 50g; redução granulométrica para aproximadamente mesh 400; compactação do pó em prensa de 20 toneladas e introdução da amostra compactada no equipamento de fluorescência de Raios X.

As amostras encaminhadas aos laboratórios da ESALQ e da Engenharia de Minas e de Petróleo foram previamente secas, destorroadas e peneiradas em malha de 2,0 mm de abertura, como mostra a Figura 11.



Figura 11: Amostras dos horizontes do perfil de solo, de onde foi coletada a amostra para os ensaios de caracterização agronômica e mineralógica.

a) Secagem do solo ao ar

No laboratório de Mecânica dos Solos da Escola Politécnica, o volume de solo coletado foi retirado dos sacos plásticos e espalhado em bandejas, onde permaneceu secando em temperatura ambiente e à sombra por três dias. Após o período de secagem ao ar, o solo foi destorroado e peneirado numa malha de 2,0 mm de abertura.

b) Determinação da umidade do solo

Após a secagem ao ar, o destorroamento e o peneiramento da amostra de solo, foram retiradas duas amostras representativas do volume total para obtenção da umidade residual. As amostras, contendo entre 40 e 80 gramas, foram coletadas em cápsulas metálicas taradas (P0). As cápsulas contendo as amostras de solo foram pesadas (P1) e introduzidas na estufa, onde permaneceram a 105° C até peso constante. Depois disso, elas foram resfriadas em dessecador e pesadas novamente (P2).

Como o solo estava muito úmido, devido a coleta ter sido realizada na estação chuvosa e num dia de chuva, a amostra foi novamente submetida à secagem ao ar. No dia seguinte, foram coletadas mais duas amostras para determinar a umidade do solo. Após a retirada das mesmas, todo o volume de solo coletado foi armazenado em um saco plástico, que foi hermeticamente fechado.

c) Determinação da densidade aparente, da umidade residual e da capacidade de campo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1999)

Para a determinação da densidade aparente, da umidade residual e da capacidade de campo, um papel-filtro foi fixado, com o auxílio de um anel de vedação de borracha, no fundo de um anel metálico previamente aferido (V1). Esse conjunto, mostrado na Figura 12, foi colocado numa bandeja de plástico, preenchida com água destilada em uma

altura suficiente para umedecer e saturar o papel-filtro por capilaridade. O conjunto foi retirado e pesado após a drenagem do excesso de água (M1). Em seguida, foi encaminhado à estufa, onde permaneceu a 105° C até atingir peso constante (M2).



Figura 12: Conjunto utilizado para determinação da densidade aparente, umidade residual e capacidade de campo.

Após secagem em estufa, o conjunto foi preenchido com solo, compactado com aproximadamente 10 batidas, soltando-se o conjunto a uma distância de cerca de três centímetros da bancada. O procedimento foi repetido até que o volume do anel fosse completado. O excesso de solo foi retirado com o auxílio de uma espátula e o conjunto

foi pesado (M3). A seguir, foi novamente colocado na estufa, onde permaneceu a 105° C até atingir peso constante. Após esse período, foi resfriado no dessecador e pesado (M4).

O conjunto contendo a amostra seca foi imerso numa caixa com água destilada até cerca da metade da altura do anel, para saturar o solo por capilaridade. Saturada a amostra, ela foi introduzida no dessecador até drenagem completa da água e pesada em condições de saturação (M5).

A umidade residual foi calculada por:

$$w\% = \frac{M3-M4}{M4-M2} \times 100 \quad (8)$$

onde:

w% = umidade residual em g H₂O/100 g de solo seco

M_i = massa, em g

A densidade aparente foi calculada através da seguinte expressão:

$$\rho = \frac{M4-M2}{V} \quad (9)$$

V1

onde:

ρ = densidade aparente, em g/cm^3

Mi = massa, em g

V1 = volume do anel, em cm^3

A capacidade de campo foi obtida através da seguinte equação:

$$CC = \frac{(M5 - M4) - (M1 - M2)}{(M4 - M2)} \quad (10)$$

onde:

CC = capacidade de campo em $\text{g H}_2\text{O}/100 \text{ g de solo seco}$

O ensaio foi realizado em triplicata.

d) Análise granulométrica (EMBRAPA, 1997)

A análise granulométrica foi realizada em duplicata para o horizonte B₂₁.

Foram pesados 2 gramas de solo, previamente destorroado e peneirado, e colocados em um recipiente plástico de 250 mL, onde foram adicionados 100 mL de água destilada e 10 mL de dispersante (hexametáfosfato de sódio). Esta suspensão permaneceu em agitação durante a noite. Na manhã seguinte, o conteúdo foi passado por uma peneira de 20 cm de diâmetro e abertura de malha de 0,053 mm (n^o 270), colocada sobre um funil apoiado numa proveta de 1000 mL. Lavou-se o material retido na peneira e este foi reservado. Completou-se o volume da proveta com água destilada. Agitou-se a suspensão durante 20 segundos com um bastão, que continha na extremidade inferior, uma tampa de borracha com vários furos. Após o término da agitação, iniciou-se a contagem do tempo.

Foi preparada a prova em branco, também numa proveta de 1000 mL, contendo apenas a água destilada e o dispersante. Agitou-se o conteúdo da proveta por 20 segundos e iniciou-se a contagem do tempo.

Como o método baseia-se na velocidade de queda das partículas, verificou-se que o tempo de sedimentação de 5 cm da fração argila, correspondente à temperatura medida, era de 3 horas e 43 minutos. Decorrido este tempo, pipetou-se 25 mL do conteúdo da proveta. Este volume foi transferido para um béquer de massa conhecida, assim como o volume de água utilizado para a lavagem da pipeta. O béquer permaneceu em estufa a 105° C até evaporação total da água. Posteriormente, ele foi colocado no dessecador e depois de resfriado, foi pesado. O mesmo procedimento foi realizado para a prova em branco.

A fração areia foi determinada pela pesagem de um béquer, previamente tarado, cujo conteúdo era o que tinha sido retido na peneira e permanecido na estufa por cinco horas.

A fração silte foi obtida pela diferença das frações areia e argila em relação à amostra original.

e) Determinação do pH do solo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1999)

Foram pesados 10 gramas de solo e introduzidos em um béquer de 50 mL, onde foram adicionados 25 mL de água destilada. A amostra permaneceu em agitação por 15 minutos e foi deixada em repouso por 1 hora. O pH foi medido mantendo-se o eletrodo combinado no líquido sobrenadante, sem agitação da amostra.

f) Determinação da curva de neutralização do solo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1999)

Para a determinação da curva de neutralização, foram pesados, em um béquer, 10 gramas de solo seco. Foi adicionado o carbonato de cálcio (CaCO_3) em diferentes quantidades, variando de zero a 1000 mg.

As amostras foram homogeneizadas e cobertas com papel alumínio, para evitar o ressecamento do solo. Permaneceram em repouso por sete dias e, após esse período, foi medido o pH de cada uma, conforme procedimento descrito no item e.

Na primeira determinação da curva de neutralização, observou-se que o pH do solo não ultrapassava 7,0, mesmo com a adição de 1000 mg de carbonato de cálcio. Para confirmar este comportamento do solo, foram feitos mais três ensaios, sendo um com um fabricante diferente de carbonato de cálcio e dois com diferentes horizontes de solo (B₂₁ e B₂₃), sendo o último o mais profundo.

g) Esterilização do solo em autoclave

Embora a esterilização do solo não esteja descrita na NBR 14283 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1999), o procedimento foi realizado com o objetivo de garantir que a geração de gás carbônico fosse devida somente à biodegradação do contaminante por microrganismos exógenos, que seriam introduzidos às amostras de solo.

O solo, previamente peneirado e seco ao ar, foi dividido em volumes menores, que foram embrulhados em papel kraft e colocados na autoclave, onde permaneceram por 30 minutos a 121° C.

Após a esterilização, o solo foi retirado da autoclave e introduzido em sacos plásticos, fechados hermeticamente, que foram armazenados em câmara fria, até a etapa de contaminação do solo. Duas amostras foram retiradas para a determinação da umidade do solo esterilizado.

Como a primeira esterilização foi realizada após a primeira secagem do solo ao ar, que apresentou umidade alta, ela teve que ser repetida após a segunda secagem do solo.

h) Umidade residual do solo esterilizado

Assim que os pacotes foram retirados da autoclave, foram coletadas duas amostras de solo para determinação da umidade. Este processo foi realizado rápida e cuidadosamente para reduzir o risco de contaminação microbiológica. Porém, quando a amostra de solo estéril foi retirada da geladeira para a etapa de contaminação, observou-se que a umidade do solo não era uniforme nos quatro pacotes de papel kraft e nem dentro de um mesmo pacote. Assim, o conteúdo de todos os pacotes foi homogeneizado cuidadosamente, para diminuir o risco de contaminação microbiológica, e foram retiradas duas amostras, agora representativas do volume total.

i) Contagem das bactérias heterotróficas

No momento da coleta, uma amostra de solo, de aproximadamente 200g, representativa de todo o volume coletado para os ensaios de biodegradação, foi armazenada em isopor e transportada imediatamente para o laboratório, para a contagem de bactérias heterotróficas nativas. Esta contagem, a do solo estéril e do solo após o armazenamento nos respirômetros foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sob a orientação da Profa. Dra. Irma Rivera e de acordo com a Norma L5. 201 (SÃO PAULO, 1996).

Primeiramente, foi feita uma diluição de 10g da amostra de solo em 90g de água num erlenmeyer. Após homogeneização, agitando-se o frasco intensamente por 25 vezes, foram feitas as seguintes diluições em tubos de ensaio: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . De cada tubo, foi retirado o volume de 0,1 mL, que foi transferido para uma placa de Petri, onde foi adicionado o meio de cultura “Plate Count Agar”, previamente esterilizado e estabilizado a 44 – 46° C. Em seguida, a placa foi fechada e o conteúdo homogeneizado, fazendo-se a forma do número oito sobre a bancada por quinze vezes. Além das placas contendo as diluições da amostra, foram realizados dois testes em branco, um contendo somente o meio de cultura e outro contendo o meio de cultura e a água de diluição.

As placas foram armazenadas em temperatura ambiente e a contagem foi efetuada após 24, 48 e 72 horas.

Para obter o número de unidades formadoras de colônia por grama de solo, foram escolhidas para cálculo duas diluições do período de 72 horas. O número de colônias nessas duas diluições deve variar, preferencialmente, de 30 a 300 (MOREIRA, 2002). O cálculo considera o número de colônias, a diluição e o volume da amostra adicionado à placa (0,1mL).

$\text{UFC/g} = \text{n}^{\circ} \text{ de colônias na contagem do período de 72 horas} \times \text{diluição} (10^x) \times \text{fator relativo ao volume adicionado à placa} (10)$

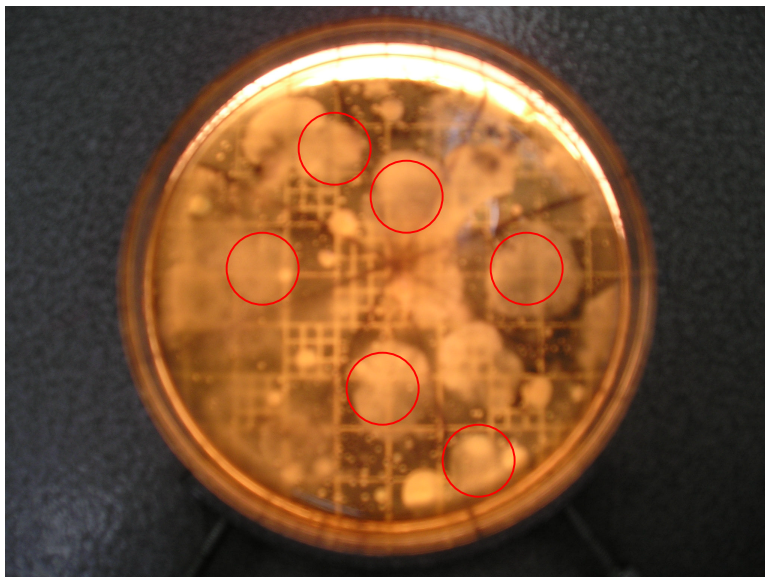


Figura 13: Placa no momento da contagem das bactérias heterotróficas.

Na contagem das colônias de bactérias heterotróficas, que são circulares, de tamanho pequeno e coloração branca amarelada, foi observado o crescimento de colônias de

fungos, que possuem tamanho maior e aspecto de penugem (Figura 13), que não foram contadas.

j) Contagem dos esporulados

Além da contagem das bactérias heterotróficas, foi realizada, para as amostras de solo estéril e após incubação, a contagem dos microrganismos esporulados. Este procedimento difere do anterior somente pelo aquecimento da amostra solo/água, contida no erlenmeyer, a 80° C, durante 30 minutos, antes de serem preparadas as diluições.

4.2 Ensaios de Respirimetria

A atividade microbiana existente no solo pode ser medida pelo comportamento da sua respiração, isto é, quando os microrganismos aeróbios degradam os compostos orgânicos presentes no solo, eles produzem o gás carbônico, que pode ser quantificado. Como o método respirométrico de Bartha é o único padronizado pela norma brasileira NBR 14283 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1999), ele foi o escolhido no presente trabalho.

4.2.1 Testes 1, 2 e 3 – Ensaio com o fenantreno

a) Escolha do contaminante orgânico

Em 2004, de acordo com levantamento realizado pela CETESB, foi divulgada uma listagem com 1.336 áreas contaminadas identificadas no Estado de São Paulo, das quais 931 tinham como causa, vazamentos de tanques subterrâneos ou de superfície em postos de serviços ou em locais de armazenamento de combustíveis. Os hidrocarbonetos aromáticos, incluindo os polinucleares, são os principais componentes do petróleo e de seus derivados, principalmente da gasolina. Assim, o contaminante escolhido para os ensaios de respirometria foi o fenantreno, que é um hidrocarboneto aromático polinuclear de peso molecular médio. Como a biodegradação é função do peso molecular do composto, a escolha de um hidrocarboneto aromático polinuclear de peso médio é adequada, pois um de peso maior, como o benzo(a)pireno poderia adsorver fortemente nas partículas de solo, o que dificultaria a biodegradação, elevando ainda mais o tempo necessário à ocorrência da mesma e, um de peso menor, como o naftaleno, poderia ser, parcialmente, volatilizado. Além disso, há farta literatura sobre biodegradação do fenantreno no solo (LEPO e CRIPE, 1999; NOVOTNÝ et al., 2000; YAGHMAEI, 2001; LOIBNER et al., 2003; CHO et al., 2003 e ERIKSSON et al., 2003), o que facilitaria a investigação de outros aspectos relativos ao teste respirométrico de Bartha.

b) Escolha do solvente

Foram preparadas duas soluções de 10 g/L de fenantreno (padrão pesticida): uma com acetona e outra com etanol (padrão pesticida). Observou-se, visualmente, que o fenantreno dissolveu mais rapidamente na acetona, sendo esta a escolhida.

c) Contaminação do solo

Foi preparada uma solução de fenantreno em acetona numa concentração de 10 g/L. Para isso, foram pesados 10 gramas de fenantreno num béquer, onde foi adicionada uma quantidade de acetona suficiente para a dissolução. O conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 1000 mL. O béquer foi lavado várias vezes com o solvente e o conteúdo, transferido para o balão. Completou-se o volume com acetona.

Foram calculados os volumes necessários da solução de 10 g/L de fenantreno a serem adicionados às amostras de solo, de tal forma a obter os seguintes teores do poluente: 1 g/Kg, 2 g/Kg, 3 g/Kg, 5 g/Kg e 8 g/Kg. Assim, foi necessária a preparação de sete amostras de solo, pois além daquelas correspondentes aos dos 5 diferentes teores de fenantreno, foi preparada uma amostra para o teste em branco e uma para o controle. As amostras foram preparadas em cápsulas de porcelana contendo a massa de solo necessária para montar três respirômetros. Como cada respirômetro deve conter 50 g de solo seco, cada cápsula deveria conter 250g de solo seco, quantidade suficiente para a realização do ensaio em triplicata e para a obtenção da umidade residual do solo

contaminado com os diferentes teores de fenantreno. Porém, a massa de solo seco foi calculada para uma umidade de 23,12% (primeira determinação da umidade para o solo estéril) e a massa transferida para cada cápsula foi de 307,80g. Como a umidade do solo estéril foi determinada novamente para uma amostra mais representativa, os teores do contaminante em cada cápsula tiveram que ser recalculados para umidade de 19,10% e massa de solo seco de 258,65g. Portanto, os teores de contaminante em cada cápsula foram de 7.732 mg/Kg, 4.833 mg/Kg, 2.900 mg/Kg, 1.933 mg/Kg e 967 mg/Kg.

As cápsulas contendo as amostras de solo foram colocadas na capela, onde foi feita a contaminação com a solução de fenantreno em acetona. O volume de 250 mL foi adotado para todas as amostras, a fim de permitir que o solo contido em cada cápsula fosse totalmente coberto. Na contaminação das amostras, foram pipetados numa proveta de 250 mL, volumes de solução de 10 g/L de fenantreno necessários para atingir cada teor pré determinado. Em seguida, o volume era completado com acetona. A Tabela 11 mostra os volumes adicionados em cada amostra.

Tabela 11: Volumes de acetona e de solução de fenantreno adicionados em cada amostra de solo

Teste	Volume de solução de fenantreno 10 g/ L (mL)	Volume de acetona (mL)
Branco	0	0
Controle	0	250
1	25	225
2	50	200
3	75	175
4	125	125
5	200	50

Após a adição dos volumes, a homogeneização foi realizada com o auxílio de uma espátula e as cápsulas permaneceram na capela (Figura 14) com fluxo de ar ligado, para minimizar o risco de contaminação microbiológica, durante seis dias, a fim de garantir a evaporação total do solvente.



Figura 14: Cápsulas contendo amostras de solo contaminado, aguardando a evaporação total do solvente em capela.

No teste em branco, somente carbonato de cálcio, água e nutrientes foram adicionados para a obtenção da geração de gás carbônico resultante da interação destes com os componentes do solo. No controle, além destes, foi adicionada a acetona. Como a

contaminação das outras amostras de solo foi feita adicionando-se uma solução de fenantreno em acetona, o controle foi necessário para investigar a interação da acetona com a água, os nutrientes e o produto utilizado para acertar o pH. Este procedimento não é recomendado pela NBR 14283 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1999), mas foi investigado em função dos resultados obtidos por CARRARA (2003). Portanto, da massa de gás carbônico gerado nas amostras de solo contaminado, deveriam ser subtraídas as geradas no controle.

d) Ajuste do teor de umidade do solo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1999)

Um dia antes da montagem dos respirômetros, foram coletadas duas amostras de solo de cada cápsula para a determinação da umidade e posterior ajuste.

O teor de umidade adotado foi de 60% da capacidade de campo obtida, isto é, 59,55%. Portanto, a umidade do solo nos respirômetros foi ajustada para 35,73%, pela introdução de água destilada.

e) Ajuste do pH

A quantidade de carbonato de cálcio adotada para ser adicionada em cada respirômetro foi de 100 mg por 10 g de solo úmido com 17,05 % de umidade (porcentagem de umidade na amostra de solo utilizada para determinar as curvas de neutralização). A

adição desta quantidade de carbonato de cálcio aumentou o pH do solo de 4,5 para aproximadamente 6,5.

f) Balanceamento de nutrientes

Os nutrientes foram aplicados em todas as séries de ensaios. O teor de nutrientes no solo foi calculado de acordo com os teores do contaminante na amostra de solo para atender a proporção de carbono: nitrogênio: fósforo recomendada pela NBR 14283 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1999), que é de 300: 5: 1.

Os nutrientes utilizados foram o sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e o fosfato mono potássico (K_2HPO_4) .

g) Montagem dos respirômetros

Seis dias após a contaminação do solo, período que garantiu a evaporação total do solvente, os respirômetros foram montados sem a adição de microrganismos exógenos, para testar o método quanto à necessidade do teste em branco e do controle. Os ensaios não foram feitos em triplicata. Foram montados sete respirômetros: o do teste em branco, o do controle e um com cada teor de contaminante.

Os respirômetros foram incubados a 20° C.

Primeiramente, a amostra de solo foi colocada no respirômetro, seguida pela adição do carbonato de cálcio e por uma solução de nutrientes em água, para ajuste da umidade. O conteúdo foi homogeneizado com o auxílio de uma espátula e vedado cuidadosamente, para impedir a entrada de gás carbônico, como mostra a Figura 15.



Figura 15: Vedação do respirômetro para impedir a entrada de gás carbônico.

A Tabela 12 mostra as quantidades de solo úmido introduzidas nos sete respirômetros e as quantidades adicionadas de água, nutrientes e carbonato de cálcio.

Tabela 12: Quantidades de solo úmido introduzidas nos sete respirômetros e quantidades adicionadas de água, nutrientes e carbonato de cálcio.

Teste	Obs:	Massa de solo seco no respirômetro (g)	Umidade (%)	Massa de solo úmido (g)	Massa (NH₄)₂SO₄ (g)	Massa de K₂HPO₄ (g)	Massa de CaCO₃ (g)	Água (g)
Branco	solo, nutrientes	50	4,53	52,27	0,01855	0,00444	0,6	15,60
Controle	solo, nutrientes e solvente	50	4,31	52,15	0,01855	0,00444	0,6	15,01
Respirômetro teste 1: 967 mg/Kg	solo, nutrientes, solvente e contaminante	50	4,32	52,16	0,01855	0,00444	0,6	15,71
Respirômetro teste 2: 1.933 mg/Kg	solo, nutrientes, solvente e contaminante	50	4,21	52,10	0,03709	0,00882	0,6	15,77
Respirômetro teste 3: 2.900 mg/Kg	solo, nutrientes, solvente e contaminante	50	4,12	52,06	0,05569	0,01326	0,6	15,81
Respirômetro teste 4: 4.833 mg/Kg	solo, nutrientes, solvente e contaminante	50	3,99	51,99	0,09278	0,02208	0,6	15,88
Respirômetro teste 5: 7.732 mg/Kg	solo, nutrientes, solvente e contaminante	50	4,06	52,03	0,1484	0,03534	0,6	15,84

**h) Quantificação do gás carbônico produzido na biodegradação
(ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1999)**

A medição da produção de CO_2 foi realizada através da titulação da solução de hidróxido de potássio (KOH), onde o CO_2 estava dissolvido, com solução de ácido clorídrico (HCl).

Para a titulação, foram adicionadas 2 gotas de fenolftaleína e 1 mL de solução de cloreto de bário (BaCl_2) em cada béquer.

A solução de KOH contendo CO_2 foi retirada do respirômetro de Bartha com uma seringa de 20 mL. Para isto, a rolha de borracha do filtro de cal soldada foi removida e a válvula para entrada de oxigênio no respirômetro, aberta.

A solução de KOH foi introduzida no béquer contendo a fenolftaleína e a solução de cloreto de bário. Foram realizadas três lavagens do braço lateral do respirômetro com 10 mL de água destilada isenta de CO_2 . Imediatamente após estas lavagens, foi feita a titulação da solução de KOH com a de HCl (0,1 N). A quantidade de ácido necessária para a viragem da coloração rosa para incolor era anotada e uma nova solução de KOH era repostada imediatamente no respirômetro de Bartha.

Para cada ensaio, foi realizada a prova em branco em um béquer contendo 10 mL de solução de KOH (0,2 N), 2 gotas de fenolftaleína, 1 mL de solução de cloreto de bário (1 N), e 30 mL de água destilada isenta de CO₂. A prova em branco foi feita em triplicata.

Para cada respirômetro, a produção de gás carbônico foi calculada pela seguinte expressão:

$$\text{mg CO}_2 \text{ solo resíduo} = (A - B) \times 50 \times 0,044 \times f_{\text{HCl}} \quad (11)$$

onde:

A= volume de solução de HCl 0,1 N gasto para titular a solução do KOH da prova em branco, em mL

B= volume de solução de HCl 0,1 N gasto para titular a solução de KOH dos reatores-teste, em mL

50= fator para transformar equivalente em μmol de CO₂

0,044 = fator para transformar μmol em mg

f_{HCl} = fator de solução de HCl 0,1 N

Um cálculo idêntico ao anterior foi efetuado para o teste em branco e para o controle.

Foi construído um gráfico para representar a quantidade de CO₂ produzida em função do tempo de incubação.

Para determinar a quantidade de gás carbônico produzido devido a biodegradação (CO₂)_b, foi subtraída a quantidade de CO₂ produzida no respirômetro do controle.

Na primeira série de ensaios (Teste 1), observou-se significativa geração de gás carbônico, principalmente no início do monitoramento. As quantidades de gás carbônico geradas em todos os respirômetros foram semelhantes durante todo o período de monitoramento, que foi de 25 dias. Este foi determinado levando-se em consideração o tempo que seria necessário para que as reações de equilíbrio do carbonato de cálcio terminassem e a partir daí começasse a ser quantificado somente o gás carbônico devido à biodegradação. Somente neste teste, foram realizadas mais quatro titulações entre o quinquagésimo nono dia e o octogésimo sétimo dia para verificar se a geração de gás carbônico permanecia. Considerando a NBR 14283 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1999), o equilíbrio dos carbonatos deveria ser alcançado em uma semana.

Assim, foi montada uma segunda série de ensaios (Teste 2), onde as amostras de solo permaneceram em contato com o carbonato de cálcio, em cápsulas de porcelana, durante sete dias, antes da montagem dos respirômetros. As cápsulas com as amostras de solo permaneceram em capela com o fluxo de ar ligado, para reduzir a contaminação

microbiológica. O procedimento teve como objetivo a estabilização mais rápida do carbonato de cálcio dentro dos respirômetros. Porém, mesmo adotando esse procedimento, houve a geração de gás carbônico em quantidades muito próximas as do primeiro teste.

Outra série de ensaios foi realizada (Teste 3), seguindo os mesmos procedimentos dos testes 1 e 2, mas sem a adição de carbonato de cálcio. Os resultados também mostraram geração de gás carbônico, porém em quantidades menores.

Como houve geração de gás carbônico nos testes 1, 2 e 3, no momento de desmontar os respirômetros dos dois primeiros testes, no final do monitoramento, foram coletadas amostras do solo para contagem das bactérias heterotróficas. Foram coletadas cinco amostras combinadas: uma dos testes em branco, uma dos controles e uma de cada teste dos respirômetros contendo solo contaminado. Como o solo estava contaminado nessas três amostras, o fenantreno foi adicionado ao meio de cultura numa concentração de 0,1 mg/L. Houve crescimento em todas as placas, em duas diluições, de 1 e de 0,1 mL. Colônias de cada placa foram isoladas em tubos de ensaio contendo o meio de cultura com a mesma concentração de fenantreno e também houve crescimento de todas elas.

4.2.2 Ensaios para averiguar a estanqueidade dos respirômetros

Para investigar se poderia haver algum tipo de infiltração de gás carbônico no sistema, um respirômetro foi montado somente com a solução de hidróxido de potássio no braço

direito, sem a amostra de solo. As titulações foram efetuadas freqüentemente e em todas elas não houve geração de gás carbônico. Os resultados mostraram que o sistema de vedação no respirômetro era eficiente, não permitindo entrada de gás carbônico.

4.2.3 Teste 4 – Ensaios com amostras de solo esterilizadas diversas vezes

Com o objetivo de melhorar a eficiência da esterilização e investigar melhor a geração de gás carbônico devida aos fatores abióticos, foram feitas de 2 até 6 esterilizações nas amostras de solo, dessa vez livre de contaminação (Teste 4). No intervalo entre uma e outra esterilização, a amostra de solo ficava exposta ao ar de um dia para o outro. Este procedimento teve como finalidade a eclosão dos esporulados que poderiam resistir à esterilização. Após a última esterilização, foram retiradas duas amostras de solo: uma para determinar a umidade e outra para a contagem das bactérias heterotróficas e dos esporulados. O restante era guardado em câmara fria, numa embalagem plástica fechada hermeticamente, até o momento da montagem dos respirômetros. Esta foi realizada seguindo os mesmos procedimentos do Teste 1, diferenciada apenas pela ausência do contaminante. Cabe ressaltar que nesta série de ensaios, os respirômetros também foram esterilizados. Os ensaios foram feitos em duplicata. O monitoramento desses respirômetros também mostrou geração de gás carbônico em quantidades semelhantes às dos testes 1 e 2, independente do número de esterilizações. Assim, no momento da desmontagem dos respirômetros, foram coletadas amostras de solo para a contagem das bactérias heterotróficas e dos esporulados.