

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Classificação e Caracterização do Solo Estudado

a) Classificação do solo original

A Tabela 13 mostra a descrição morfológica realizada no campo para os diversos horizontes identificados.

Tabela 13: Descrição morfológica do solo estudado.

Amostra	Horizonte	Profundidade(cm)	Descrição
1	A ₁	0-12	Bruno avermelhado escuro (2,5YR 3/2 úmido), argilosa, grumosa, grande, fraca, friável, plástica e pegajosa, transição clara e ondulada, raízes abundantes
2	A ₁₂	12-28	Bruno avermelhado (2,5 YR 4/3 úmido), argilosa, subangular média a pequena, fraca, friável, plástica e pegajosa transição difusa e plana
3	B ₁	28-60	Bruno avermelhado (2,5 YR 4/4 úmido), argilosa, subangular média a pequena fraca, friável, plástica e pegajosa, transição difusa e plana
4	B ₂₁	60/102	Vermelho (2,5 YR 3/3 úmido), com mosqueamento comum grande, bruno avermelhado (2,5 YR 4/4 úmido) * argilosa, granular, muito friável, plástica e pegajosa, transição difusa e plana
5	B ₂₂	102-155	Vermelho (2,5 YR 3/6 úmido), argilosa, granular, muito friável, plástica e pegajosa, transição difusa e plana
7 E 8	B ₂₃	155-350	Vermelho (10 YR 4/6 úmido), argilosa, granular, muito friável, plástica e pegajosa.
* Amostra 6 (mancha)			

Cabe ressaltar que a repetição da descrição morfológica, realizada posteriormente no laboratório de Pedologia da Faculdade de Geografia, mostrou que as amostras 7 e 8 representavam o mesmo horizonte.

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos nas análises químicas para fins de levantamento das oito amostras realizadas no Laboratório do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

Tabela 14: Resultados das análises químicas do solo para fins de levantamento.

Amostra	pH	M.O.	P	S	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	T	V	M	Ki	Kr
	CaCl ₂	g/dm ³	mg/ dm ³		mmol _c / dm ³							%			
1	3,8	38	5	25	1,1	3	1	18	98	5,1	103,1	5	78	0,99	0,85
2	3,9	27	2	66	0,3	1	1	16	80	2,3	82,3	3	87	0,94	0,81
3	3,9	19	1	107	0,6	1	1	15	80	2,6	82,6	3	85	0,76	0,66
4	3,9	20	1	76	0,2	1	1	15	88	2,2	90,2	2	87	0,88	0,76
5	4,0	15	1	367	0,2	1	1	9	47	2,2	49,2	4	80	0,82	0,71
6	3,9	18	1	93	0,6	110	50	12	64	160,6	224,6	72	7	**	**
7	4,3	9	1	403	0,2	1	1	3	28	2,2	30,2	7	58	0,75	0,64
8	4,6	7	1	123	0,2	1	1	2	22	2,2	24,2	9	48	1,01	0,87

M.O. = materia orgânica; SB = soma de bases (Ca²⁺ + Mg²⁺ + K⁺); Acidez titulável = Al³⁺; Acidez trocável = H⁺;

T = CTC = Al³⁺ + H⁺ + SB; V (%) = SB/T x 100; M (%) = (Al/Al + S) x 100; Ki = ((%SiO₃)/60)/((%Al₂O₃)/102);

Kr = ((%SiO₃)/60)/((%Al₂O₃)/102 + (%Fe₂O₃)/160))

O latossolo é um tipo de solo desenvolvido a partir de material submetido à intensa intemperização, resultando num empobrecimento em sílica e num importante acúmulo de ferro. O valor de K_i , apresentado na Tabela 14, indica a perda absoluta de sílica, devendo ser, para os latossolos, menor que 2,2, condição verificada em todos os horizontes analisados. O K_r representa o acúmulo relativo de ferro e se for menor ou igual a 0,75, como verificado na maioria dos horizontes analisados, tem-se um solo oxidico, caracterizando um latossolo (EMBRAPA, 1999).

O valor de V (%) define se o solo é eutrófico ou distrófico. Se este valor for menor que 50%, o solo é distrófico. Pode-se observar que o solo estudado é altamente distrófico, com exceção da amostra 6, que foi coletada de um canal biológico formado no horizonte B_{21} . Os altos valores de V e de Ca , obtidos para esta amostra, podem indicar provável calagem do solo.

O caráter álico, definido por valores de M maiores que 50%, reflete a saturação das cargas superficiais das argilas, por íons Al^{3+} .

Nos latossolos, a relação silte/argila deve ser menor que 0,6, indicando um solo de alto grau de intemperismo, já que a fração silte é constituída por minerais primários. Na análise granulométrica, realizada no Laboratório de Pedologia da Faculdade de Geografia, foi obtida a relação de 0,36 para o B_{21} .

Além disso, os latossolos devem apresentar pouca diferenciação entre seus horizontes, que pode ser verificada nos resultados apresentados nas tabelas 14 e 15.

Portanto, dos resultados obtidos da descrição morfológica realizada no campo e das determinações feitas no Laboratório do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz e no Laboratório de Pedologia da Faculdade de Geografia, ambos da Universidade de São Paulo, conclui-se que o solo estudado pode ser classificado em Latossolo Vermelho-Escuro, de textura argilosa e álico.

b) Identificação das fases cristalinas

Amostras dos quatro primeiros horizontes identificados no perfil foram encaminhadas para análises por difratometria de raios X e por fluorescência de raios X no Laboratório de Caracterização Tecnológica do Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica.

Os resultados obtidos nas análises por difratometria de raios X das quatro amostras de solo indicaram a presença predominante das seguintes fases cristalinas: quartzo (SiO_2), Gibsita ($\text{Al}(\text{OH})_3$), Hematita (Fe_2O_3), Anatásio (TiO_2), Caulinita ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$) e Cristobalita (SiO_2).

Os resultados obtidos na análise química semiquantitativa por fluorescência de raios X estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Resultados em porcentagem de óxidos, normalizados a 100%, das quatro amostras de solo dos horizontes mais superficiais.

Composto	Amostra			
	A ₁	A ₁₂	B ₁	B ₂₁
Al ₂ O ₃	30,1	31	31,6	31,5
SiO ₂	31,6	32,5	29,3	28,9
P ₂ O ₅	0,15	0,13	0,12	0,12
SO ₃	0,19	0,18	0,21	0,22
K ₂ O	0,10	0,07	0,07	0,06
CaO	0,06	0,09	Não detectado	0,05
TiO ₂	2,31	2,41	2,42	2,48
Cr ₂ O ₃	0,04	0,04	0,04	0,02
MnO	0,02	0,02	0,02	0,01
Fe ₂ O ₃	10,8	10,7	11,4	11,4
ZnO	0,01	0,01	<0,01	0,01
Ga ₂ O ₃	0,01	0,01	0,01	0,01
Br	0,01	0,01	0,01	0,01
SrO	0,01	0,01	0,01	0,01
Y ₂ O ₃	<0,01	Não detectado	Não detectado	<0,01
ZrO	0,14	0,15	0,14	0,14
Nb ₂ O ₅	0,01	0,01	0,01	0,01
PbO	0,01	0,01	0,01	0,01
ThO ₂	<0,01	<0,01	Não detectado	<0,01
PF	24,5	22,7	24,7	25,1

c) Caracterização microbiológica do solo original

Para caracterização microbiológica do solo original, foi realizada a contagem das bactérias heterotróficas. Foram efetuadas seis diluições e na contagem após 72 horas, o número de unidades formadoras de colônia por grama de solo foi de $3,3 \times 10^5$, valor na mesma ordem de grandeza daqueles encontrados por BATISTA, RUIVO e OLIVEIRA (2005) – 10^4 UFC/g de solo em amostras de latossolo amarelo e MELLONI et al (2001), 10^6 e 10^7 UFC/g de solo em amostras de cambissolo e de solo podzólico vermelho-amarelo, respectivamente.

d) Determinação da umidade residual do solo original

A Tabela 16 mostra os valores obtidos nas pesagens e as porcentagens de umidade do solo original (w).

Tabela 16: Massas utilizadas para o cálculo da umidade do solo original após primeira secagem ao ar e valores de umidade obtidos.

	P0 (g)	P1 (g)	P2 (g)	P _{solo seco} (g)	P _{água} (g)	w %
Amostra 1	39,51	142,41	121,64	82,13	20,77	25,29
Amostra 2	36,16	127,75	109,42	73,26	18,33	25,02

P0 = massa da cápsula, P1 = massa da cápsula + solo+ umidade, P2 = massa da cápsula + solo seco, P_{solo seco} = massa do solo seco, P_{água} = massa de água e w = umidade

A Tabela 17 mostra os valores obtidos nas pesagens e a porcentagem de umidade no solo após a segunda secagem.

Tabela 17: Massas utilizadas para o cálculo da umidade do solo original após segunda secagem ao ar e valores de umidade obtidos.

	P0 (g)	P1 (g)	P2 (g)	P _{solo seco} (g)	P _{água} (g)	w %
Amostra 1	26,99	106,64	95,07	68,08	11,57	16,99
Amostra 2	27,13	98,81	88,34	61,21	10,47	17,10

P0 = massa da cápsula, P1 = massa da cápsula + solo+ umidade, P2 = massa da cápsula + solo seco, P_{solo seco} = massa do solo seco, P_{água} = massa de água e w = umidade

e) Determinação da umidade residual do solo esterilizado

Foram obtidos os seguintes valores de umidade para o solo esterilizado:

Tabela 18: Massas utilizadas para o cálculo da umidade do solo estéril e valores de umidade obtidos.

	P0 (g)	P1 (g)	P2 (g)	P _{solo seco} (g)	P _{água} (g)	w %
Amostra 1	31,15	90,13	79,27	48,12	10,86	22,57
Amostra 2	26,35	81,16	70,67	44,32	10,49	23,67

P0 = massa da cápsula, P1 = massa da cápsula + solo+ umidade, P2 = massa da cápsula + solo seco, P_{solo seco} = massa do solo seco, P_{água} = massa de água e w = umidade

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que a umidade do solo tinha aumentado no processo de esterilização. Assim, como mencionado no capítulo “Material e Métodos”, outras duas amostras mais representativas do volume total esterilizado foram analisadas. Os valores de umidade são mostrados na Tabela 19.

Tabela 19: Massas utilizadas para o segundo cálculo da umidade do solo estéril e valores de umidade obtidos.

	P0 (g)	P1 (g)	P2 (g)	P _{solo seco} (g)	P _{água} (g)	w %
Amostra 1	26,99	95,85	84,75	57,76	11,10	19,22
Amostra 2	27,13	107,01	94,26	67,13	12,75	18,99

P0 = massa da cápsula, P1 = massa da cápsula + solo+ umidade, P2 = massa da cápsula + solo seco, P_{solo seco} = massa do solo seco, P_{água} = massa de água e w = umidade

Os valores obtidos na repetição do ensaio mostraram que a umidade do solo esterilizado aumentou em relação ao solo seco, provavelmente, devido à entrada do vapor d'água da autoclave nos pacotes.

f) Contagem das bactérias heterotróficas do solo esterilizado

Como esperado, a amostra de solo esterilizado não apresentou unidades formadoras de colônia (UFC) em nenhuma das diluições, no instante inicial, que corresponde às amostras que foram retiradas após esterilização na autoclave e armazenadas em câmara fria até a montagem dos respirômetros. Porém, foram verificadas unidades formadoras

de colônia nas amostras retiradas dos respirômetros após o período de monitoramento. Este resultado será discutido no item 5.3.1.

g) Determinação da densidade aparente, da umidade residual e da capacidade de campo

A Tabela 20 mostra os valores obtidos nos ensaios para determinação da densidade aparente (ρ), umidade residual (w) e capacidade de campo (CC):

Tabela 20: Massas utilizadas para o cálculo da densidade aparente, umidade residual e capacidade de campo e resultados obtidos:

Amostra	V1 (cm ³)	M1 (g)	M2 (g)	M3 (g)	M4 (g)	M5 (g)	ρ (g/cm ³)	w (%)	CC (g H ₂ O/100g solo seco) (%)
1	240,36	121,64	116,54	356,69	308,16	428,23	0,80	25,3	60,00
2	240,36	122,98	117,41	357,09	308,56	428,37	0,80	25,4	59,76
3	240,36	125,96	120,92	348,10	302,03	413,71	0,75	25,4	58,88

V = volume do anel, M1 = massa do conjunto saturado com água, M2 = massa do conjunto seco, M3 = massa do conjunto seco + solo, M4 = massa do conjunto + solo seco, M5 = massa do conjunto + solo saturado com água, ρ = densidade aparente, w = umidade residual e CC = capacidade de campo (CC).

Os resultados obtidos para a umidade residual confirmaram os valores obtidos no item d.

h) Determinação do pH do solo

O solo coletado na camada superficial apresentou pH igual a 4,5, confirmando essa característica dos solos tropicais de clima úmido (RANZANI, 1969; SPOSITO, 1989; OLIVEIRA, 1999 e EMBRAPA, 1999). ANDRADE et al. (2003) e LOPES et al. (2005) verificaram pH de 4,0 a 5,0 para amostras de latossolo vermelho.

i) Determinação da curva de neutralização do solo

As duas curvas de neutralização da camada superficial do solo obtidas utilizando carbonato de dois diferentes fabricantes são mostradas na Figura 16.

As duas curvas de neutralização obtidas foram semelhantes e confirmaram a capacidade tampão do solo na camada mais superficial (de 10 a 15 cm de profundidade). Mesmo com a adição de 1000 mg de carbonato de cálcio, o pH não ultrapassou 7,5. Estes resultados corroboram com os encontrados por RIBEIRO (1996) e MONIZ (1972).

O gráfico da Figuras 17 indica as curvas de neutralização obtidas para dois horizontes mais profundos do solo.

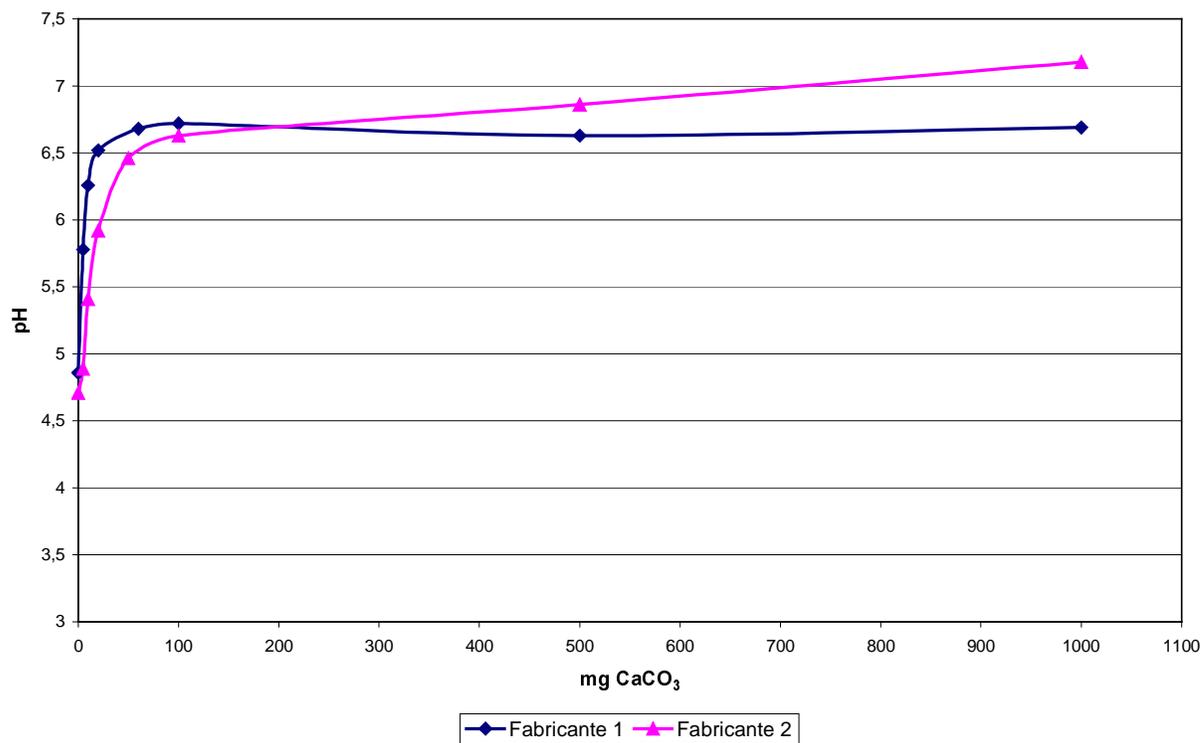


Figura 16: Curva de neutralização do horizonte superficial do solo utilizando-se carbonato de cálcio de dois diferentes fabricantes.

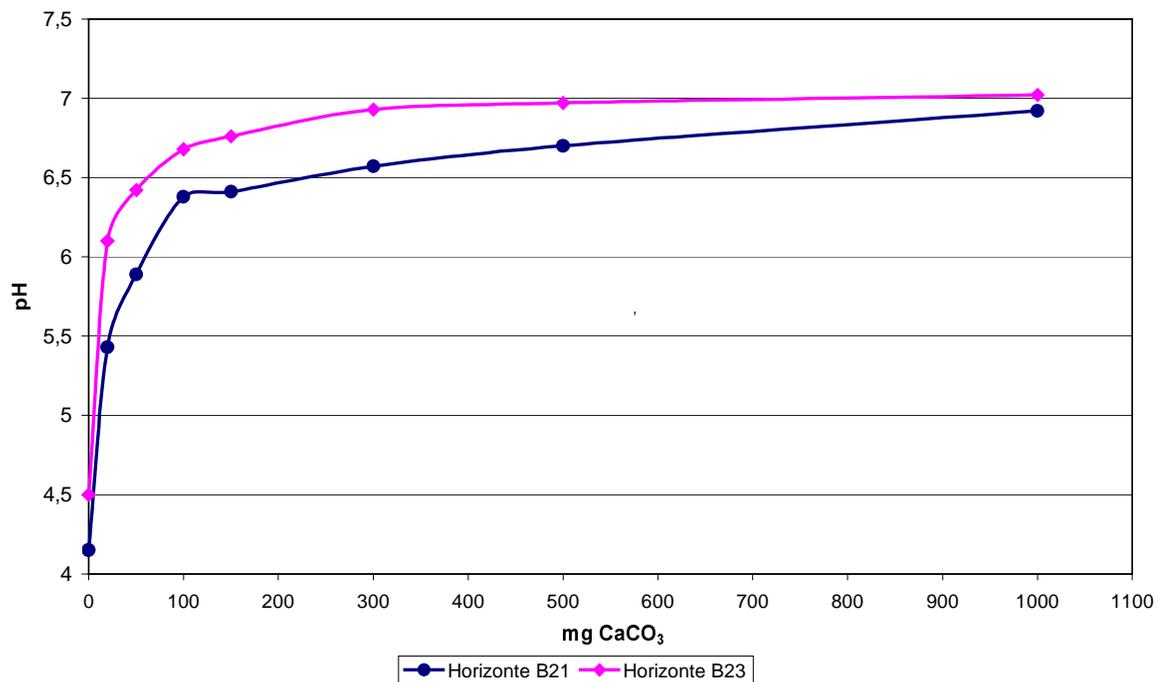


Figura 17: Curva de neutralização do solo nos horizontes B₂₁ e B₂₃, mais profundos.

As curvas de neutralização das amostras de solo de horizontes mais profundos mostraram a mesma capacidade tampão que o horizonte superficial.

5.2 Biodegradação do Fenantreno no Solo

5.2.1 Teste 1

Neste primeiro teste, como o solo foi esterilizado e não foram adicionados microrganismos, esperava-se que não houvesse geração de gás carbônico decorrente da biodegradação do fenantreno. Assim, foi feito, primeiramente, um gráfico da geração acumulada de gás carbônico em função do tempo de incubação, sem descontar a quantidade gerada no controle, para todos os respirômetros (Figura 18).

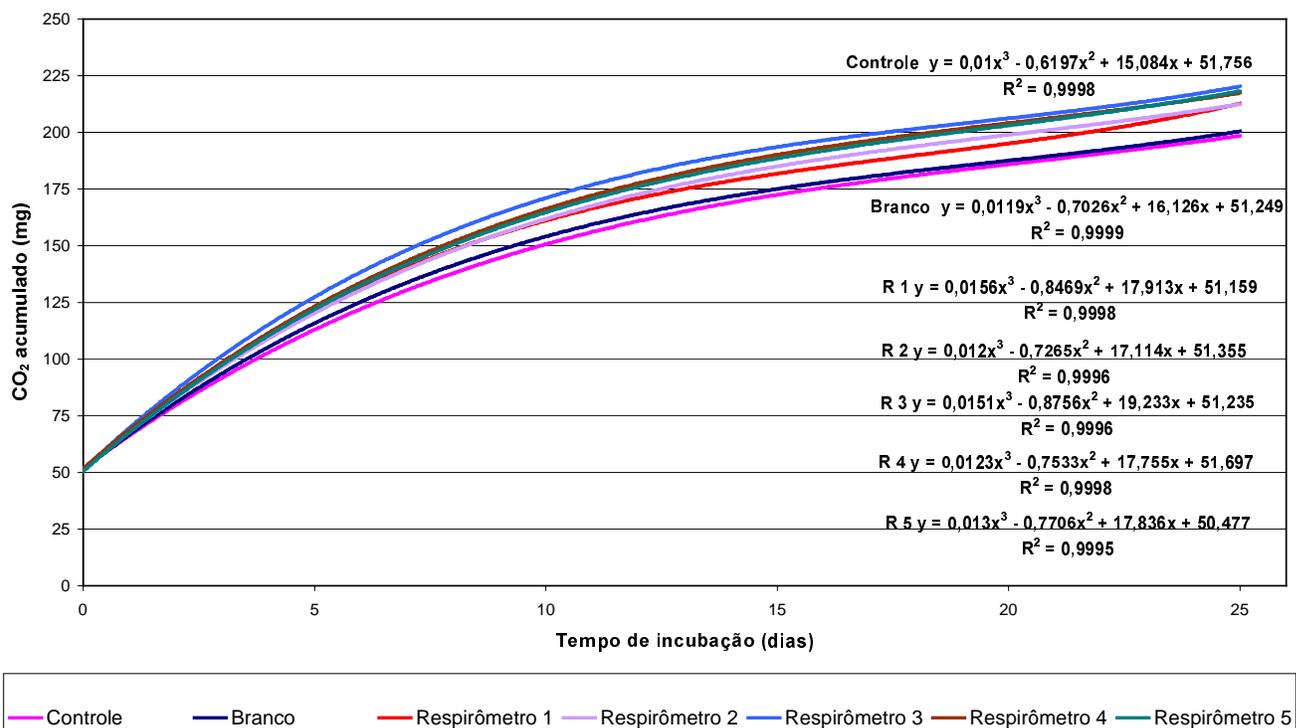


Figura 18: Quantidade acumulada de gás carbônico gerado ao longo do tempo de incubação, com diferentes teores de fenantreno.

A partir do gráfico da Figura 18, pode-se observar que, em todos os respirômetros, houve uma grande geração de gás carbônico. Este comportamento não era esperado porque o solo contido nos respirômetros estava esterilizado e na contagem das bactérias heterotróficas, realizada nas amostras de solo estéril, coletadas no término do processo de esterilização em autoclave, não foram encontradas unidades formadoras de colônias.

Observou-se, também, uma geração maior de gás carbônico no início do monitoramento, aproximadamente até o décimo quinto dia, que corresponde à realização da quinta titulação da solução de KOH. Com base nessa informação, montou-se o gráfico da Figura 19, que mostra a geração média diária de gás carbônico entre as titulações. A Tabela 21 indica o período, em dias, entre elas.

O gráfico da Figura 19 mostra a maior geração de gás carbônico nos primeiros dias de monitoramento, indicando a existência de outras fontes de gás carbônico, além da biodegradação do contaminante.

Apesar da biodegradação do contaminante não ter sido considerada inicialmente, devido à esterilização do solo, observou-se, além da grande geração de gás carbônico, principalmente no início do monitoramento, uma produção de menores quantidades no respirômetro controle em relação aos que continham o contaminante. Assim, considerando que ocorreu biodegradação do fenantreno, foi obtido o gráfico da Figura 20, descontando a geração de gás carbônico dos respirômetros teste daquela obtida no controle.

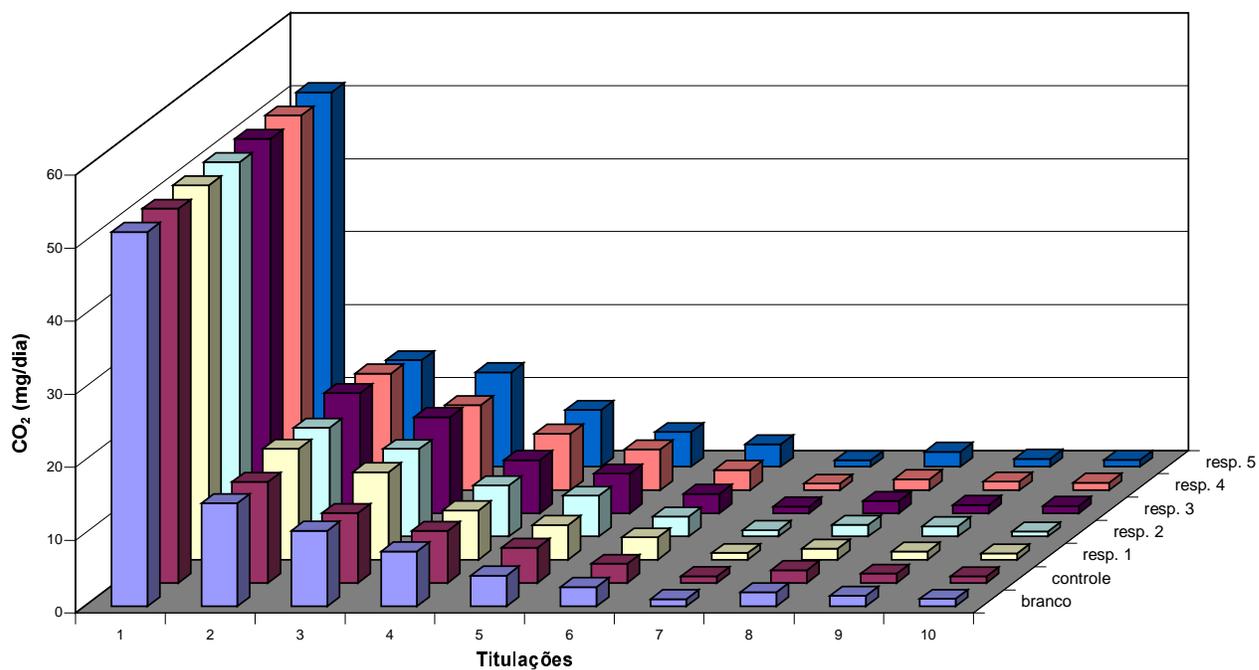


Figura 19: Quantidade média de gás carbônico gerado diariamente nos respirômetros com diferentes teores de fenantreno.

Tabela 21: Período entre as titulações do Teste 1

Titulação n ^o :	Período (dias)	Titulação n ^o :	Período (dias)
1	1	6	11
2	3	7	34
3	3	8	7
4	4	9	10
5	4	10	11

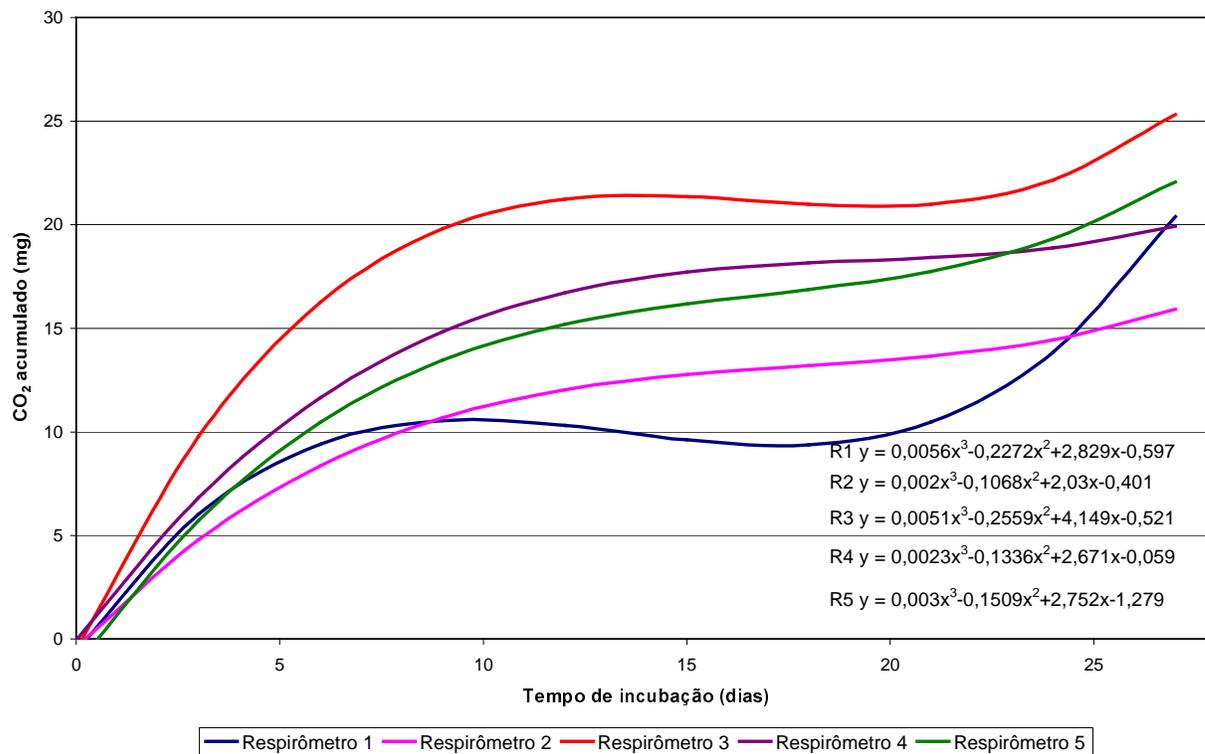


Figura 20: Quantidade acumulada de gás carbônico gerado nos respirômetros, devido à biodegradação do fenantreno, ao longo do tempo de incubação.

A partir do gráfico da Figura 20 e de acordo com a NBR 14283 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1999), concluiu-se que houve biodegradação do fenantreno em todos os teores. As porcentagens de fenantreno removido nos respirômetros 1 (1g/Kg), 2 (2g/Kg), 3 (3g/Kg), 4 (5g/Kg) e 5 (8g/Kg) foram de 12%; 4,5%; 5%; 2,3% e 1,6%, respectivamente.

As taxas de remoção verificadas foram baixas, porém é importante destacar que as amostras de solo passaram pelo processo de esterilização em autoclave e, assim, a

biodegradação do fenantreno foi realizada somente pelos microrganismos do solo que resistiram ao processo de esterilização. Além disso, os teores do contaminante são altos.

Apesar de não terem sido detectadas unidades formadoras de colônia de bactérias heterotróficas nas amostras de solo no tempo inicial, as coletadas dos respirômetros, após 3 meses de incubação, apresentaram crescimento em todas as diluições (este resultado será discutido no item 5.3.1). Após 72 horas de incubação, havia a presença de mais de $1,6 \times 10^5$ UFC/g de solo, o que possibilitou a biodegradação do fenantreno. De acordo com LEPO e CRIPE (1999), a biodegradação do fenantreno presente em areia contaminada com óleo foi possível devido à ação de bactérias marinhas específicas. NOVOTNÝ et al. (2000) e YAGHMAEI (2001) verificaram a biodegradação do fenantreno por fungos no solo e LOIBNER et al. (2003) observaram a biodegradação do fenantreno no solo, tanto por microrganismos nativos quanto por exógenos.

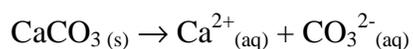
Portanto, mesmo não adicionando microrganismos e esterilizando o solo, as condições favoráveis existentes nos respirômetros possibilitaram o crescimento de microrganismos, que resistiram ao processo de esterilização em autoclave e não foram detectados na contagem do tempo inicial, que foram capazes de remover até 12% do fenantreno, no teor de 1g/Kg. Acima deste teor – 5 e 8 mg/kg – ocorreu a inibição do crescimento, indicada pela menor taxa de remoção.

Entretanto, o crescimento dos microrganismos e a biodegradação do fenantreno efetuada pelos mesmos não explicaria a grande quantidade de gás carbônico gerada nos primeiros

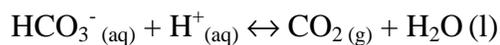
dias de monitoramento. Nesse período, a quantidade de gás carbônico produzida em todos os respirômetros correspondeu a aproximadamente dez vezes a quantidade gerada devido à biodegradação.

5.2.2 Teste 2

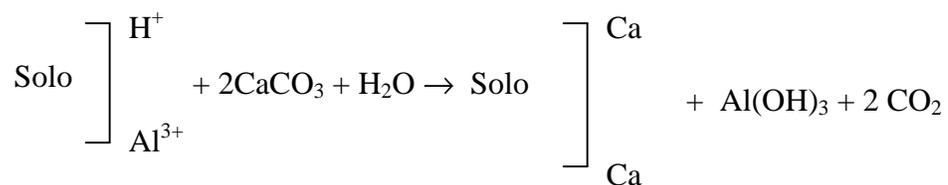
Suspeitou-se que parte da quantidade de gás carbônico gerada inicialmente fosse devido à introdução do carbonato de cálcio para a correção do pH. Assim como mencionado na “Revisão Bibliográfica”, de acordo com STUMM (1992) e HARRIS (1999), o carbonato de cálcio dissolve-se rapidamente em solução ácida, como a dos solos tropicais úmidos, devido a duas reações, onde o produto da primeira é o reagente da segunda.



O bicarbonato reage com o H^+ , presente na fase líquida do solo, formando água e, conseqüentemente, neutralizando-a.



Outra reação que pode representar a neutralização de um solo ácido com carbonato de cálcio é a apresentada a seguir, onde os íons H^+ e Al^{3+} são trocados pelo cálcio, o alumínio é precipitado como hidróxido e o gás carbônico é desprendido (RIBEIRO, 1996).



Desta forma, nesta série de ensaios, as amostras de solo permaneceram em contato com o carbonato de cálcio, em cápsulas de porcelana, durante sete dias, antes da montagem dos respirômetros, para que ocorresse o equilíbrio de carbonatos. Cabe ressaltar que a NBR 14283 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1999) não define o momento da adição do carbonato de cálcio. Porém, mesmo adotando este procedimento, houve a geração de gás carbônico em quantidades próximas às do primeiro teste, como mostra o gráfico da Figura 21. Também pode ser observada a mesma proximidade entre as curvas e a maior geração de gás carbônico no início do monitoramento.

A Figura 22 mostra a geração média diária de gás carbônico entre as titulações e a Tabela 22 indica o período, em dias, decorrente entre elas.

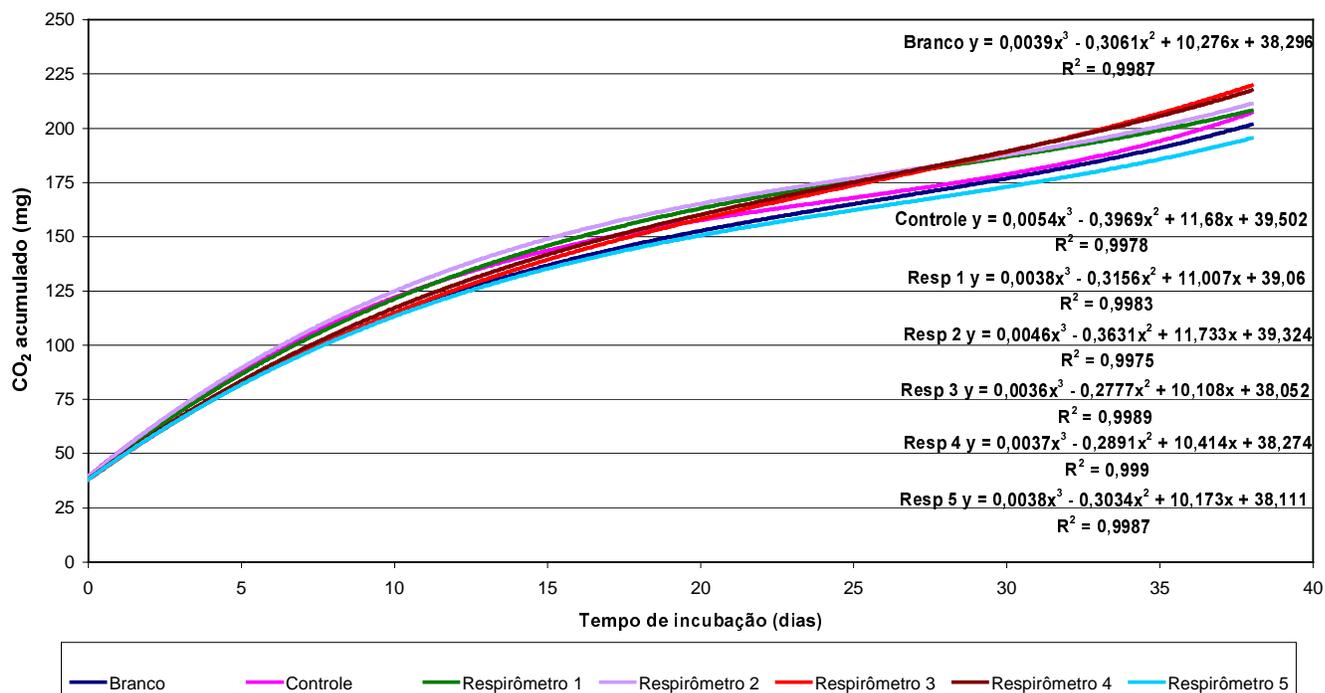


Figura 21: Quantidade acumulada de gás carbônico gerado nos respirômetros com diferentes teores de fenantreno e com o solo deixado em repouso por sete dias.

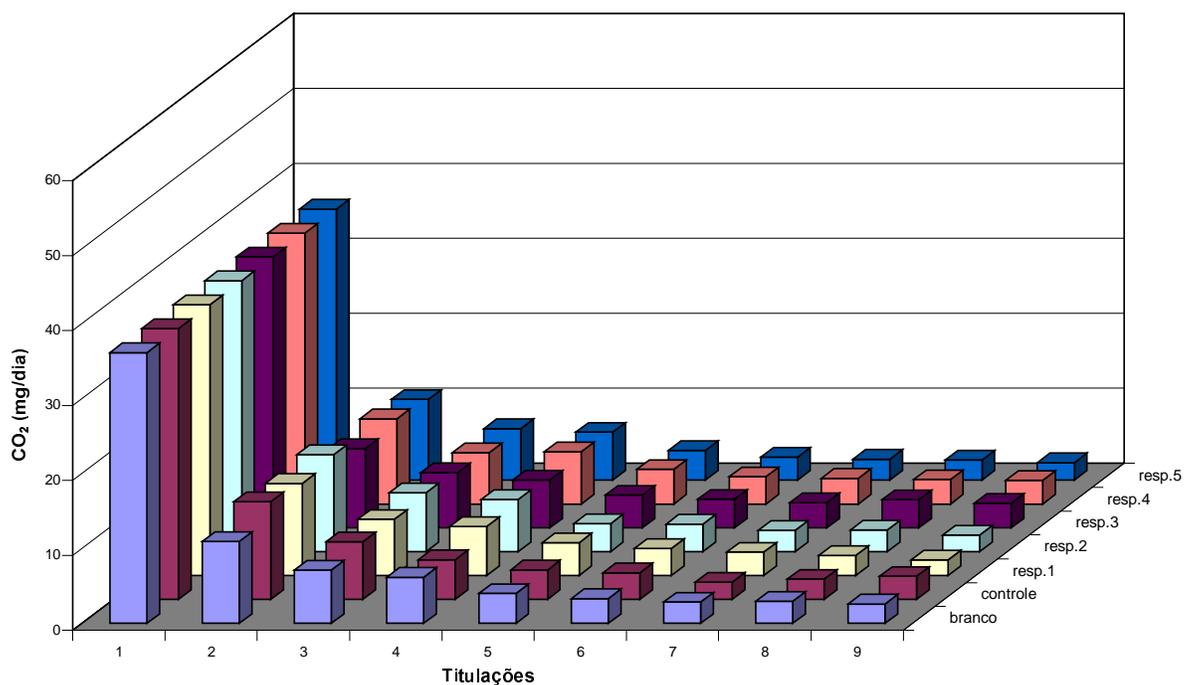


Figura 22: Quantidade média de gás carbônico gerado diariamente nos respirômetros com diferentes teores de fenantreno e com o solo deixado em repouso por sete dias.

Tabela 22: Períodos entre as titulações do Teste 2

Titulação nº:	Período (dias)	Titulação nº:	Período (dias)
1	1	6	4
2	3	7	6
3	4	8	7
4	3	9	7
5	4		

No gráfico da Figura 22, pode ser observado o mesmo comportamento em relação à geração diária de gás carbônico do Teste 1, considerando que o tempo de monitoramento do Teste 2 foi menor.

Como, novamente, foi verificada a geração de quantidades menores de gás carbônico no respirômetro controle em relação aos que continham o contaminante, indicando possível biodegradação, foi construído o gráfico mostrado na Figura 23.

A partir do gráfico da Figura 23, pode-se observar que não houve biodegradação do fenantreno no respirômetro 5, que continha 8g/Kg do poluente. Provavelmente, isto ocorreu devido à toxicidade do contaminante. Nos respirômetros 1 e 2, observa-se que a biodegradação do contaminante não foi iniciada no tempo zero e nos respirômetros 3 e 4, o mesmo aconteceu somente perto do vigésimo dia. Estes períodos podem ter sido os necessários para a adaptação dos microrganismos (REIS, 1998), que apesar de não terem sido detectados na contagem realizada logo após o processo de esterilização, foram encontrados nas amostras coletadas após o período de monitoramento, em todas as diluições. Após 72 horas, havia a presença de mais de $1,6 \times 10^5$ UFC/g de solo.

As taxas de remoção do fenantreno nos respirômetros 1 (1g/Kg), 2 (2g/Kg), 3 (3g/Kg) e 4 (5g/Kg) foram de 1,8%; 1,8%; 3% e 1,6%, respectivamente.

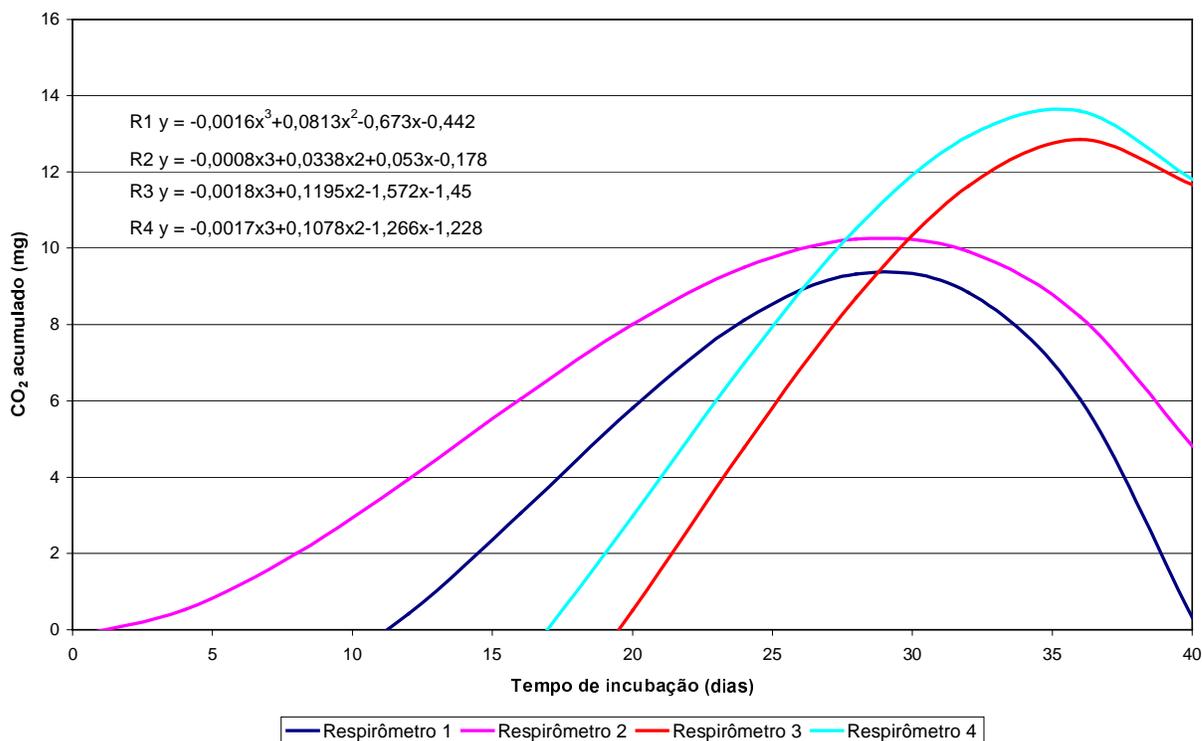


Figura 23: Quantidade acumulada de gás carbônico gerado nos respirômetros contendo diferentes teores de fenantreno, devido à biodegradação (ensaio com amostras de solo deixadas em repouso por sete dias antes de iniciar o monitoramento).

É importante ressaltar que as amostras de solo nesta série de ensaio ficaram em contato com o contaminante por um tempo maior que as do Teste 1, já que o procedimento de contaminação foi realizado uma única vez para uma quantidade de solo suficiente para montar três séries de ensaios (aproximadamente 2 quilos). Além disso, a adição do carbonato de cálcio, dos nutrientes e da água foi efetuada no momento da montagem dos respirômetros e até esse momento as amostras contaminadas permaneciam em um saco plástico fechado hermeticamente. Assim, o contato com o contaminante por mais tempo e a ausência de umidade, oxigênio e nutrientes podem ter retardado o crescimento dos

microrganismos e a biodegradação do contaminante e, no caso do respirômetro com o teor de 8g/Kg, inibido completamente a atividade microbiológica, diferentemente do que aconteceu nos respirômetros do Teste 1, onde, imediatamente após a contaminação, foram adicionados os nutrientes e a umidade, que podem ter acelerado a biodegradação. Tais resultados corroboram com a literatura (CASARINI e SPILBORGHS, 1995; FRTR, 2003 e MARIANO, 2005).

5.2.3 Teste 3

Nos dois primeiros testes, foi possível verificar que a fonte principal de geração inicial do gás carbônico não era a atividade microbiológica, mas reações químicas ocorridas no solo pela presença de grandes quantidades de carbonato de cálcio, necessárias para neutralizar o pH. Assim, foi feita uma série de ensaios, sem a adição do carbonato de cálcio, a fim de excluir essa fonte de geração de gás carbônico.

O gráfico da Figura 24 mostra a geração de gás carbônico para os ensaios sem a adição de carbonato de cálcio. Pode-se observar que a quantidade de gás carbônico gerada é aproximadamente a metade daquela obtida nos dois primeiros testes e a proximidade entre as curvas é menor.

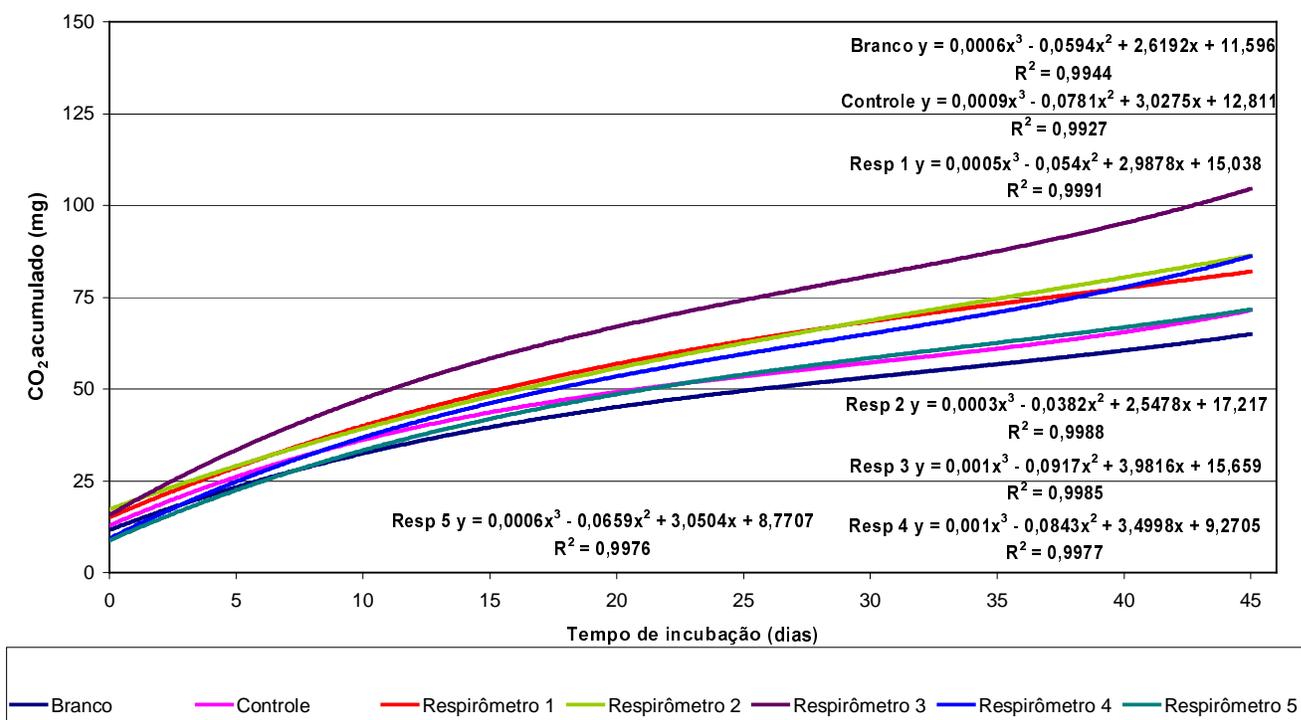


Figura 24: Quantidade acumulada de gás carbônico gerado nos respirômetros com diferentes teores de fenantreno, sem a adição de carbonato de cálcio.

A geração de gás carbônico nos respirômetros, nos quais não foi adicionado o carbonato de cálcio, não é tão acentuada no início do monitoramento como foi verificado nos testes anteriores. O gráfico da Figura 25 mostra a geração média diária de gás carbônico nos respirômetros, sem a adição de carbonato de cálcio. A Tabela 23 indica o período, em dias, decorrente entre as titulações.

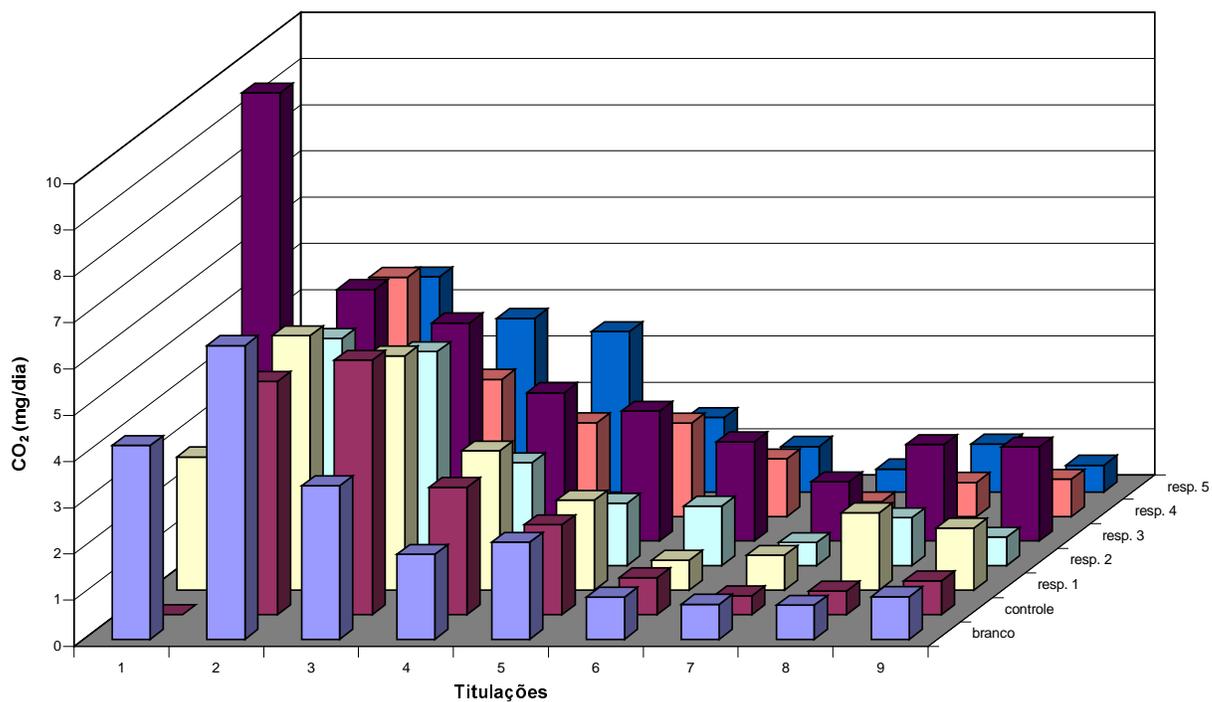


Figura 25: Quantidade média de gás carbônico gerada diariamente nos respirômetros com diferentes teores de fenantreno, sem a adição de carbonato de cálcio.

Tabela 23: Período entre as titulações do Teste 3

Titulação n ^o :	Período (dias)	Titulação n ^o :	Período (dias)
1	1	6	7
2	4	7	3
3	3	8	7
4	4	9	6
5	7		

Diferentemente dos testes 1 e 2, as quantidades médias de gás carbônico geradas diariamente só são próximas a partir da segunda titulação.

Assim como nos testes 1 e 2, foi verificada a geração de quantidades menores de gás carbônico no respirômetro controle em relação a maioria dos que continham o contaminante, indicando a possibilidade de biodegradação do fenantreno (Figura 26).

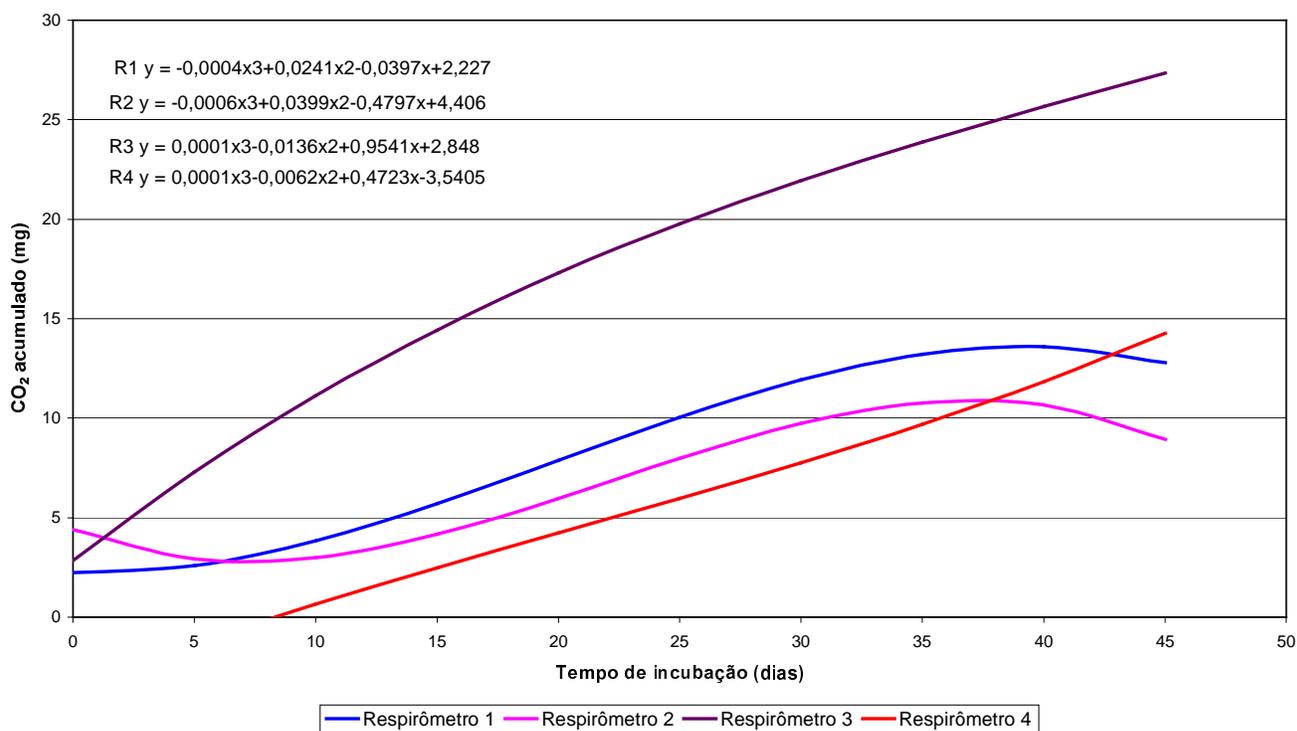


Figura 26: Quantidade acumulada de gás carbônico gerado nos respirômetros, contendo diferentes teores de fenantreno, devido à biodegradação, sem a adição do carbonato de cálcio.

A partir do gráfico da Figura 26, pode-se observar que, mesmo sem a adição do carbonato de cálcio para neutralizar o pH do solo, ocorreu a biodegradação do fenantreno.

Ao contrário do Teste 2, o início da biodegradação do contaminante no Teste 3 já foi verificada nas primeiras titulações dos respirômetros 1, 2 e 3, que continham, respectivamente, 1g/Kg, 2g/Kg e 3g/Kg do contaminante. Não houve um tempo necessário para a adaptação dos microrganismos para estes teores.

As taxas de remoção do fenantreno nos respirômetros 1 (1g/Kg), 2 (2g/Kg), 3 (3g/Kg) e 4 (5g/Kg) foram de 7,2%; 2,4%; 5,4% e 1,7%, respectivamente. Estes valores foram maiores que os obtidos no Teste 2, e próximos aos obtidos no Teste 1, mostrando que não é necessária a adição do carbonato de cálcio para ocorrer a biodegradação, o que indica que os microrganismos que cresceram estavam adaptados ao pH baixo do solo original, conforme indicado por STAPLETON et al (1998) e HWANG e CUTRIGHT (2002).

5.3 Avaliação do Teste Respirométrico de Bartha

5.3.1 Esterilização do solo

Nesta série de ensaios (Teste 4), as amostras de solo não foram contaminadas, pois o objetivo era melhorar a eficiência da esterilização e investigar melhor a quantidade de gás carbônico gerado devido aos fatores abióticos. Assim, foram feitas de 2 até 6 esterilizações antes da montagem dos respirômetros. O monitoramento mostrou que, independentemente do número de esterilizações, as quantidades acumuladas de gás

carbônico gerado em todos os respirômetros eram próximas e semelhantes aos dos testes 1 e 2, como mostra a Figura 27.

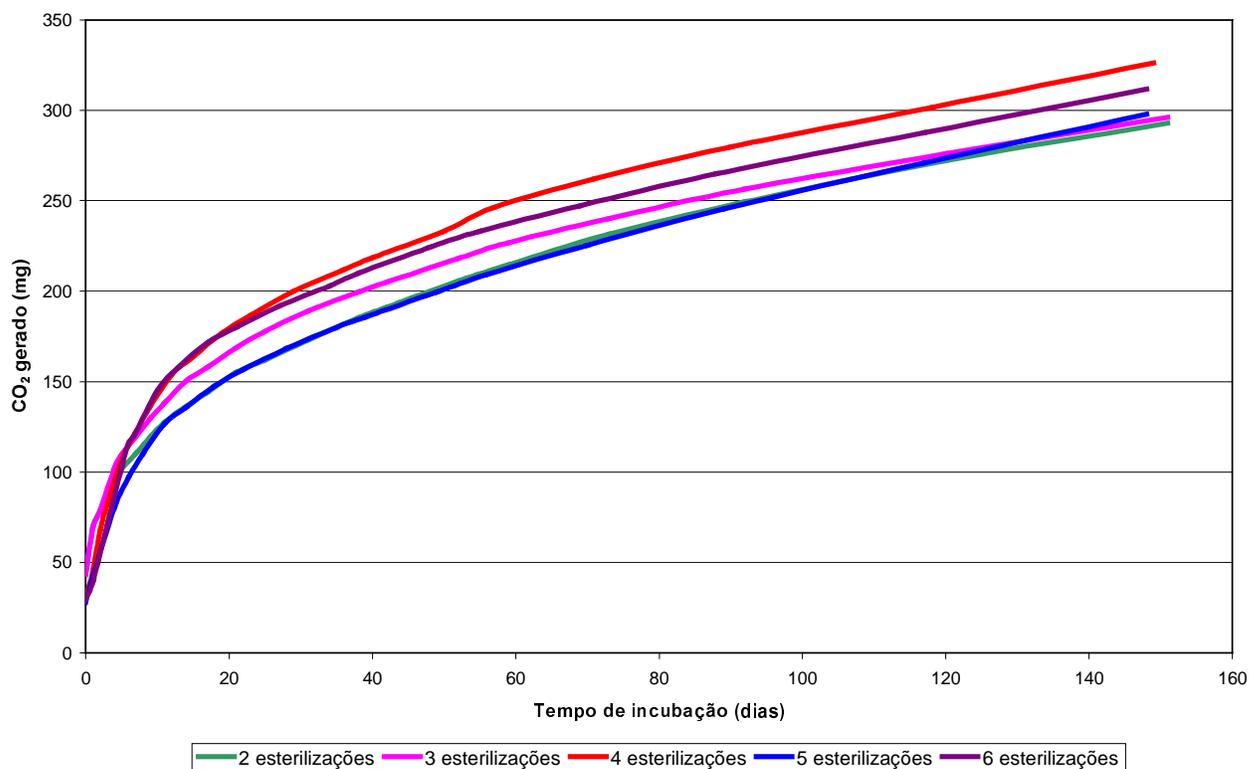


Figura 27: Quantidade acumulada de gás carbônico gerado nos respirômetros, contendo solo isento de contaminação, ao longo do período de monitoramento.

Portanto, de acordo com o gráfico da Figura 27, repetir o procedimento de esterilização em autoclave não aumenta a eficiência da mesma, pois não é possível correlacionar o número de esterilizações com a produção de gás carbônico, que indicaria metabolismo químico pela presença de microrganismos.

Assim como nos testes 1 e 2, a maior geração de gás carbônico ocorreu no início do monitoramento, como mostra o gráfico da Figura 28.

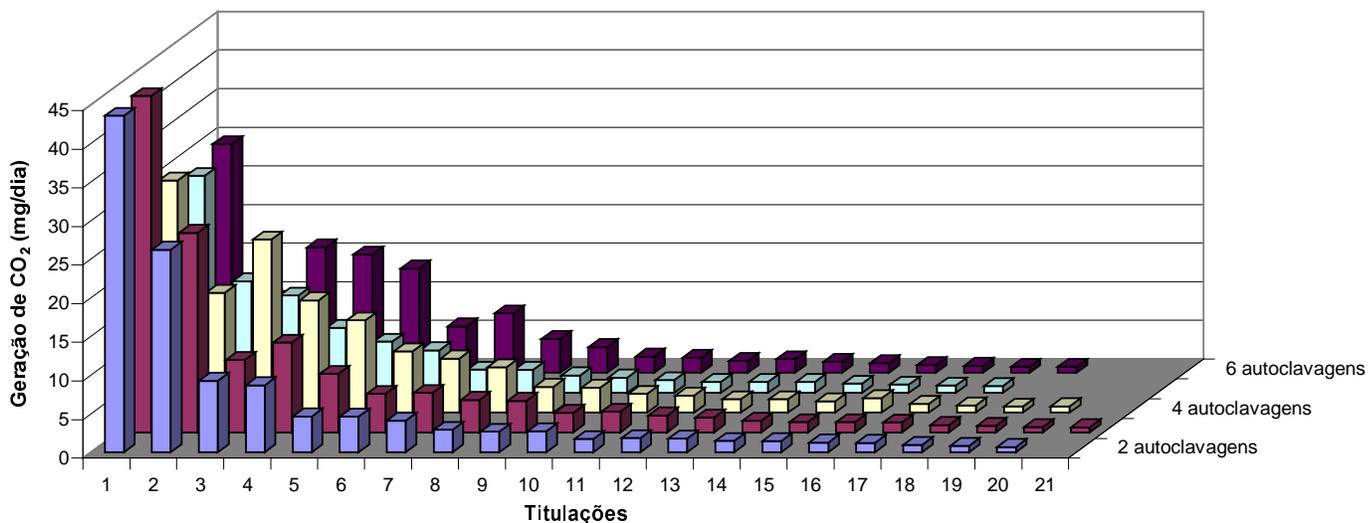


Figura 28: Quantidade média de gás carbônico gerado diariamente em amostras de solo não contaminadas e esterilizadas diversas vezes.

A Tabela 24 indica o período decorrido entre as titulações.

Tabela 24: Período entre as titulações do Teste 4

Titulação n^o:	Período (dias)	Titulação n^o:	Período (dias)
1	1	11	6
2	1	12	7
3	2	13	4
4	2	14	10
5	1	15	7
6	1	16	14
7	3	17	19
8	3	18	29
9	4	19	31
10	4		

A maior geração de gás carbônico ocorre até, aproximadamente, o décimo quinto dia de monitoramento, que neste teste, corresponde à oitava titulação, assim como foi verificado nos testes 1 e 2.

Neste teste, para a caracterização microbiológica das amostras de solo no tempo inicial (coletadas ao final do processo de esterilização) e no tempo final (coletadas após o período de monitoramento), foram realizadas as contagens das bactérias heterotróficas e dos esporulados. Além das amostras no início e final do teste, também foi caracterizada uma amostra de solo não esterilizado.

Na amostra de solo não esterilizado, foram obtidas as seguintes densidades de bactérias heterotróficas e esporulados: $5,1 \times 10^5$ UFC/g após 72 horas e, $1,0 \times 10^2$ UFC/g após 96 horas, respectivamente.

Na contagem das bactérias heterotróficas das amostras de solo no tempo inicial, foram encontradas unidades formadoras de colônia somente na amostra do solo esterilizado seis vezes. O valor obtido foi de $1,0 \times 10^2$ UFC/g de solo, após 72 horas. Nas outras quatro amostras, correspondentes ao solo esterilizado duas, três, quatro e cinco vezes, não houve crescimento nesse período.

Na contagem dos esporulados dessas mesmas amostras, não houve crescimento após 24 horas. Os números de unidades formadoras de colônia, por grama de solo, obtidos após 96 horas, são mostrados na Tabela 25.

Tabela 25: Números de unidades formadoras de colônia obtidos na contagem dos esporulados das amostras no início do Teste 4.

Amostra	UFC/g
Solo autoclavado 3 vezes	$1,0 \times 10^2$
Solo autoclavado 4 vezes	$4,0 \times 10^2$
Solo autoclavado 6 vezes	$6,0 \times 10^2$

A partir dos dados da Tabela 25, pode-se verificar que apesar de não terem sido observadas unidades formadoras de colônia na contagem das bactérias heterotróficas das amostras de solo que foram esterilizadas três e quatro vezes, após 3 dias de incubação, constatou-se a presença de esporulados.

A amostra de solo que foi esterilizada o maior número de vezes (seis) apresentou o maior número de unidades formadoras de colônias, tanto de bactérias heterotróficas quanto de esporulados. Este fato pode ser explicado pela maior manipulação e maior exposição da amostra ao ar, conforme procedimento realizado e mencionado no capítulo “Material e Métodos”.

Na contagem das bactérias heterotróficas das amostras de solo, coletadas após o período de monitoramento, foram obtidos os seguintes resultados, após 72 horas (Tabela 26).

Tabela 26: Números de unidades formadoras de colônia obtidos na contagem das bactérias heterotróficas das amostras coletadas no final do Teste 4.

Amostra	UFC/g
Solo autoclavado 2 vezes	$2,1 \times 10^3$
Solo autoclavado 3 vezes	$2,4 \times 10^5$
Solo autoclavado 4 vezes	$1,8 \times 10^4$
Solo autoclavado 5 vezes	$5,7 \times 10^5$
Solo autoclavado 6 vezes	$2,7 \times 10^5$

Na contagem dos esporulados das mesmas amostras, foram verificadas unidades formadoras de colônia somente nas amostras que foram esterilizadas duas e três vezes. Os resultados obtidos após 96 horas foram, respectivamente, $1,0 \times 10^2$ e $1,0 \times 10^3$ UFC/g de solo.

A Tabela 27 compara os resultados obtidos e mencionados anteriormente.

Tabela 27: Comparação dos resultados obtidos nas contagens de bactérias heterotróficas e de esporulados, no tempo inicial e no tempo final.

Número de autoclavagens	Contagem de bactérias heterotróficas		Contagem de esporulados	
	Tempo inicial	Tempo final	Tempo inicial	Tempo final
2	Não houve crescimento	$2,1 \times 10^3$	Não houve crescimento	$1,0 \times 10^2$
3	Não houve crescimento	$2,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
4	Não houve crescimento	$1,8 \times 10^4$	$4,0 \times 10^2$	Não houve crescimento
5	Não houve crescimento	$5,7 \times 10^5$	Não houve crescimento	Não houve crescimento
6	1×10^2	$2,7 \times 10^5$	$6,0 \times 10^2$	Não houve crescimento

Apesar de não terem sido detectadas unidades formadoras de colônia de bactérias heterotróficas nas amostras de solo no tempo inicial, elas poderiam estar presentes, já que o método da contagem possui uma limitação de detecção de 10 UFC/100g de solo e, de acordo com TORTORA, FUNKE e CASE (2000), o meio de cultura utilizado pode não atender às exigências necessárias de todos os microrganismos existentes no solo.

Além das limitações do método da contagem de bactérias heterotróficas, o crescimento, durante o período de incubação, pode ter ocorrido também porque os microrganismos podem ter sido protegidos fisicamente pelos argilominerais (BURNS, 1979 apud MOREIRA, 2002) durante o processo de esterilização, não terem formado colônias no meio de cultura, utilizado na contagem do tempo inicial, e terem crescido posteriormente nos respirômetros, devido às condições favoráveis existentes (presença de oxigênio, umidade, nutrientes e pH). Cabe ressaltar, também, que a distribuição dos microrganismos no solo não é homogênea e que o processo de esterilização em autoclave altera as características do solo, fazendo com que os microrganismos necessitem de um tempo para se adaptar às novas condições. Assim, o crescimento pôde ocorrer somente após 48 ou 72 horas.

5.3.2 Geração de gás carbônico em função da adição de carbonato de cálcio

O gráfico da Figura 29 mostra as quantidades de gás carbônico geradas nos testes 1, 2 e 3, nos respirômetros em branco.

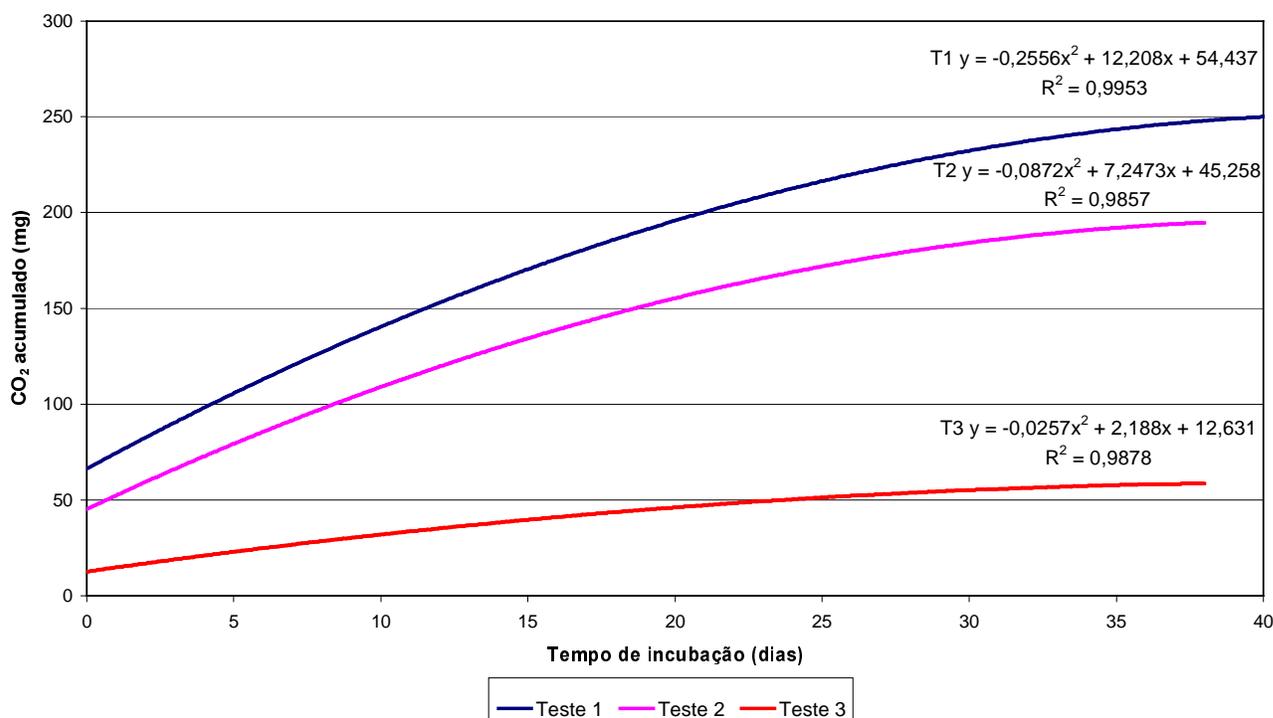


Figura 29: Geração de gás carbônico nos respirômetros em branco nos testes 1, 2 e 3.

Considerando que no Teste 1, o carbonato de cálcio foi adicionado no momento da montagem dos respirômetros e no Teste 2, uma semana antes, a diferença entre as duas curvas indica a quantidade de gás carbônico liberada nos sete dias, período no qual ocorrem as reações de equilíbrio de carbonatos segundo a NBR 14283 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1999). No Teste 3, o carbonato de cálcio não foi adicionado, mas ainda foi verificada a geração de gás carbônico (proveniente da hidrólise do carbonato existente no solo), porém em quantidades muito menores. A diferença entre as curvas dos testes 2 e 3 indica que o equilíbrio dos carbonatos no solo continua ocorrendo após os sete dias.

A partir dos resultados apresentados, pode-se observar que parte do gás carbônico gerado nos ensaios de biodegradação deve-se às reações de equilíbrio do carbonato de cálcio, adicionado à amostra de solo para acertar o pH.

5.3.3 Influência do solvente na biodegradação

A acetona foi o solvente escolhido para a contaminação do solo com fenantreno, já que o mesmo é pouco solúvel em água (PEREIRA NETTO, 2000; COSTA, 2001 e LUNDSTEDT, 2003). Nos testes 1, 2 e 3, além dos respirômetros contendo cinco diferentes teores de fenantreno e do teste em branco, que não continha o contaminante, somente os nutrientes, água e carbonato de cálcio, foi montado o respirômetro controle para verificar a influência do solvente na biodegradação. Ao solo contido no respirômetro controle, foram adicionados os nutrientes, água, carbonato de cálcio e acetona.

Para a verificação da quantidade de gás carbônico gerada devido à biodegradação do fenantreno, a gerada no controle deveria ser subtraída.

Apesar da acetona ser volátil, ela poderia influenciar a atividade microbiana no solo pela sua toxicidade, pela sua biodegradação e pelo co-metabolismo (HWANG e CUTRIGHT, 2003), antes da completa volatilização ou de seus resíduos. Essa interferência é mostrada nos gráficos das figuras 30, 31 e 32, que comparam as quantidades de gás carbônico geradas nos testes em branco e nos controles dos testes 1, 2 e 3.

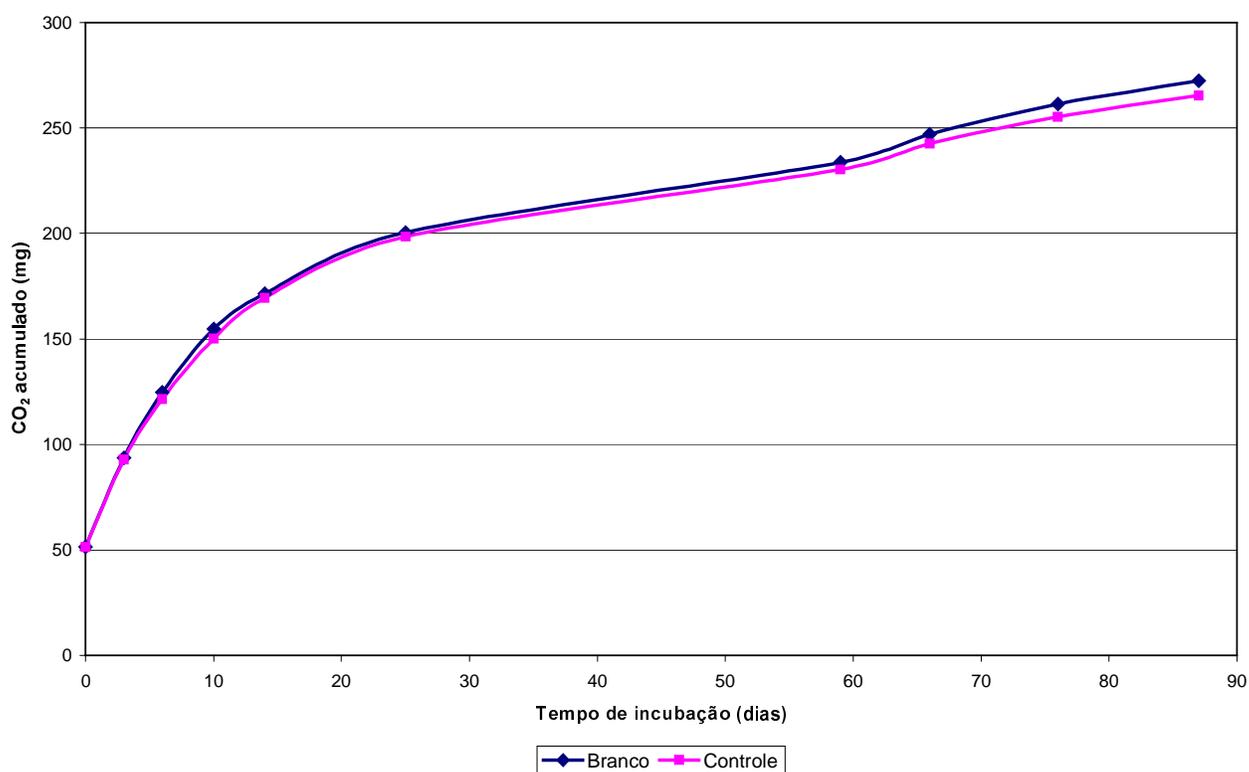


Figura 30: Influência da acetona na atividade microbiana do Teste 1.

O gráfico da Figura 30 mostra que não ocorreu interferência da acetona na biodegradação, pois, praticamente, não houve diferença entre as quantidades de gás carbônico geradas no respirômetro do teste em branco e no controle.

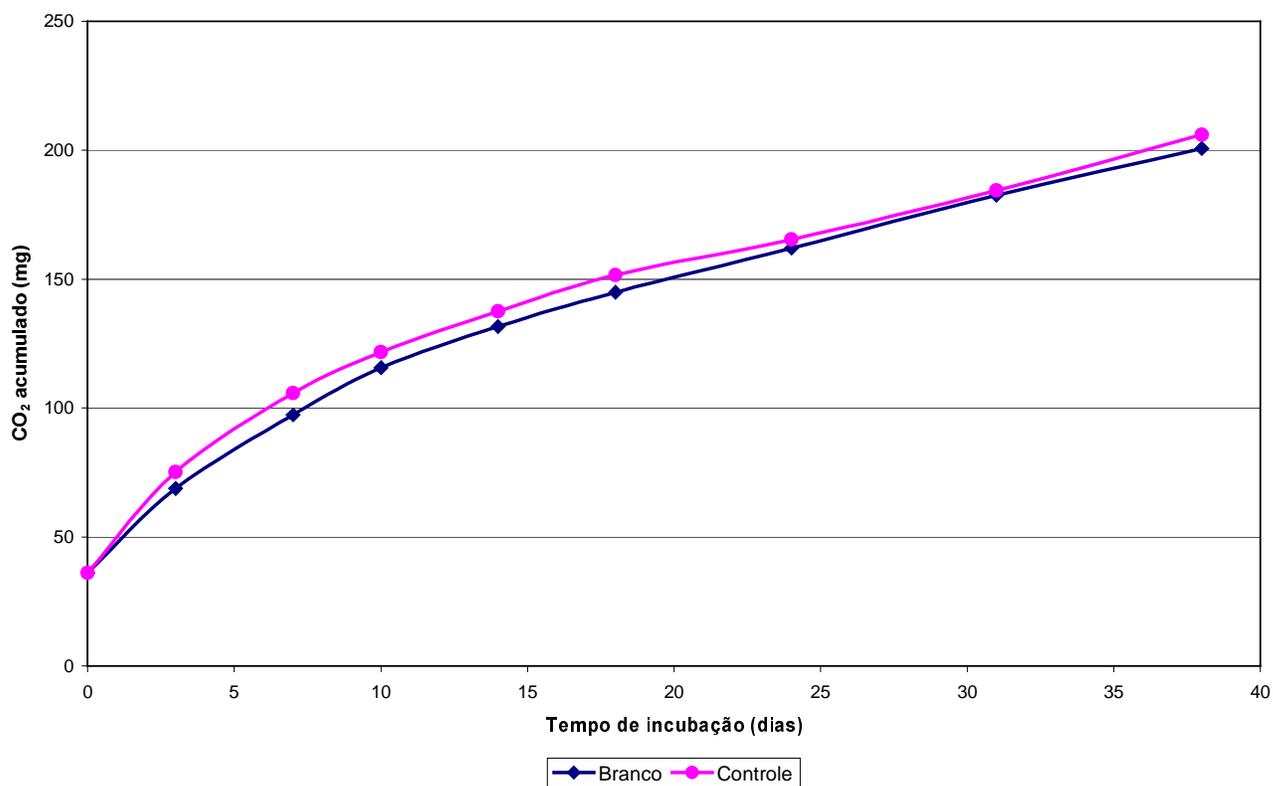


Figura 31: Influência da acetona na atividade microbológica do Teste 2.

Assim como no gráfico da Figura 30, há pouca diferença entre as quantidades de gás carbônico geradas no respirômetro do teste em branco e no respirômetro controle do Teste 2. Porém, apesar da pouca diferença, pode-se verificar maior geração de gás carbônico no respirômetro controle em relação ao branco, indicando possível biodegradação do solvente. Este fato é confirmado no gráfico da Figura 32, que mostra a influência do solvente no Teste 3.

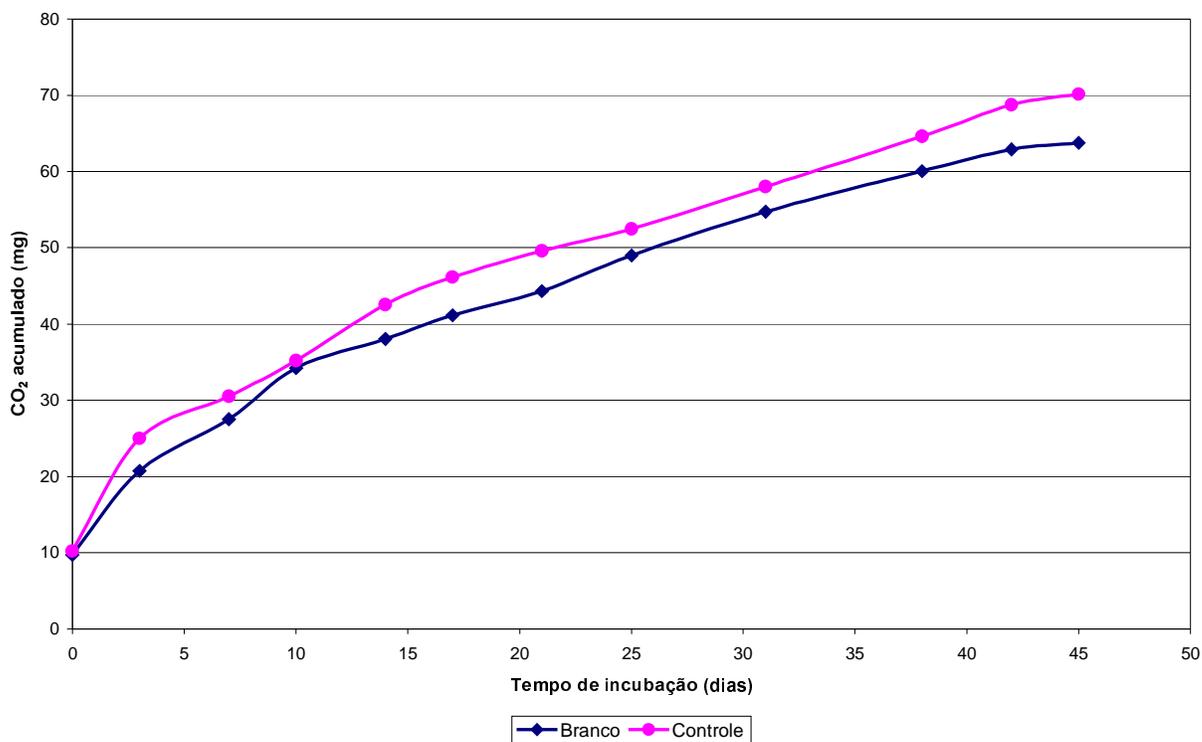


Figura 32: Influência da acetona na biodegradação do Teste 3.

A partir dos resultados obtidos nos testes 2 e 3, quanto a influência da acetona na biodegradação, confirma-se a importância do respirômetro controle, além do teste em branco, nos testes respirométricos de Bartha.