Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Dissertação de Mestrado

Avaliação Comparativa, via Calorimetria, da Atividade Microbiana de um Latossolo Vermelho, Cultivado por Cana-de-açúcar, Citros e de Mata Natural.

Aluna: Amanda Carolina Covizzi Bertelli

Orientador: Profº. Dr. José de Alencar Simoni

Fevereiro/2011.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

B461e	Bertelli, Amanda Carolina Covizzi. Avaliação comparativa, via calorimetria, da atividade microbiana de um latossolo vermelho, cultivado por cana-de-açúcar, citros e de mata natural / Amanda Carolina Covizzi Bertelli. -- Campinas, SP: [s.n], 2011. Orientador: Prof. Dr. José de Alencar Simoni. Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Atividade microbiana. 2. Microcalorimetria. 3. Solos. 4. Derivados fenólicos. I. Simoni, José de Alencar. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Comparative Evaluation of Microbial Activity of Red latosol cultivated with Sugarcane, Citrus and Natural Forest using Calorimetry

Palavras-chaves em inglês: Microbial activity, Microcalorimetry, Soils, Phenolic derivatives

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora: Prof. Dr. José de Alencar Simoni (orientador), Prof. Dr. Renato Atilio Jorge (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Carlos Clemente Cerri (CENA-USP)

Data de defesa: 16/02/2011

Dedicatória.

Dedico esse trabalho á minha família pela dedicação, carinho e amor incondicional. .

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer ao Criador por todas as bênçãos existentes em minha vida.

Quero agradecer também a minha família que sempre esteve do meu lado me incentivando. À minha mãe Pompea Covizzi por tudo que ela sempre fez por mim. Ao meu pai Milton Roberto Medeiros Bertelli que apesar dos desajustes dessa vida sempre esteve do meu lado de alguma forma. Ao meu irmão André Covizzi Bertelli que sempre demonstrou entusiasmo com os meus estudos e meu trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José de Alencar Simoni, gostaria de agradecer pela paciência e confiança que dedicou aos nossos trabalhos em todos esses anos juntos. Aprendi muito e sei que tenho muito ainda a aprender.

Ao Prof. Dr. Zigomar Menezes de Souza da Faculdade de Engenharia Agrícola da Unicamp, por sua compreensão e disposição em me ensinar conceitos relacionados ao estudo dos solos com os quais eu não estava bem familiarizada. Seu apoio foi muito importante para este trabalho.

À Profa. Dra. Sueli Freitas do Instituto Agronômico de Campinas – IAC, e à microbiologista Júlia Talazzo do IAC, que possibilitaram meu acesso aos laboratórios do Instituto Agronômico, onde pude aprender muito.

Ao Prof. Dr. Pedro Luis Onofre Volpe pelos conselhos e por seu apoio que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos ao Gabriel Curti que foi, e é, um amigo valioso e companheiro de trabalho sempre disposto a ajudar. Aprendemos muito juntos.

Às técnicas Neusa e Egle e à auxiliar de laboratório Dona Alice que facilitaram muito meu trabalho. Seus conhecimentos e ajuda foram fundamentais para esse projeto.

À Capes pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa.

Gostaria por fim de agradecer a todos os colegas do laboratório que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial ao meu

namorado Luelc que entrou na minha vida já na fase final deste trabalho e com atenção e carinho me deu um apoio extremamente valioso .

A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras. (Albert Einstein).

A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.
(Platão).

Currículo

Dados pessoais

Nome: Amanda Carolina Covizzi Bertelli

Endereço: Av. Dr. Luiz de Tella, 1020 – CEP:13083 – 000 – Cidade Universitária parte II – SP

Solteira – 28 anos – Data nasc.: 08/01/1983 - Naturalidade: Campinas

RG: 33.747.706-1 CPF: 215.257.318-82

Fone: 19 – 3287- 5196/ Cel: 19-91962270 e-mail: abertelli@iqm.unicamp.br

Formação Acadêmica (Graduação e Pós-Graduação)

Graduação

Licenciatura e Bacharelado em Química.

Período: início em 2002 e conclusão em 2007

Universidade Estadual de Campinas.

Pós-Graduação

Mestrado em Química na Área de Físico-Química.

Período: início: agosto de 2008; conclusão: fevereiro de 2011.

Orientador: José de Alencar Simoni- Instituto de Química- Depto. de Físico-química.

Universidade Estadual de Campinas.

Produção científica

Iniciação científica

- Desenvolvimento de experimentos quantitativos para ensino de química no nível médio, utilizando instrumentação simples, barata e facilmente encontrada no comércio comum a baixo preço**.**
Inicio: Agosto/2004 Finalização: julho/2005.
-Novas diretrizes no gerenciamento de experimentos de química geral em disciplinas introdutórias nos diversos cursos da Unicamp sob perspectiva da diminuição de insalubridade e dos resíduos gerados e da diminuição de custos.
Início: agosto/2005. Final: julho/ 2006. Número do processo: 09170/2005-9.
-Estudo comparativo da atividade microbiana de um solo *Eutrudox Rhodic* utilizado sob três diferentes condições, utilizando-se a calorimetria. Número do processo: 09170/2005-9.
Inicio: agosto/2006 Finalização: julho/2007.

Instituição Financiadora: PIBIC/SAE/CNPq.

Orientador: José de Alencar Simoni - Instituto de Química - Depto. De Físico-química – Unicamp.

Trabalhos apresentados.

DESENVOLVIMENTO DE EXPERIMENTOS QUANTITATIVOS PARA O ENSINO DE QUÍMICA NO NÍVEL MÉDIO, UTILIZANDO INSTRUMENTAÇÃO SIMPLES, BARATA E FACILMENTE ENCONTRADA NO COMÉRCIO COMUM A BAIXO PREÇO.
Amanda Carolina Covizzi Bertelli (Bolsista SAE/UNICAMP) e Prof. Dr. José de Alencar Simoni (Orientador), Instituto de Química - IQ, UNICAMP.
XIV Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp. 28 e 29 de Setembro de 2005.

NOVAS DIRETRIZES NO GERENCIAMENTO DE EXPERIMENTOS DE QUÍMICA GERAL EM DISCIPLINAS INTRODUTÓRIAS NOS DIVERSOS CURSOS DA UNICAMP SOB A PERSPECTIVA DA DIMINUIÇÃO DA INSALUBRIDADE E DOS RESÍDUOS GERADOS E DE DIMINUIÇÃO DE CUSTOS.

Amanda Carolina Covizzi Bertelli (Bolsista PIBIC/CNPq), Aline Eiras Duarte (Aluna de Mestrado), Prof. Dr. Matthieu Tubino (Colaborador) e Prof. Dr. José de Alencar Simoni (Orientador), Instituto de Química -IQ, UNICAMP. XIV Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp. 27 e 28 de Setembro de 2006.

ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE MICROBIANA DE UM SOLO *EUTRUDOX RHODIC* UTILIZADO SOB TRÊS DIFERENTES CONDIÇÕES, UTILIZANDO-SE A CALORIMETRIA.

Amanda Carolina Covizzi Bertelli (Bolsista PIBIC/CNPq), Cláudio Airoldi (Colaborador) e José de Alencar Simoni (Orientador), Instituto de Química -IQ, UNICAMP. XV Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp. 26 e 27 de Setembro de 2007.

ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE MICROBIANA DE UM SOLO *EUTRUDOX RHODIC* UTILIZADO SOB TRÊS DIFERENTES CONDIÇÕES, UTILIZANDO-SE A CALORIMETRIA.

Amanda Carolina Covizzi Bertelli (Bolsista PIBIC/CNPq), Cláudio Airoldi (Colaborador) e José de Alencar Simoni (Orientador), Instituto de Química -IQ, UNICAMP. V Workshop Internacional Brasil-Japão. 29 de Outubro a 1 de Novembro de 2007.

ESTUDO CALORIMÉTRICO DO METABOLISMO DE UM SOLO *EUTRODOX RHODIC* MANEJADO SOB TRÊS DIFERENTES CONDIÇÕES.

Amanda Carolina Covizzi Bertelli (aluna de mestrado), Cláudio Airoldi (Colaborador) e José de Alencar Simoni (Orientador), Instituto de Química -IQ,

UNICAMP. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 28 a 31 de Maio de 2010.

COMPARATIVE STUDY OF THE MICROBIAL ACTIVITY IN A SOIL *EUTRUDOX RHODIC* CULTIVATED BY THREE DIFFERENT CONDITIONS BY USING CALORIMETRY. Amanda C. C. Bertelli (aluna de mestrado), José de A. Simoni (orientador), Claudio Airoldi (colaborador), Gabriel J. Curti (aluno de doutorado), Instituto de Química -IQ, UNICAMP, Sueli Freitas (colaboradora), Instituto Agronômico de Campinas-IAC. XVI ISBC: Calorimetry, living systems, biomacromolecules and the holy year. 31 de Maio a 3 de Junho de 2010.

Participações em congressos.

XIII ENEQ - Educação em Química no Brasil - 25 anos de ENEQ. 24 a 27 de Julho de 2006.

IV Fórum de Pós Graduação em Química – A Química nas Mudanças do Mundo: Pesquisa, Trabalho e Ética. 21 a 22 de Outubro de 2010.

Estágios

Laboratório de Microbiologia do Solo, Instituto Agronômico de Campinas, IAC, Fevereiro – Abril -2009

Resumo

Este estudo investiga a influência de práticas agrícolas na atividade microbiana de solos, utilizando-se a calorimetria. Foram estudados solos sobre três diferentes condições de manejo. Os solos foram retirados da região de Pirassununga, Estado de São Paulo e são de condições: solo de mata natural, cultivado com citros e cultivado com cana-de-açúcar. As coordenadas: mata natural (21°56'33,54"S; 47°19'51,85"O), citros ((21°56'25,14"S; 47°19'53,31"O) e cana-de-açúcar (21°56'35,25"S; 47°19'54,64"O). O estudo calorimétrico corresponde ao registro da energia dissipada em função do tempo, utilizando-se glicose como substrato. As amostras de foram também caracterizadas por diversas análises químicas (teor de carbono, pH e acidez total), e biológica (contagem de microorganismos), além das técnicas térmicas como TGA e DSC. Os resultados de calorimetria evidenciam diferenças entre os diferentes manejos em relação a parâmetros como: eficiência de assimilação da matéria orgânica (η_H), constante de crescimento microbiano (k), e a quantidade biomassa viva formada ($\Delta \boldsymbol{X}$). O valor de "peak time" obedeceu a ordem citros<cana-de-açúcar<mata natural, tanto aos 3, 8 meses ou 1 ano de coleta. Após a adição de fenol esses valores se tornaram mais próximos um dos outros e após a adição do 4-clorofenol esses valores se tornaram bem mais elevados, mas a ordem permaneceu inalterada. Os três tipos de solo apresentaram microorganismos capazes de metabolizar o fenol. Após a adição de fenol, houve um aumento da quantidade de energia desprendida para os três solos, quando se comparam os metabolismos de glicose. Consequentemente, houve uma diminuição da biomassa acumulada, ηH %, e um aumento da emissão de CO_2. Após a adição de 4-clorofenol foi observado efeito térmico com a adição da glicose apenas para o solo de citros e mata natural e também foi observado um aumento da energia liberada em comparação à situação sem adição prévia de 4-clorofenol.

Abstract

This study investigates the influence of agricultural practices on soil microbial activity, using calorimetry. Soils were studied under three different management conditions. The soils were obtained from the region of Pirassununga, State of São Paulo and the conditions are: soil of natural forests, cultivated with citrus and cultivated with sugarcane. The coordinates were: natural forest (21 ° 56'33, 54 "S, 47 ° 19'51, 85" O), citrus ((21 ° 56'25, 14 "S, 47 ° 19'53, 31" O) and sugarcane (21 ° 56'35, 25 "S, 47 ° 19'54, 64" O). The calorimetric study corresponds to the record of the dissipated energy versus time, using glucose as substrate. The samples were also characterized by various chemical analyses (carbon content, pH and total acidity) and biological (microbial count), and thermal techniques such as TGA and DSC. The calorimetric results revealed differences between the different management systems in relation to parameters such as efficiency of assimilation of organic matter (ηH), microbial growth constant (k), living biomass formed and the amount (ΔX). The value of peak time obeyed the order citrus <sugarcane< natural forest, both at 3, 8 months and 1 year of collection. After the addition of phenol these values become closer to each other and after the addition of 4-chlorophenol these values became much higher, but the order remained unchanged. The three types of soil microorganisms were able to metabolize phenol. After the addition of phenol, there was an increased amount of energy given off by the three soils, when comparing the metabolism of glucose. Consequently, there was a decrease of the biomass, ηH% and an increase in CO_2 emissions. After addition of 4-chlorophenol a thermal effect was observed with the addition of glucose only for the citrus and forest soils together an increasing of the energy given off when compared to the situation where the 4-chlorophenol was not previously added.

Sumário

Lista de figuras

Figura	Título	Pág.
1	Representação gráfica das quatro fases de crescimento microbiano	4
2	Curva calorimétrica típica de crescimento microbiano	5
3	Local de coleta das amostras de solo (Google Earth acessado em 06/12/2010). As coordenadas: mata natural (21°56'33,54"S; 47°19'51,85"O), citros (21°56'25,14"S; 47°19'53,31"O) e cana-de-açúcar (21°56'35,25"S; 47°19'54,64"O)	9
4	Representação simplificada da célula calorimétrica..	15
5	Curvas de TGA, das amostras de solo de mata natural, sob cultivo de cana-de-açúcar e sob cultivo de citros, de um latossolo vermelho da região de Pirassununga-SP .	28
6	(a) Curvas de DSC, das amostras de solo de mata natural, sob cultivo de cana-de-açúcar e sob cultivo de citros, de um latossolo vermelho da região de Pirassununga-SP.	29
7	Registro calorimétrico típico da atividade microbiana do solo .	30
8	Curvas Calorimétricas para a adição de 1 mg de glicose para os três tipos de solo, após 3 meses de coleta.	32
9	Curvas Calorimétricas após adição de 1 mg de glicose nas três amostras de solo após 8 meses de coleta.	34
10	Curvas Calorimétricas para a adição de 3 µmol de fenol: cana-de-açúcar (a); citros (b); mata natural (c).	36
11	Curvas Calorimétricas para a adição de 1mg de glicose após adição de 3 µmol de fenol para os solos de cana-de-açúcar, citros e mata natural.	37
12	Curvas calorimétricas após adição de 1mg de glicose nos três tipos de solos após 1 ano de coleta.	39
13	Curvas calorimétricas com a adição de 1mg de glicose após adição inicial de 3 µmol de 4-clorofenol nos solos coletados há 1 ano.	40
14	Curvas calorimétricas ilustrativas da degradação microbiana de 1mg de glicose antes e após adição inicial de 3 µmol de 4-clorofenol nos solos coletados há 1 ano.	49

Lista de tabelas

Tabela	Descrição	Pág.
1	Reagentes utilizados na preparação do meio para a contagem de bactérias e actinomicetos	12
2	Reagentes utilizados na preparação do meio de Martin para fungos.	12
3	Valores de pH dos vários solos cultivados por diferentes culturas, da região de Pirassununga(SP).	19
4	**Tabela 4.** Determinação da acidez total dos solos, **em mmol por 100 gramas de solo.**	21
5	Resultados da quantidade matéria orgânica, em **miligrama por grama de solo**, para os diversos solos da região de Pirassununga (SP).	22
6	Resultados da determinação da quantidade de bactérias e actinomicetos dos vários solos cultivados por diferentes culturas, **em ufc / 10^4 g^{-1} de solo seco (n^o. células / mL),** da região de Pirassununga (SP).	22
7	**Tabela 7.** Resultados da determinação da quantidade fungos dos vários solos cultivados por diferentes culturas, **em ufc /10^3 g^{-1} de solo seco (n^o. células / mL),** da região de Pirassununga (SP).	23
8	Dados da análise elementar, **em porcentagem em massa**, dos vários solos cultivados por diferentes culturas, da região de Pirassununga (SP).	24
9	Dados de **perda de massa em %**, em função da temperatura, para os solos cultivados por diferentes culturas, da região de Pirassununga, Estado de São Paulo.	27
10	Resultados da calorimetria para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos, após 3 meses de coleta.	31
11	Resultados do balanço de massa das equações macroquímicas, para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos, após 3 meses de coleta.	31
12	Resultados da calorimetria para a adição de 1 miligrama de glicose,	33

aplicada aos três tipos de solos, após 8 meses de coleta.

13 Resultados do balanço de massa das equações macroquímicas, para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos, após 8 meses de coleta. 33

14 Resultados da calorimetria para a adição de 3 umol de fenol, aplicado aos três tipos de solos, após 8 meses de coleta. 35

15 Resultados do balanço de massa das equações macroquímicas, para a adição 3 umol de fenol aplicado aos três tipos de solos, após 8 meses de coleta. 35

16 Resultados da calorimetria aplicada para a adição de 1 mg de glicose após a adição de fenol aos três tipos de solos coletados há 8 meses. 36

17 Resultados do balanço de massa das equações macroquímicas, para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos, após 8 meses de coleta e após aplicação de 3 µmol de fenol. 37

18 Resultados da calorimetria para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos, após 1 ano de coleta. 38

19 Resultados do balanço de massa das equações macroquímicas, para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos, após 1 ano de coleta. 38

20 Resultados da calorimetria para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos após adição de 3 µmol de 4-clorofenol, para os solos coletados há 1 ano. 39

21 Resultados do balanço de massa das equações macroquímicas, para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos, após 1 ano de coleta e adição de 3 µmol de 4-clorofenol. 40

22 Resultados de eficiência do balanço de massa (η_H) e do crescimento de biomassa viva ΔX, ambos em porcentagem**,** em porcentagem para as diversas condições experimentais 41

23 Resultados de peak time P_T em horas, para os vários sistemas 44

estudados.
24 Resultados de rendimento térmico, $Y_{Q/X}$, em kJ mol^{-1} de X, para os vários sistemas estudados. 45
25 Resultados de $-\Delta_R Hs$ em kJ mol^{-1}, para os vários sistemas estudados. 46
26 Resultados de **k / 10^{-3} min^{-1}**, para os vários sistemas estudados. 47

Índice geral

Item	Descrição	Pág.
1	**Introdução**.....	1
2	**Objetivo.**.....	8
2.1	**Objetivos Gerais**.....	8
2.2	**Objetivos Específicos**.....	8
3	**Materiais e Métodos**.....	9
3.1	**Amostragem do solo**.....	9
3.2	**Determinação do pH dos solos**	9
3.3	**Determinação da acidez total**.....	10
3.4	**Determinação do carbono orgânico total (COT)**.....	10
3.5	**Análise microbiológica**.....	11
3.6	**Análise Elementar**.....	13
3.7	**Análises Térmicas**.....	13
3.8	**Microcalorimetria**.....	14
3.8.1	**Procedimento experimental e metodologia de cálculo**.....	14
4	**Resultados e discussão**.....	19
4.1	**Determinação do pH dos solos**.....	19
4.2	**Determinação da acidez total**.....	20
4.3	**Determinação carbono orgânico total (COT)**.....	21
4.4	**Análise microbiológica dos solos**.....	22
4.5	**Análise Elementar**.....	24
4.6	**Análises térmicas: DSC e TGA**.....	25

4.7 **Microcalorimetria**..... 29
4.7.1 **Eficiência, η_H e rendimento de biomassa viva**..... 41
4.7.2 **Peak time, P_T**..... 43
4.7.3 **Rendimento térmico, $Y_{Q/X}$**..... 45
4.7.4 **Valores de $\Delta_R H_S$ - energia dissipada por mol de glicose**..... 46
4.7.5 **Constante de velocidade de crescimento, k**..... 47
5 **Conclusões**..... 50
6 **Referências**..... 52

1. Introdução.

Os impactos ambientais, em especial aqueles relacionados ao aquecimento global, oriundos das atividades humanas estão sendo discutidos desde a ECO-92 e já provocaram reuniões de diversas autoridades mundiais que geraram estudos como o do IPCC e acordos como o protocolo de Kyoto.

O crescente aumento da população mundial e da demanda de energia e o conseqüente aumento da concentração dos gases poluentes na atmosfera, que contribuem para o efeito estufa, o impacto da atividade humana e a sustentabilidade do ecossistema têm sido temas constantemente discutidos na literatura[1, 2].

A mobilidade inevitável do homem no ecossistema afeta de maneira drástica o meio ambiente. Dentro deste contexto torna-se muito importante avaliar as conseqüências ambientais do cultivo do solo visto que esta é uma importante atividade humana e contribui em cerca de 20 % para a concentração do CO_2 atmosférico[3].

Mesmo não entrando no mérito da polêmica discussão do efeito estufa, no qual a molécula de dióxido de carbono é tida como uma das substâncias com ativa participação, sabe-se que esse efeito está relacionado ao recebimento da radiação solar pelo ecossistema, cuja radiação é composta predominantemente de pequenos comprimentos de onda, nas regiões do visível e ultravioleta com 98 e 2 %, respectivamente. Parte dessa radiação ao atingir a superfície da Terra é irradiada para o espaço em comprimentos de onda maiores, na região do infravermelho, e passa a ser absorvida por moléculas, que irradiam em todas as direções. Nesse processo a superfície do ecossistema perde menos energia para o espaço e tende a permanecer mais quente, o que implica em readaptação de todos os seres frente à nova situação[4].

Dentro deste contexto se justifica a preocupação sobre a produtividade do solo e seu impacto para o meio ambiente. Está sendo observada em grande parte do mundo uma diminuição da qualidade dos solos caracterizada por mudanças em suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Outra preocupação seria aquela relacionada à contaminação por compostos orgânicos e inorgânicos[5].

A utilização de fertilizantes e defensivos agrícolas se faz necessário numa sociedade que está crescendo muito e demandando, portanto, um aumento na produção de alimentos. Dessa forma, o aumento da utilização desses produtos químicos pode levar ao seu acúmulo nos solos, afetando o meio ambiente[6]. Esses produtos químicos afetam o desenvolvimento dos microorganismos, já que esses são na realidade os agentes responsáveis pela degradação de vários substratos, cujo estágio final pode produzir nutrientes altamente enriquecedores da fertilidade do solo[7].

Dentre as diversas técnicas que podem ser utilizadas para o monitoramento da atividade microbiana de solos e o estudo do crescimento de microorganismos, a calorimetria se mostra uma técnica analítica útil, pois possibilita estudos *in situ* por um longo período sem que haja qualquer distúrbio do sistema[8,9]. Além disso, a calorimetria apresenta grande potencial para o entendimento do comportamento da biomassa, pois é uma técnica não destrutiva e propicia uma informação mais quantitativa em comparação com outras técnicas conhecidas que podem ser ainda demoradas, trabalhosas e não permitem que amostra seja posteriormente utilizada para outras análises[10,11].

A calorimetria embora seja um método não específico e que detecta qualquer efeito térmico envolvido, é maneira peculiar, quase única, de se quantificar o metabolismo aeróbio e não aeróbio em um sistema[12-17]. Ela permite o conhecimento do sistema e tem características vantajosas, como a independência das condições de opacidade do meio, o que difere da maioria das técnicas espectrofotométricas. O metabolismo no solo pode ser estudado monitorando-se o consumo de oxigênio, ou produção de dióxido de carbono, ou acompanhando algum substrato, contendo elementos químicos nuclearmente marcados. Uma técnica desse tipo, além de bastante dispendiosa, exige condições experimentais adequadas[12-17]. Um dado importante, que vem reforçar as vantagens das técnicas calorimétricas para a obtenção de dados energéticos, está relacionado às falhas detectadas por processos puramente bioquímicos, provenientes de fluxos de energia em um ecossistema. Estes dados indicam que apenas 60 % do total energético são perfeitamente explicados através de caminhos bioquímicos. A

calorimetria permite a obtenção do efeito global, além de abranger todas as questões da área ecológica, fisiológica e toxicológica.[13, 17]

A calorimetria isotérmica por sua simplicidade, exatidão, sensibilidade está sendo muito utilizada para monitorar as atividades de microorganismos[18-27] e foi a técnica mais utilizada neste trabalho para investigar a atividade microbiana em solos.

O início da utilização da calorimetria para estudos da atividade microbiana em solos deu-se em 1973 e o princípio básico desenvolvido desde então é que a adição de um nutriente ao solo resulta num imediato aumento na produção de calor que pode estar relacionado a um aumento na produção da microflora. Para esses estudos foram adaptados e empregados principalmente calorímetros de condução térmica[22].

O desenvolvimento da calorimetria aplicada aos estudos em solos durante os anos 80 foi fortemente influenciado pelo desenvolvimento da microbiologia e baseou-se principalmente na degradação da glicose no solo e as alterações relacionadas a atividade microbiana e biomassa[20,23-25]. Ao longo do tempo o uso da glicose tornou-se nesse tipo de estudo tornou-se o procedimento “ouro”. Grupos de pesquisa determinaram através da calorimetria alguns parâmetros termodinâmicos da reação de degradação da glicose como, por exemplo, a Energia livre de Gibbs e conseguiram relacionar o consumo da glicose com o aumento de biomassa e crescimento microbiano[26,27]. Essas informações a respeito do metabolismo podem ser utilizadas para se inferir sobre as condições do solo e, portanto, alertar sobre sua deterioração decorrente ou não de práticas agrícolas.

Estudando a atividade microbiana observa-se que o crescimento celular microbiano apresenta basicamente 4 fases (Figura 1), cujos designações em língua inglesa são: lag phase, exponential phase, stationary phase, e death phase[28], que poderiam ser traduzidas como: fase de latência, fase de crescimento exponencial, fase estacionária e fase de morte celular, respectivamente.

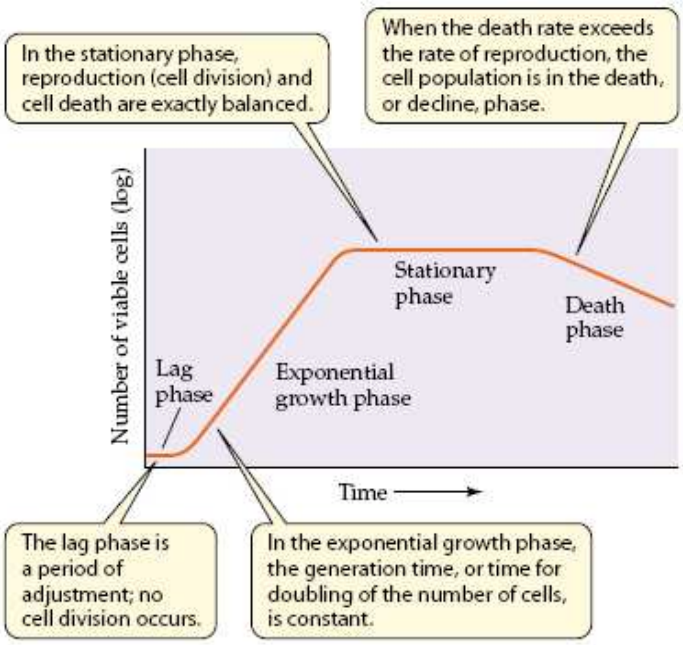

Figura 1. Representação gráfica das quatro fases de crescimento microbiano.

Na fase de latência as células estão inseridas em um novo ambiente. Essa é uma fase de adaptação, uma vez que novas enzimas, coenzimas, e outros compostos têm que ser sintetizados para que os novos substratos presentes no meio possam ser metabolizados, sendo que nessa fase há uma intensa atividade metabólica[29].

Quando começa a fase exponencial, o crescimento celular é substancialmente favorecido, uma vez que as células se mostram adaptadas ao novo nicho ao qual estão inseridas; o crescimento ocorre de uma forma logarítmica[29].

A etapa seguinte corresponde à fase estacionária, quando as diferentes populações microbianas se equilibram devido ao aumento da competitividade entre os diferentes microorganismos, ou devido ao acúmulo de metabólitos em níveis de toxicidade celular. Nessa etapa o número de organismos que nascem é igual ao dos que morrem[29].

A última etapa corresponde à fase de morte, em que se observa redução da atividade microbiana ou a morte de alguns microorganismos graças a uma maior competitividade entre as diferentes espécies ou devido à escassez de nutrientes.

Nessa fase, a taxa de morte de microorganismos excede à de geração de novas células[29].

Quando esse metabolismo é acompanhado pela calorimetria isotérmica a curva típica obtida é semelhante à apresentada abaixo na figura 2.

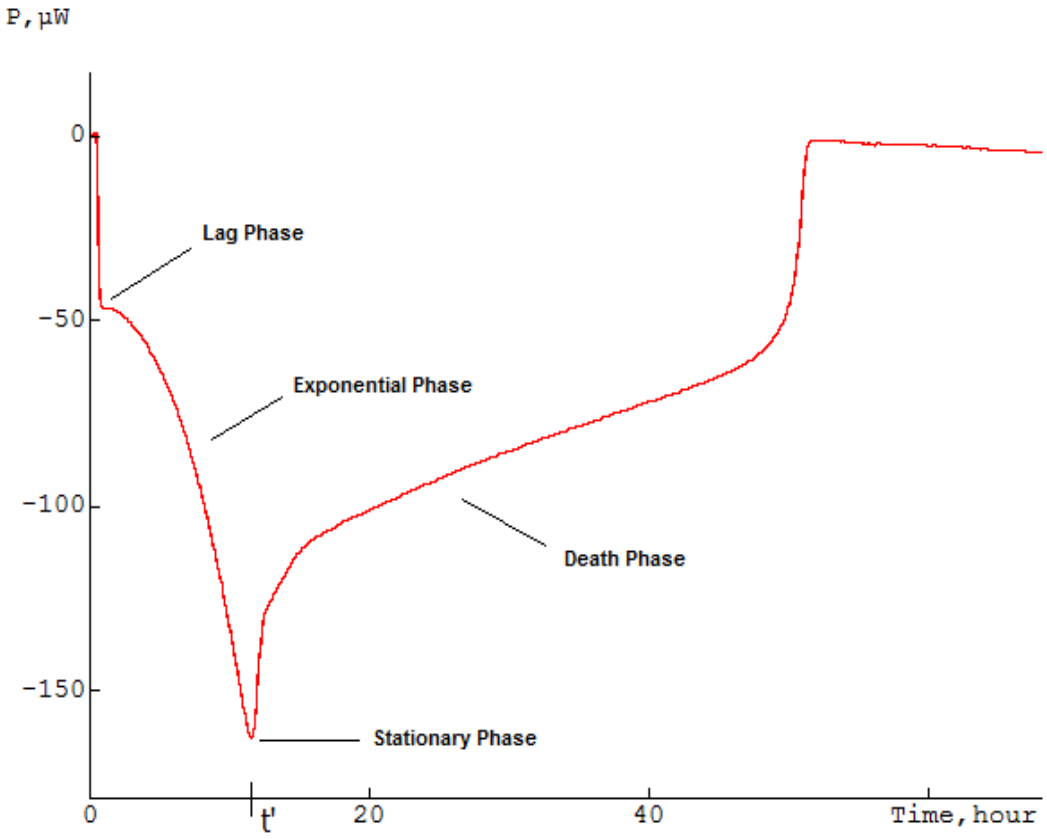

Figura 2. Curva calorimétrica típica de crescimento microbiano.

É interessante observar o aspecto da curva na Figura 2, que se assemelha, de certa forma, ao formato da Figura 1, sendo que a variável independente nesse caso é um fluxo de energia, ao invés da quantidade de células vivas da Figura 1. Essa semelhança reforça a idéia que as curvas calorimétricas podem dar informações importantes do crescimento microbiano, como mostra a literatura[30].

A atividade microbiana normalmente é estudada utilizando-se um substrato como a glicose que, como explicitado anteriormente, é de fácil metabolização pela maioria dos microorganismos. Entretanto a literatura[19,20,31-33] mostra que é possível

estudar também o metabolismo de outros substratos e também os efeitos e a decomposição de contaminantes orgânicos e inorgânicos nos solos.

Diversas substâncias químicas que compõem os produtos manufaturados, e estão presentes nos efluentes de origem industrial, são corriqueiramente dispostas no meio ambiente através do carreamento para corpos d'água naturais e dessa forma poluem as águas e também os solos. Duas dessas substâncias, que fazem parte de duas famílias comuns de poluentes, os fenóis e clorofenóis, além da glicose, foram escolhidas para o presente estudo.

Na literatura[34] verifica-se que uma dosagem de 3 µmol fenol/g de solo úmido, inibe em 50 % o crescimento bacteriano. Na indústria química, o fenol serve de matéria prima para uma grande variedade de produtos comerciais que vão desde a aspirina ate vários tipos de polímeros. A produção mundial de fenol é maior que três milhões de toneladas por ano. O fenol é efetivo contra o crescimento de microorganismos e possui algumas aplicações médicas e farmacêuticas como anestésico[35]. Outra importante aplicação do fenol é como intermediário na produção de resinas, sendo também muito utilizado como desinfetante em procedimentos hospitalares, aplicações na pele para a remoção de verrugas e como cosmético na descamação no rosto. O fenol pode ser um ingrediente de enxaguantes bucais, pastilhas e sprays para infecções de garganta[36].

O 4-clorofenol (4-CF) faz parte da família dos clorofenóis e, devido a algumas de suas propriedades, apresenta vários riscos para o meio ambiente tanto para sistemas aquáticos como terrestres[37]. O 4-CF é um precursor de biocida e pesticida, e também é utilizado nas mais diversas atividades industriais incluindo: branqueamento da polpa da celulose na indústria de papel, formulação de drogas e está presente em resíduos de gás e óleos industriais[38,39 e 40]. O limite permitido em águas naturais é de 100 µg L^{-1}, de acordo com "US Environmental Protection Agency"[41] (EPA). Outro fator que também despertou interesse para o estudo do 4-CF é por ele ser um típico clorofenol e ter uma estrutura semelhante à de diversos outros pesticidas.

A literatura[42] mostra, também, que durante o processo convencional de branqueamento do papel utiliza-se cloro elementar (numa proporção de 45 kg de cloro por t de polpa) para a remoção da lignina residual presente nas fibras celulósicas, sendo gerada uma enorme variedade e quantidade de substâncias organocloradas (2 a 1,5 kg por tonelada de polpa) recalcitrantes e altamente tóxicas. Alguns compostos tipicamente encontrados no efluente papeleiro são clorofenóis, o que também reforçou a escolha do 4-clorofenol para os estudos realizados neste trabalho.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho visa à investigação de possíveis correlações da atividade microbiana de um latossolo vermelho, mantido sob três diferentes condições de manejo; cultivo de cana-de-açúcar, cultivo de citros e um de mata natural. A atividade microbiana é avaliada via calorimetria, sendo relativa ao metabolismo de glicose. A influência da adição prévia de xenobióticos como fenol e 4-clorofenol, também é investigada para as três diferentes amostras de solo.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Tentar estabelecer correlações entre a matéria orgânica pré-existente no solo e a sua atividade microbiana.
- ✓ Estabelecer correlações entre a quantidade e variedade de microrganismos presentes no solo e possíveis influências da adição de fenol e 4- clorofenol na atividade microbiana.
- ✓ Verificar modificações da atividade microbiana em função do tempo de armazenagem e do tipo de manuseio dos solos.
- ✓ Verificar possível contribuição da prática agrícola (cultivo de cana-de-açúcar e citros) para o efeito estufa, usando a calorimetria.

3. Materiais e Métodos

Serão apresentados aqui, os materiais e a metodologia utilizados nesse trabalho.

3. 1. Amostragem do solo.

As amostras de Latossolo Vermelho foram coletadas em março de 2009, a uma profundidade entre 5 e 10 cm, peneiradas em malha de 2 mm e conservadas em sacos de polietileno em ambiente refrigerado a 5 ºC.

O solo foi retirado da região de Pirassununga, Estado de São Paulo (Figura 3) e nas condições: solo de mata natural, cultivado com citros ou cana-de-açúcar.

Figura 3 - Local de coleta das amostras de solo (Google Earth acessado em 06/12/2010). As coordenadas: mata (21°56'33,54"S; 47°19'51,85"O), citros (21°56'25,14"S; 47°19'53,31"O) e cana-de-açúcar (21°56'35,25"S; 47°19'54,64"O).

3. 2. Determinação do pH dos solos.

O pH, representado pela atividade do íon H^+ na solução do solo, corresponde ao hidrogênio dissociado em solução, em equilíbrio com a fase sólida do solo[43]. Sua determinação foi feita por potenciometria direta, utilizando-se

eletrodo de hidrogênio para suspensões de solo em água e em solução de cloreto de cálcio 0,01 mol L^{-1}, de pH inicial igual a 5,19 .

Transferiu-se uma massa bem conhecida de solo, correspondente a 10 mL de solo, para um erlenmeyer 50 mL e em seguida foram adicionados 25 mL da solução de $CaCl_2$. A mistura foi agitada durante trinta minutos, em ambiente fechado e em temperatura de 25 ºC, e depois deixada para decantar durante uma hora. Realizaram-se, então, as medidas de pH, mergulhando-se levemente a ponta do eletrodo, o suficiente para cobrir sua parte sensível, no sobrenadante da suspensão. Esse processo foi realizado em duplicata para cada um dos três tipos de solos estudados.

3.3. Determinação da acidez total.

A acidez total constitui-se de duas partes distintas: a acidez trocável, representada por íons Al^{3+}, e a residual, representada por H^+ não dissociado. A acidez total é extraída dos solos usando-se solução de acetato de cálcio 1 mol L^{-1} em pH = 7, a qual remove o Al^{3+} e o H^+ não dissociados do solo.[43]

Transferiu-se uma massa bem conhecida de solo, correspondente a 10 ml de solo, para um erlenmeyer de 250 mL. Adicionaram-se 100 mL da solução de acetato de cálcio ao sólido, o frasco foi fechado e a suspensão agitada durante alguns minutos. Os frascos foram deixados em repouso durante toda uma noite para que os solos decantassem. Alíquotas dos sobrenadantes foram tituladas com uma solução padronizada de hidróxido de sódio, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada um dos três tipos de solo e também para um branco (solução de acetato de cálcio e o indicador).

3.4. Determinação carbono orgânico total (COT).

A determinação da quantidade de carbono orgânico baseou-se na oxidação desse carbono orgânica por íons dicromato, em meio fortemente ácido.[44]

A equação 1 ilustra essa reação:

$$2\ Cr_2O_7^{2-} + 3\ C + 16\ H^+ = 4\ Cr^{3+} + 3\ CO_2 + 8\ H_2O \qquad \textbf{equação (1)}$$

O excesso de dicromato foi determinado por titulação com íons Fe^{2+}. A equação 2 ilustra essa reação:

$$Cr_2O_7^{2-} + 6\ Fe^{2+} + 14\ H^+ = 2\ Cr^{3+} + 6\ Fe^{3+} + 7\ H_2O \qquad \textbf{equação (2)}$$

Uma massa conhecida de cada um dos três tipos de solos estudados foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL e em seguida adicionaram-se, com uma pipeta volumétrica calibrada, 10 mL da solução de dicromato de potássio 0,1684 mol L^{-1} e, em seguida 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Agitou-se manualmente a mistura por um minuto e deixou-se resfriar por uma hora. Completou-se o volume do balão com água deionizada. A mistura foi deixada em repouso durante 24 horas para que o solo decantasse. Alíquotas de 50 mL do sobrenadante foram transferidas para um erlenmeyer de 250 mL, utilizando-se uma pipeta volumétrica calibrada. Acrescentaram-se 10 mL de ácido fosfórico concentrado e 4 gotas da solução indicadora de difenilamina. Titulou-se com solução de sulfato ferroso amoniacal. Por diferença em relação à titulação do branco (ausência de solo), determinou-se a quantidade de dicromato consumido. O procedimento foi realizado em triplicata tríplice, cada solo foi amostrado três vezes e para cada amostra titularam-se três alíquotas de sobrenadante.

3.5. Análise microbiológica.

Foram empregados dois meios de cultura, sendo um deles específico para bactérias e actinomicetos preparado a partir de um extrato de solo rico em matéria orgânica (tabela 1) e outro conhecido por meio de Martin, empregado para o cultivo de fungos (tabela 2).

As soluções preparadas, conforme quantidades das tabelas 1 e 2, foram autoclavadas a 120 °C durante meia hora. Depois de resfriadas, de forma a permitir o manuseio, elas foram vertidas em placas de Petri previamente esterilizadas em estufa a 170 °C. Esse procedimento foi realizado em uma sala asséptica em bancada com fluxo, previamente limpa com etanol. Depois que o meio atingiu a temperatura e a viscosidade adequada, as placas foram deixadas em repouso em estufa à temperatura de aproximadamente 28 °C até o momento de serem analisadas.

Tabela 1. Reagentes utilizados na preparação do meio para a contagem de bactérias e actinomicetos.

Reagente	**Quantidade**
água	450 mL
extrato de solo	50 mL
ágar	7,5 g
glicose	7,5 g
K_2HPO_4	0,25 g

Tabela 2. Reagentes utilizados na preparação do meio de Martin para fungos.

Reagente	**Quantidade**
Água destilada	500 mL
Ágar	10 g
Dextose	5 g
Peptona	2,5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4.7\ H_2O$	0,25 g
Rosa de bengala	0,016 g
Streptomicina	0,015 g

O método empregado consistiu em suspender amostras do solo em solução aquosa de $MgSO_4.7H_2O$ na concentração de 2,46 g L^{-1}. Suspenderam-se 10 g de solo em 90 mL da solução de $MgSO_4.7H_2O$, e adicionou-se 0,1 mL dessa suspensão na placa de Petri, usando-se uma pequena alça de vidro no espalhamento da suspensão ao longo da placa. A placa foi fechada e posta de maneira invertida em uma incubadora, e mantida a 28 °C para o crescimento das colônias. A contagem de colônias foi feita 48 horas após o plaqueamento para as bactérias e actinomicetos e 64 horas para fungos. O processo foi feito em quadruplicata, e foram feitas várias diluições de 10 vezes da suspensão inicial (10 g solo /90 mL de solução de sulfato de magnésio) para a obtenção dos melhores resultados, já que, a priori, não se sabia qual diluição permitiria a melhor leitura de colônias.

3.6. Análise Elementar.

A análise elementar foi realizada num aparelho "Perkin Elmer Series II CHNS/O Analizer 2400", utilizando-se massas de solos menores que 5 mg. Esses resultados são apresentados, mas devem ser analisados com muito cuidado para o caso do solo. Trata-se de uma técnica que utiliza uma amostra muito pequena e a incerteza, pode ser grande, já que a amostragem é pequena em se tratando de uma amostra heterogênea como é o solo.

3.7. Análises Térmicas.

Dois tipos de análise térmica: DSC e TGA foram realizados em um "Differential Scanning Calorimeter 910" da Du Pont Instruments e em um "Thermogravimetric Analyzer 2050" da TA Intruments, respectivamente. As condições de análise foram de aquecimentos entre 25 e 600 °C, e taxa de aquecimento de 10° C / min, em atmosfera de ar sintético na vazão de 10 cm^3 min^{-1}. Nas análises de DSC utilizaram-se massas em torno de 8,5 mg e na

TGA em torno de 30 mg. As amostras foram previamente secas em bancada, em ambiente aberto, durante 48 horas.

3.8. Microcalorimetria

3.8.1. Procedimento experimental e metodologia de cálculo.

Em essência a amostra a ser usada foi retirada do ambiente de estocagem a 278 K, 24 horas antes do experimento calorimétrico. Amostras de 1 grama do solo foram colocadas em uma cela de aço inox e mantidas 24 horas à temperatura de 298 K. Após esse tempo a amostra foi inoculada com 200 µL da solução contendo o substrato cujo metabolismo seria estudado.

Utilizaram-se ampolas de aço com um volume interno de 4 cm^3, sendo a amostra em seu interior separada do ambiente calorimétrico por uma membrana de polietileno permeável a CO_2 e não permeável à água. Logo que a amostra de solo recebia a solução contendo o substrato a ampola era fechada e inserida no canal de medida do calorímetro, num ambiente pré-termostatizado durante 30 minutos. Decorrido esse tempo a ampola era colocada na posição de leitura do instrumento.

Em essência, a cela calorimétrica, onde se coloca a amostra de solo, encontra-se entre duas termopilhas e todo o conjunto permanece inserido em um termostato cuja temperatura se mantém constante em $1x10^{-4}$ K. Conforme um processo biológico ocorre, a energia envolvida passa pelas termopilhas, e esse fluxo é registrado como um sinal elétrico de potência (µW) por tempo (s) (Figura 1).

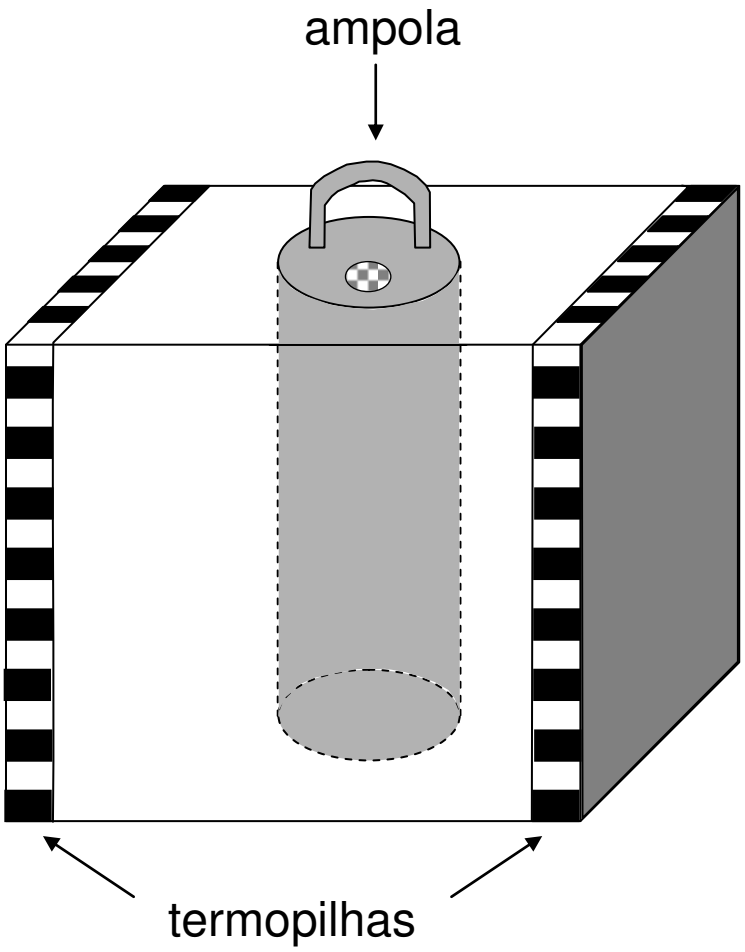

Figura 4. Representação simplificada da célula calorimétrica.

Como o processo de crescimento microbiano geralmente é lento; a duração pode variar de horas a meses, o calorímetro deve ser adequado para esse tipo de cinética. Calorímetros de condução ou de compensação térmica são os que se prestam a esse tipo de estudo. No caso desse trabalho, o microcalorímetro empregado é do tipo condução térmica e ele é capaz de monitorar eventos térmicos de curta e longa duração, este último, o caso presente.

O registro calorimétrico, para o sistema utilizado (calorímetro Thermometric modelo 2277), é um gráfico de potência dissipada em função do tempo. A análise e tratamento desses registros é que permitem a obtenção dos dados necessários para se estabelecer a discussão.

No caso desse trabalho, resumidamente, as condições de operação do calorímetro foram: sensibilidade 1000 μW e coleta de dados a cada 300 segundos. Para a calibração do aparelho foi realizada uma calibração elétrica conforme protocolo do fabricante. Nessa calibração, inicialmente se ajusta a sensibilidade de medida em que se deseja realizar o experimento. Com o botão de ajuste de zero ajusta-se a leitura para zero e deixa-se nessa posição durante um tempo de 15 minutos. Aciona-se a calibração para o canal de medida em que se pretende inserir a amostra e procede-se a uma calibração elétrica externa, no modo estático, com uma potência igual ao fundo de escala de sensibilidade em que se está trabalhando. O tempo de calibração deve ser suficiente, cerca de 30 minutos, para se atingir um estado estacionário de sinal. Após atingir o estado estacionário, com o botão "fine", ajusta-se o sinal para que tenha o mesmo valor de fundo de escala selecionado (sensibilidade). Obtido esse ajuste, a calibração elétrica é interrompida, esperando-se o sinal voltar à posição zero. O procedimento de calibração é, então, repetido. Esse procedimento deve ser realizado toda vez que a escala de medida do instrumento for mudada ou a cada 3 meses, conforme recomendação do fabricante.

Nesse trabalho foram estudados o metabolismo da glicose e o efeito de dois contaminantes, o fenol e o 4-clorofenol. Na primeira etapa do trabalho, 1 grama de cada um dos três tipos de solo, que no momento estava com 3 meses de coleta, recebeu uma dose de 200 μL de solução aquosa de glicose na concentração 5 g L^{-1}.

Na segunda etapa foi estudado o efeito da adição de fenol ao solo. Em amostras de 1 grama de solo foram adicionados 100 μL de uma solução aquosa de fenol na concentração de 0,03 mol L^{-1}. Após ser observado o efeito térmico do metabolismo do fenol, a amostra de solo recebeu 100 μL de uma solução aquosa de glicose, na concentração de 10 g L^{-1}, registrando-se o metabolismo da glicose pelos microrganismos do solo. Como nessa ocasião os solos já haviam sido coletados há 8 meses, os experimentos com somente adição de glicose foram repetidos antes que os experimentos com a solução de fenol fossem realizados.

Na terceira etapa foram realizados estudos com o 4-clorofenol. Em amostras de 1 grama de solo foram adicionados 100 µL de uma solução aquosa de 4-clorofenol na concentração de 0,03 mol L^{-1}. Diferentemente do fenol, nesse caso não foi observado efeito térmico do metabolismo do 4-clorofenol. Então essas amostras de solo receberam 100 µL de uma solução aquosa de glicose, na concentração de 10 g L^{-1}, registrando-se o metabolismo da glicose pelos microrganismos do solo. Como nessa etapa os solos já haviam sido coletados há 1 ano, os experimentos com somente adição de glicose também foram repetidos. Cada experimento de calorimetria foi repetido, pelo menos, 3 vezes nas mesmas condições. Os resultados tabelados são uma média de três experimentos repetidos, exceto para alguns casos onde se tem dois resultados.

O tratamento dos dados experimentais, aqui apresentado, é objeto de extensivos estudos sobre reações de crescimento microbiano, especialmente realizados por Sparling[45], Battley[46], Duboc[47] e Barros.[19 e 20]

A essência desse tratamento matemático é efetuar o balanço de massa e energia a partir do registro calorimétrico. O registro calorimétrico é uma representação do fluxo de energia (potência) em função do tempo, t. A integração dessa curva fornece a energia gerada (Q) que acompanha a atividade microbiana.

O fluxo de energia (φ) em cada instante é uma medida da atividade microbiana metabólica, quanto maior essa atividade maior o fluxo de energia (potência). Um resultado da atividade microbiana, obtido pela análise da curva calorimétrica, pode ser representada especificamente pela quantidade de biomassa viva formada (ΔX).

De acordo com Sparling a quantidade de biomassa pode ser estimada a partir do registro calorimétrico[45]. Outras técnicas podem ser usadas para tal determinação, mas a calorimetria parece ser uma forma bem mais segura e fácil de fazer isso, desconsiderando-se o valor de custo de um microcalorímetro. Assim, a biomassa do solo pode ser estimada de acordo com a equação 3:

$$\log X = 1{,}025 + 0{,}856 \log \varphi \qquad \textbf{equação (3)}$$

Se φ é dado em microwatts, o valor de X é dado em microgramas.

A aplicação dessa equação no momento anterior ao crescimento exponencial, fase de latência, dá o valor da biomassa pré-existente. A aplicação no final do crescimento exponencial dá o valor da biomassa final. A diferença entre esses valores resulta em ΔX que representa o crescimento da biomassa devido à adição do substrato (*S*). O final do crescimento da biomassa, a que se refere a frase anterior, é tomado quando o registro calorimétrico atinge o valor máximo de potência (denominado "peak time", P_T).

O quociente entre *Q* e ΔX permite o cálculo do rendimento térmico, $Y_{Q/X}$, da reação do crescimento microbiano.

Aplicando-se as equações desenvolvidas por Von Stockar[48] pode-se calcular o rendimento da biomassa, $Y_{X/S}$, e a entalpia molar de degradação do substrato (glicose), $\Delta_R H_S$.

A equação macroquímica que representa a reação que está ocorrendo no solo pode ser escrita na forma geral da equação 4:

a $C_6H_{12}O_6$+**b** O_2 + **c** $NH_4^+ \rightarrow$ $CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$ + **d** CO_2 + **e** H_2O + **f** H^+ **(equação 4)**

onde $CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$ é a fórmula mínima para a biomassa[10].

As equações de conservação são:

Carbono → **6a = 1 + d**

Hidrogênio → **12a + 4c = 1,8 + 2e + f**

Oxigênio → **6a + 2b = 0,5 + 2d + e**

Nitrogênio → **c = 0,2**

Carga → **c = f**

O tratamento dos registros calorimétricos permite, portanto, encontrar a biomassa incorporada no solo, o consumo de oxigênio e a liberação de CO_2, entre outros parâmetros, os quais permitem uma análise comparativa entre os solos aqui investigados,

Finalmente, a relação entre a energia não consumida (conservada) e aquela prevista para ser totalmente consumida (entalpia de combustão completa da glicose; $\Delta combH$ = -2803 kJ/mol[19] e do fenol = -3083,5 kJ/mol[49], dá a eficiência do processo, η_H em porcentagem,

$$\eta_H = 100(\Delta_{comb}H - \Delta_R H_S)/\Delta_{comb}H \qquad \textbf{(equação 5)}$$

4. Resultados e Discussão.

Serão aqui apresentados e discutidos os resultados obtidos nesse trabalho, separadamente para cada parâmetro estudado**.**

4.1. Determinação do pH dos solos.

O pH é uma variável que afeta muitas propriedades do solo, tanto químicas como biológicas, e até físicas[43]. Ele pode influenciar, por exemplo, a absorção de muitos elementos químicos pelas raízes de plantas, além da atividade dos microorganismos[50]. Seu valor depende de vários fatores próprios da constituição do solo, assim como das atividades ali desenvolvidas. O pH controla o tipo de microorganismo dominante, o estado de agregação, trocas iônicas, mobilidade de matéria orgânica e inorgânica, solubilidade de herbicidas, lixiviação etc.

O valor de pH inicial da água em que o solo foi suspenso era igual a 6,54 e o da solução de $CaCl_2$ era igual a 5,19. A tabela 3 dá os resultados de pH para as diferentes condições.

Os dados apresentados na tabela 3 mostram que o pH do solo cultivado com cana-de-açúcar é o mais baixo dos três tipos estudados. Nesse caso, justifica-se esse valor pelo uso do "vinhoto" na irrigação, que tem pH abaixo de sete[51]. Os outros solos não recebem esse aporte de vinhoto, no entanto, o solo da mata natural recebe grande quantidade de matéria orgânica, que na decomposição também faz diminuir o pH.

Tabela 3. Valores de pH dos vários solos cultivados por diferentes culturas, da região de Pirassununga(SP).

Amostra/ Cultivo	**Cana-de-açúcar em H_2O**	**Citros em H_2O**	**Mata natural em H_2O**	**Cana-de-açúcar em $CaCl_2$**	**Citros em $CaCl_2$**	**Mata natural em $CaCl_2$**
1	4,96	6,98	5,47	4,23	6,31	4,75
2	5,19	6,92	5,45	4,34	6,45	4,76

A redução do pH do solo cultivado com cana-de-açúcar em comparação ao sob vegetação natural também foi observada por Cerri[52] e Lima[53]. Esses autores associaram essa mudança à diminuição dos teores de cátions trocáveis.

O cultivo de citros alterou, significativamente, o valor de pH do solo. Os valores médios do pH nas áreas sob cultivo de citros, na profundidade de 5-10 cm, em relação à mata, aumentou de cerca de 1,5 unidades. Resultados parecidos foram observados por Sanches et al[54], embora esses autores tenham encontrado uma elevação muito pequena do pH. Essas diferenças podem estar relacionadas á aplicação de corretivos como calcário e fertilizantes. O processo de calagem é normalmente feito a lanço no pomar, mas na região entre linhas, onde foi feita a nossa coleta, a calagem é mais efetiva, e isso leva a um aumento maior do pH. Na plantação de citros, a adubação com fertilizantes nitrogenados, que também altera o pH do solo, ocorre na linha de cultura, então a discussão desse aspecto não faz sentido, nesse trabalho.

4.2. Determinação da acidez total.

A acidez total corresponde à soma de Al^{3+} e H^{+} e pode ser expressa em mmol de H^{+} por 100 gramas de solo. A extração desses íons do solo é feita por solução de acetato de cálcio em pH igual a 7,0 e é determinada por titulação do sobrenadante com solução de hidróxido de sódio. No caso aqui presente os resultados obtidos para as três amostras de solo encontram-se na tabela 4.

Os resultados apresentados na tabela 4 mostram que a acidez total do solo sob cultivo de cana-de-açúcar e o solo de mata natural são muito próximas. Já o solo do cultivo de citros a acidez é menor, da mesma forma que a análise do pH já havia indicado. Esses resultados são coerentes com valores de pH observados, para a acidez do meio aquoso do solo.

Tabela 4. Determinação da acidez total dos solos, **em mmol por 100 gramas de solo.**

Ensaio	Cana-de-açúcar	Citros	Mata natural
1	4,97	1,48	5,22
2	5,06	1,23	5,31
3	4,88	1,52	5,42
média	**4,97 ± 0,09**	**1,41 ± 0,16**	**5,32 ± 0,10**

Essa determinação quantitativa se baseia na troca iônica dos íons presentes no solo: o íon cálcio, em alta concentração na solução, faz essa troca iônica com o alumínio e o hidrogênio, os quais conferem acidez ao sobrenadante. Como discutido anteriormente, uma possível calagem do solo de citros pode ter levado a uma substituição prévia dos íons Al^{3+} e H^{+} do solo no campo, dessa forma, a diminuição dessa acidez, em comparação com os outros dois tipos de solo, fica plenamente justificada. No caso dos solos de mata e de cana-de-açúcar, essa acidez não apresenta diferença de valores que justifique uma discussão, muito embora se saiba que o uso de vinhoto, rico em potássio, pode levar a uma troca dos íons, responsáveis pela acidez total, por íons potássio.

4.3. Determinação do carbono orgânico total (COT).

Os resultados da tabela 5 mostram que as quantidades de carbono orgânico nos solos cultivados com cana-de-açúcar e citros são muito próximas entre si. O solo de mata natural apresentou a maior quantidade de carbono orgânico. Isso ocorre, pois há um aporte total de resíduos de plantas na superfície do solo. Esse resíduo acumula, já que as plantas estão, na sua grande maioria, em fase adulta e aquelas que são sazonais, nascem, crescem e morrem no local.

No caso da cana-de-açúcar há um grande aporte de matéria orgânica, principalmente pela aplicação do vinhoto e adubação, mas o crescimento da cana-de-açúcar exige muito desse material. Como nesse local se pratica a queima da cana-de-açúcar antes do corte, parte do aporte orgânico que poderia voltar ao solo

numa colheita sem queima, deixa de ocorrer, pois sofre combustão ou então volatiliza.

No caso de citros, o aporte natural de matéria orgânica, praticamente não ocorre, já que nesse local, o solo é completamente limpo e assim se preserva devido à sombra. No entanto, a adubação orgânica e inorgânica sempre é feita próxima à linha de plantio, local de onde o solo não foi coletado. Algum aporte natural ocorre nas entrelinhas de plantio, já que o crescimento de vegetais de pequeno porte ocorre nesse local.

Tabela 5. Resultados da quantidade de carbono orgânico, em **miligrama por grama de solo**, para os diversos solos da região de Pirassununga (SP).

Ensaio	Cana-de-açúcar	Citros	Mata natural
1	24,2	26,3	49,4
2	22,8	23,8	48,7
3	22,6	23,6	50,0
média	**(23,2 ± 0,9)**	**(24,6 ± 1,5)**	**(49,4 ± 0,7)**

4.4. Análise microbiológica dos solos.

Os dados apresentados na tabela 6 mostram que o solo cultivado com cana-de-açúcar e o solo de mata natural apresentaram valores de contagem de bactérias e actinomicetos próximos entre si. O solo cultivado com citros apresentou o maior valor entre os três solos estudados.

Tabela 6. Resultados da determinação da quantidade de bactérias e actinomicetos dos vários solos cultivados por diferentes culturas, **em ufc / 10^4 g^{-1} de solo seco (nº. células / mL),** da região de Pirassununga (SP).

Ensaio	Cana-de-açúcar	Citros	Mata natural
1	1,56	31,1	1,42
2	5,29	11,2	8,22
3	2,37	43,8	4,07
4	3,58	21,1	4,80
média	**(3,20 ± 1,23)**	**(26,8 ± 10,6)**	**(4,63 ± 1,88)**

Os dados da tabela 7 mostram que os solos cultivados com cana-de-açúcar e citros apresentaram valores próximos entre si para a contagem de fungos. O solo de mata natural apresentou o maior valor entre os três tipos de solo estudados.

Os resultados apresentados nas tabelas 6 e 7 podem ser explicados quando relacionados com os valores de pH obtidos. A maioria das bactérias cresce entre pH 6 e 8 e poucas crescem em pH 4.

Tabela 7. Resultados da determinação da quantidade fungos dos vários solos cultivados por diferentes culturas, **em ufc /10^3 g^{-1} de solo seco (n^o. células / mL),** da região de Pirassununga (SP).

Ensaio	Cana-de-açúcar	Citros	Mata natural
1	3,60	7,29	15,3
2	4,39	3,77	42,0
3	5,59	3,14	27,7
média	**(4,52 ± 0,70)**	**(4,73 ± 2,00)**	**(28,3 ± 9,1)**

Como mostram os resultados (tabela 3), o pH do solo de citros é o mais alto dos três.Os fungos filamentosos e as leveduras são mais tolerantes às variações de pH, crescem bem em pHs entre 5 e 6 e são bem adaptados em pHs menores que 5[49]. Isso pode explicar porque o solo cultivado com citros, que possui a menor acidez entre os três tipos de solos estudados, apresentou um pequeno número de fungos e um grande número de bactérias. Por outro lado, o solo de mata natural possui a maior quantidade de fungos, o que também pode ser explicado pela maior quantidade de matéria orgânica e umidade nesse solo.

Embora a literatura[51] indique que a aplicação do vinhoto faz aumentar a quantidade de fungos, talvez até pelo baixo valor de seu pH, isso não se observa ao se comparar o solo da cana-de-açúcar com o citros. No entanto, os resultados da literatura têm que ser vistos de maneira cautelosa, pois eles são bem dependentes do tempo e da quantidade aplicada de vinhoto.

4.5. Analise elementar.

Os dados obtidos no laboratório de Análise Elementar do IQ são apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Dados da análise elementar, **em porcentagem em massa**, dos vários solos cultivados por diferentes culturas, da região de Pirassununga (SP).

Elemento	Cana-de-açúcar	Citros	Mata natural
carbono	1,84	1,66	1,83
hidrogênio	0,66	0,24	0,49
nitrogênio	0,36	0,35	0,28
COT	2,32	2,46	4,94

A tabela 8 mostra os resultados de porcentagem em carbono orgânico total (COT), determinada por titulação. Os resultados, análise elementar e COT, não são concordantes entre si. Ambas as técnicas apresentam problemas: a análise elementar foi feita com uma amostra muito pequena, menor que 5 miligramas, o que pode ter levado a uma incerteza elevada no resultado. Por outro lado, a determinação de COT foi feita com um oxidante muito forte, dicromato, que pode reagir com muitos redutores presentes no solo, entre os quais se encontra a matéria orgânica. Íons metálicos em estado de oxidação mais baixos, compostos nitrogenados etc, podem levar, também, a resultados incertos. Há um fator de correção aplicado nessa análise, entretanto ele representa uma correção média e que pode variar bastante, dependendo da amostra.

Como se observou fisicamente, o solo de citros apresenta-se com textura mais granulada, portanto com relativa facilidade para perder água. Embora todas as amostras tenham sido secas em bancada, os resultados de CHN mostram que o solo de citros apresenta uma relação C:H igual a **6:10**, possível para uma fórmula mínima de um composto orgânico. No entanto, no caso da cana-de-açúcar e de mata natural, essa relação passa para **6:26** e **8:24**, respectivamente. Essa relação é impossível para qualquer composto orgânico. Isso significa que

comparações entre essa duas técnicas devem ser feitas com certa prudência. É muito provável que essas amostras de solo não estavam totalmente secas.

4.6. Análises térmicas: DSC e TGA.

A quantidade de matéria orgânica nas amostras de solo também pode ser avaliada pela análise termogravimétrica (TGA), e pela calorimetria diferencial de varredura (DSC).[19 e 20]

As curvas de TGA, figura 5, e a tabela 9, mostram dois intervalos de perdas de matéria característicos para todos os solos na faixa de 230 a 270 °C, que ocorrem com absorção de energia, conforme mostram os resultados de DSC, figura 6, embora não tenham sido feitas análises químicas do material que sai, o mais provável é que essa perda corresponda à água mais fortemente ligada ao solo, já que as amostras foram previamente secas ao ambiente.

No entanto, observa-se que os solos da cana-de-açúcar e da mata apresentam uma perda de massa significativa (~ 10%) no início do aquecimento. Essa perda deve-se à água de macroporos, que não foi eliminada convenientemente na secagem. No caso do solo de citros, como essa amostra é menos compactada, a perda dessa água deve ter ocorrido na secagem. Todavia essas perdas no início do aquecimento, não foram registradas nos respectivos DSC das amostras. Esses resultados são coerentes com a análise elementar, que indicou um teor mais alto de hidrogênio para esse dois solos.

As perdas de massa na faixa de 230 a 270 °C correspondem à água mais fortemente ligada à argila do solo. Nos registros de DSC, essas perdas se apresentam como processos endotérmicos. O cálculo de energia nessa região fica bastante comprometido já que não se estabelece uma boa linha base após o evento. Muito provavelmente, isso deve ter ocorrido, pois a partir de 270 °C, como se observa pelas curvas de TGA (figura 5), começa outra perda de massa mais lenta, que se estende até cerca de 500 °C.

Como mostra Yang et al[55], se o solo contiver apreciáveis quantidades de hemicelulose, a sua pirólise também ocorre na faixa de temperatura que começa

em 230 ºC, enquanto que celulose e lignina vão sofrer pirólise em temperaturas mais altas. Assim, essa segunda perda de massa pode ser atribuída à matéria orgânica e também à perda de água estrutural de silicatos, ou mesmo de argilas. Esses são dois processos de natureza termodinâmica distinta: a perda de matéria orgânica, normalmente via oxidação, é um processo exotérmico enquanto que a perda de água é endotérmica. Nesse caso, o efeito endotérmico da saída de água se sobreporia ao efeito exotérmico da pirólise inicial da hemicelulose.

Essa segunda perda entre 270 e 500 ºC é um processo mais lento, envolvendo materiais com cinética de pirólise diferenciada; o material celulósico queima em temperatura ligeiramente mais baixa, com o pico máximo em 355 ºC, enquanto que a lignina pirolisa em temperatura ligeiramente mais elevada, 368 ºC. Além disso, a pirólise da celulose quase não deixa resíduos, ~ 5 % , enquanto que a lignina deixa cerca de 47 % de resíduo sólido. Como mostra Yang[55] , a pirólise da celulose é acompanhada de uma volatilização do material e na curva de DSC ela se apresenta como endotérmica.

Outro aspecto interessante é o fato de a pirólise do material lignínico ser mais lenta. A hemicelulose é constitída de uma mistura de açúcares (xilose, glicose, galactose, etc), é muito ramificada e por isso é mais facilmente pirolisada e removida. A celulose, por outro lado é um polímero de glicose, sem ramificações, com boa estabilidade térmica em termos de pirólise, o que facilita sua volatilização. A lignina apresenta anéis aromáticos e muitas ramificações, o que a leva a sofrer uma pirólise mais lenta e com formação de resíduos sólidos.

É importante verificar que as curvas de DSC (figura 6) registram esses processos, no entanto, é impossível, a partir dos experimentos realizados, calcular as energias envolvidas nos eventos. Não há definições de linha base e atribuí-las, a partir dos experimentos realizados, não seria uma boa prática científica.

No entanto, de modo pouco quantitativo, os picos no DSC, que ocorrem por volta de 250 ºC, mostram-se maiores para os solos de cana-de-açúcar e mata, o que está de acordo com a análise elementar: maior quantidade de carbono para esses dois solos, e com as relações **C:H** maiores para esse dois solos, indicando possíveis teores maiores de umidade.

As curvas de DSC também registram um evento endotérmico por volta de 470°C, temperatura em que a TGA também mostra uma mudança na cinética de perda de massa.

Resumindo, observando-se as figuras 5 e 6, vê-se que em aproximadamente 240 °C as curvas de TGA (figura 5) mostram uma perda de massa mais acentuada que se encerra por volta de 270 °C. Esse evento é acompanhado por um pico endotérmico no DSC (figura 6), bem distinto visualmente. Entre 270 e 430 °C há perdas de massa bem menos acentuadas que na faixa anterior de temperatura. Essas perdas são observadas no DSC como um pico endotérmico, cuja derivada (inclinação) sofre mudanças exatamente nessas duas temperaturas. Entre 430 e 470 °C há uma nova aceleração na perda de massa, como mostra a figura 5, no entanto, nessa faixa de temperatura o DSC não está bem definido pois, como se vê, há um pequeno aumento na taxa de fluxo térmico e que se inverte a partir de 470 °C. A partir de 470 °C começa um evento mais de lento de perda de massa e o início de um pico exotérmico que não se completa.

Tabela 9. Dados de **perda de massa em %**, em função da temperatura, para os solos cultivados por diferentes culturas, da região de Pirassununga, Estado de São Paulo.

Faixa de temperatura	Cana-de-açúcar	Citros	Mata natural
230 - 270 °C	3,0	1,3	2,6
270 - 500 °C	4,0	3,9	5,0

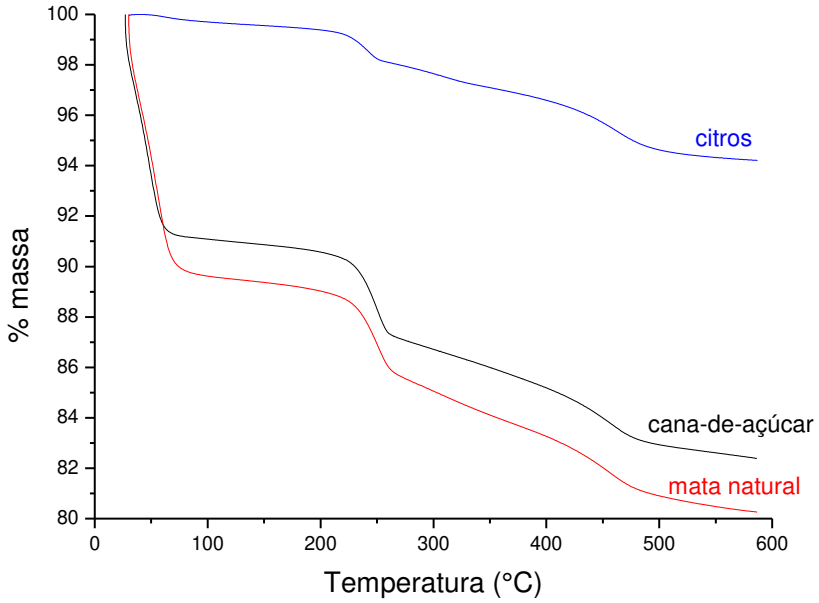

Figura 5. Curvas de TGA, das amostras de solo de mata natural, sob cultivo de cana-de-açúcar e sob cultivo de citros, de um latossolo vermelho da região de Pirassununga-SP.

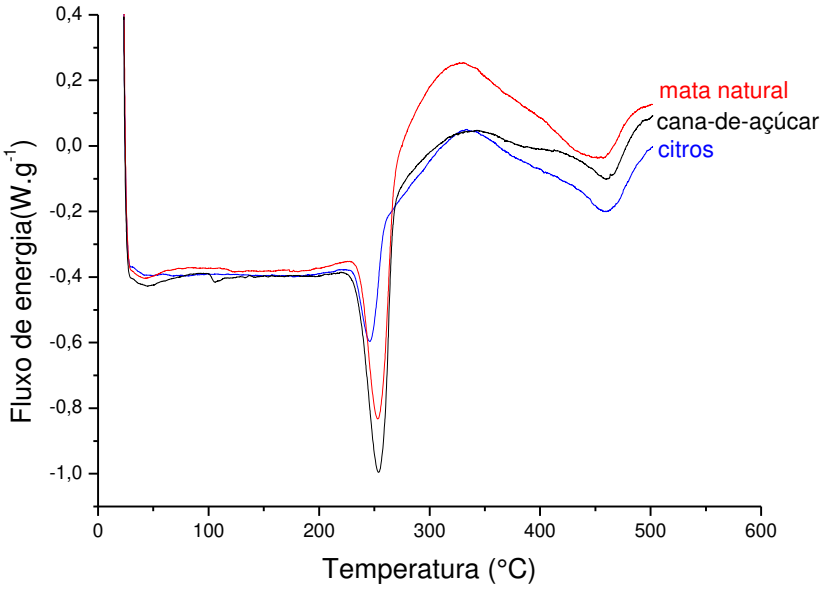

Figura 6. Curvas de DSC, das amostras de solo de mata natural, sob cultivo de cana-de-açúcar e sob cultivo de citros, de um latossolo vermelho da região de Pirassununga-SP.

4.7. Microcalorimetria.

Os resultados da calorimetria aplicada às diferentes condições de análise são mostrados nas tabelas que se seguem. Antes disso é importante resumir o que foi apresentado no item 3.8.1.

A figura 7 mostra uma curva calorimétrica típica para os sistemas aqui estudados, de onde se podem obter todas as grandezas tabeladas:

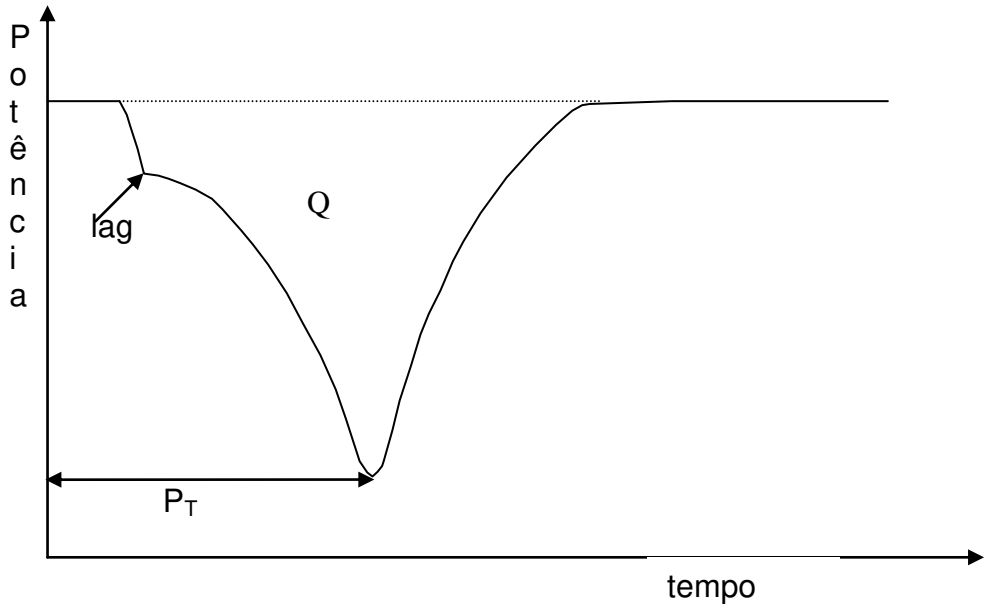

Figura 7- Registro calorimétrico típico da atividade microbiana do solo.

A grandeza ΔX representa o crescimento da biomassa devido à adição do substrato (*S*), obtida pela aplicação da equação 3; *Q* é a energia observada no processo e é obtida pela integração da curva calorimétrica: P_T é o valor de tempo decorrido entre a adição do substrato, S, e o valor máximo de potência registrada pelo calorímetro; o quociente entre *Q* e ΔX permite o cálculo do rendimento térmico, $Y_{Q/X}$, da reação do crescimento microbiano; $Y_{X/S}$ é rendimento da biomassa, dado em mols de biomassa obtida por mol de substrato, S, adicionado; $\Delta_R H_S$ é a entalpia molar de degradação do substrato e k é a constante de crescimento microbiano.

Tabela 10- Resultados da calorimetria para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos, após 3 meses de coleta.

Dado	Cana-de-açúcar	Citros	Mata natural
η_H/%	63,2 ± 0,6	50,0 ± 0,6	63,9 ± 1,7
Q / J g^{-1}	5,8 ± 0,1	7,8 ± 0,1	5,7 ± 0,3
P_T / h	13,2 ± 0,5	8,2 ± 0,9	21,0 ± 0,3
ΔX / mg (%)	0,350 (35 ± 6)	0,630 (63 ± 14)	0,150 (15 ± 3)
$Y_{Q/X}$/ kJ mol^{-1} X	375 ± 77	304 ± 53	935 ± 230
$Y_{X/S}$ / molX/molS	2,56 ± 0,44	4,61± 1,02	1,10± 0,22
- $\Delta_R Hs$ /kJ mol^{-1}	1044 ± 29	1404 ± 18	1026 ± 48
k / 10^{-3} min^{-1}	2,10 ± 0,16	3,0 ± 0,11	1,08 ± 0,06

Tabela 11- Resultados do balanço de massa das equações macroquímicas, para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos, após 3 meses de coleta.

Cultivo/subst	$C_6H_{12}O_6$	O_2	NH_4^+	$CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$	CO_2	H_2O	H^+
cana-de-açúcar	0,54	2,18	0,2	1	2,23	2,63	0,2
citros	0,67	2,96	0,2	1	3,01	3,41	0,2
mata natural	0,53	2,15	0,2	1	2,20	2,60	0,2

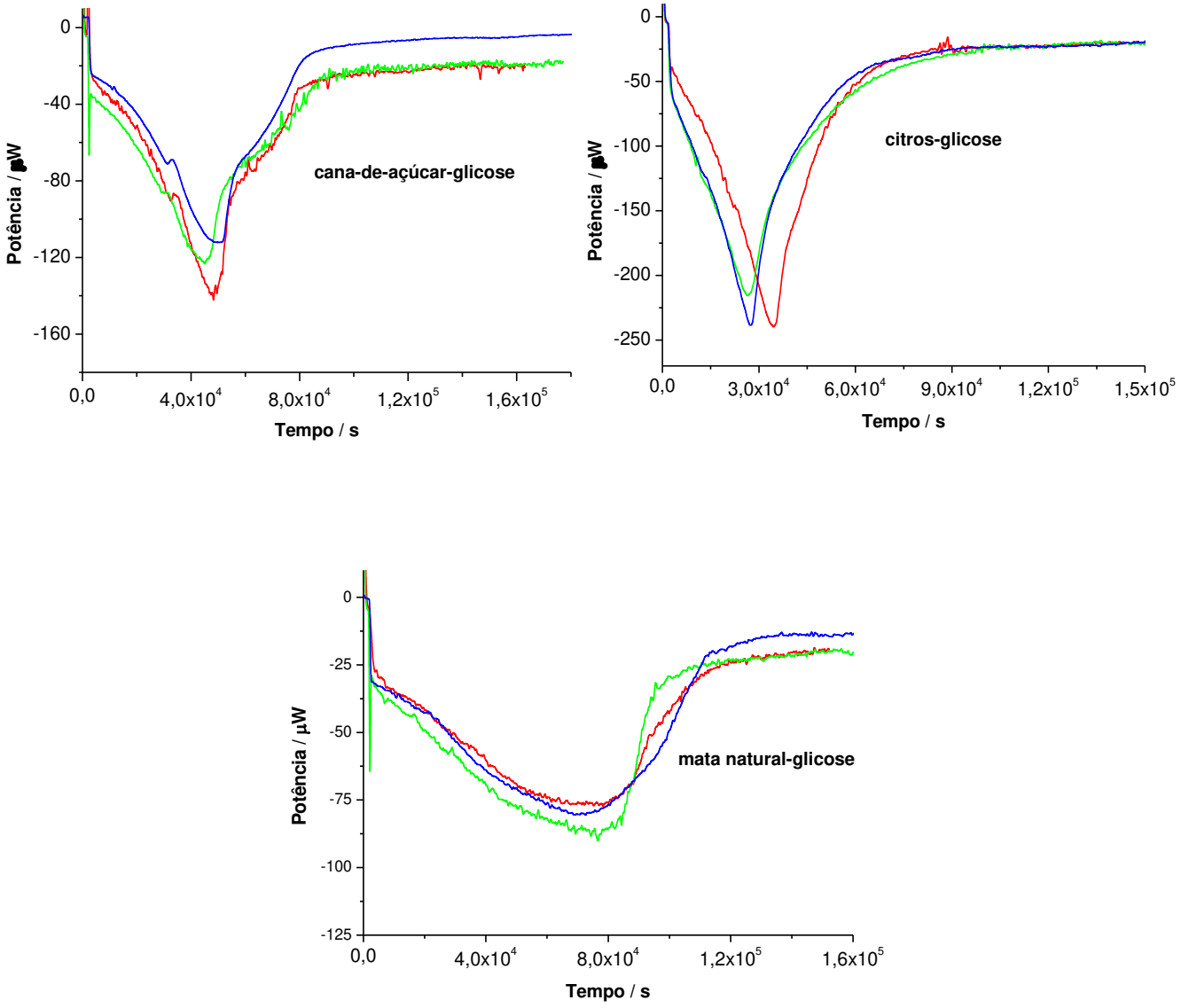

Figura 8. Curvas Calorimétricas para a adição de 1 mg de glicose para os três tipos de solo, após 3 meses de coleta.

Tabela 12- Resultados da calorimetria para a adição de 1 miligrama de glicose, aplicada aos três tipos de solos, após 8 meses de coleta..

Dado	Cana-de-çúcar	Citros	Mata natural
η_H/%	63,2 ± 2,1	60,1 ± 1,4	68,9 ± 3,0
Q / J g^{-1}	5,8± 0,2	6,3 ± 0,2	4,9 ± 0,4
P_T / h	13,5 ± 0,3	11,0 ± 0,4	25,8 ± 4,4
ΔX / mg (%)	0,330 (33 ± 0)	0,940 (94± 2)	0,120 (12 ± 2)
$Y_{Q/X}$/ kJ mol^{-1} de glicose	432 ± 15	164± 8	1004 ± 249
$Y_{X/S}$ / (molX/molS)	2,41 ± 0	6,88 ± 0,14	0,88 ± 0,15
- $\Delta_R Hs$ / kJ mol^{-1}	1044 ± 60	1134 ± 40	882 ± 84
k / 10^{-3} min^{-1}	2,60 ± 0,20	3,46 ± 0,08	1,08 ± 0,16

Tabela 13- Resultados do balanço de massa das equações macroquímicas, para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos, após 8 meses de coleta.

Cultivo/subst	$C_6H_{12}O_6$	O_2	NH_4^+	$CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$	CO_2	H_2O	H^+
cana-de-açúcar	0,54	2,18	0,2	1	2,23	2,63	0,2
citros	0,57	2,38	0,2	1	2,43	2,83	0,2
mata natural	0,48	1,84	0,2	1	1,89	2,29	0,2

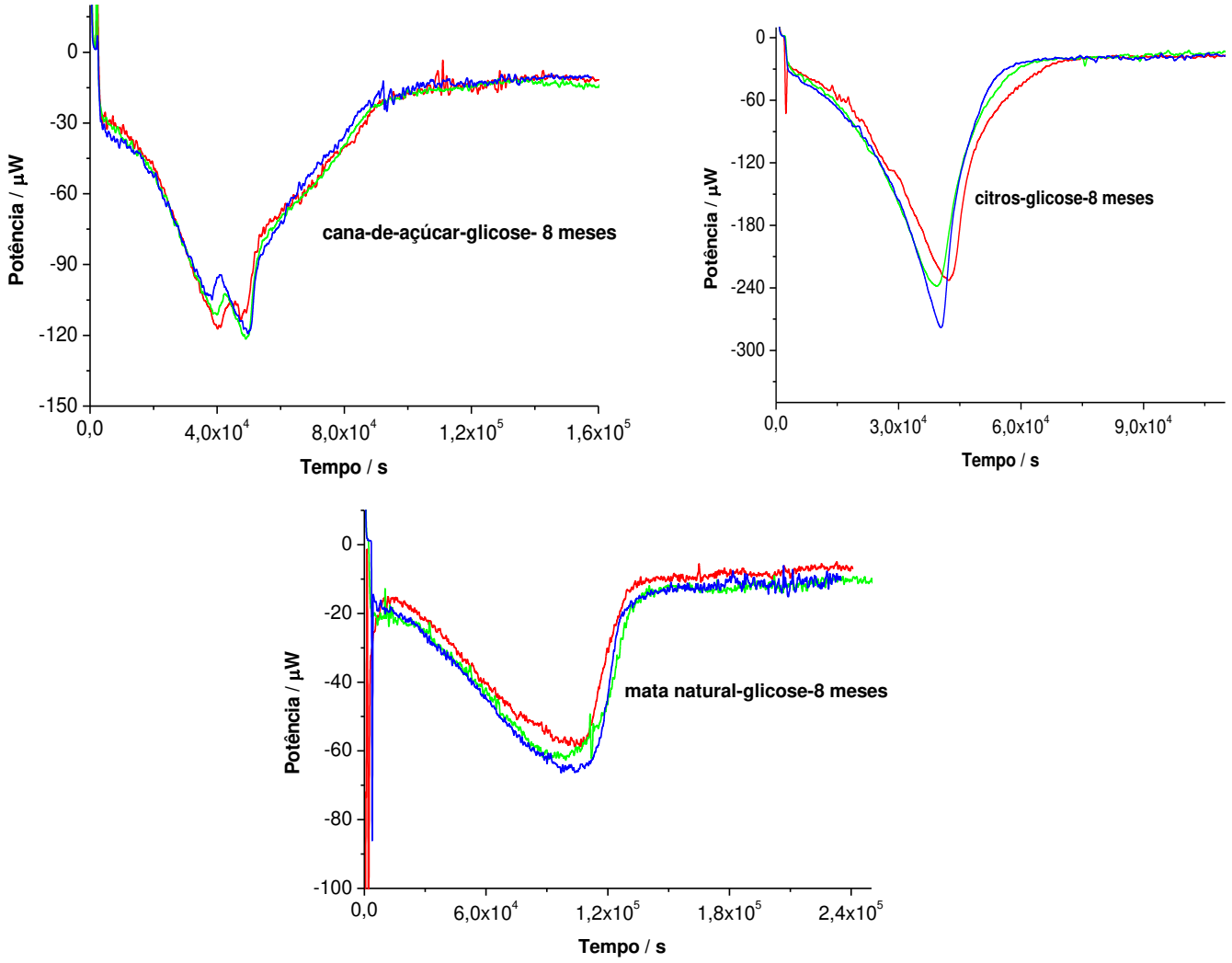

Figura 9. Curvas Calorimétricas após adição de 1 mg de glicose nas três amostras de solo após 8 meses de coleta.

Tabela 14- Resultados da calorimetria para a adição de 3 µmol de fenol, aplicado aos três tipos de solos, após 8 meses de coleta.

Dado	Cana-de-açúcar	Citros	Mata natural
η_H/%	77,3 ± 3,5	50,3 ± 4,4	70,8 ± 2,7
Q / J g^{-1}	2,1 ± 0,3	4,6 ± 0,4	2,7 ± 0,2
P_T / h	70 ± 5	48 ± 7	72 ± 7
- $\Delta_R Hs$ / kJ mol^{-1}	700 ± 100	1533 ± 133	900 ± 66
k / 10^{-2} µW/min	1,1	1,9	1,1
k / 10^{-3} min^{-1} segunda parte	-	2,0	2,57

Tabela 15- Resultados do balanço de massa das equações macroquímicas, para a adição 3 umol de fenol aplicado aos três tipos de solos, após 8 meses de coleta.

Cultivo/subst	C_6H_6O	O_2	NH_4^+	$CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$	CO_2	H_2O	H^+
cana-de-açúcar	0,39	1,71	0,2	1	1,36	0,58	0,2
citros	0,66	3,60	0,2	1	2,98	1,39	0,2
mata natural	0,46	2,16	0,2	1	1,75	0,78	0,2

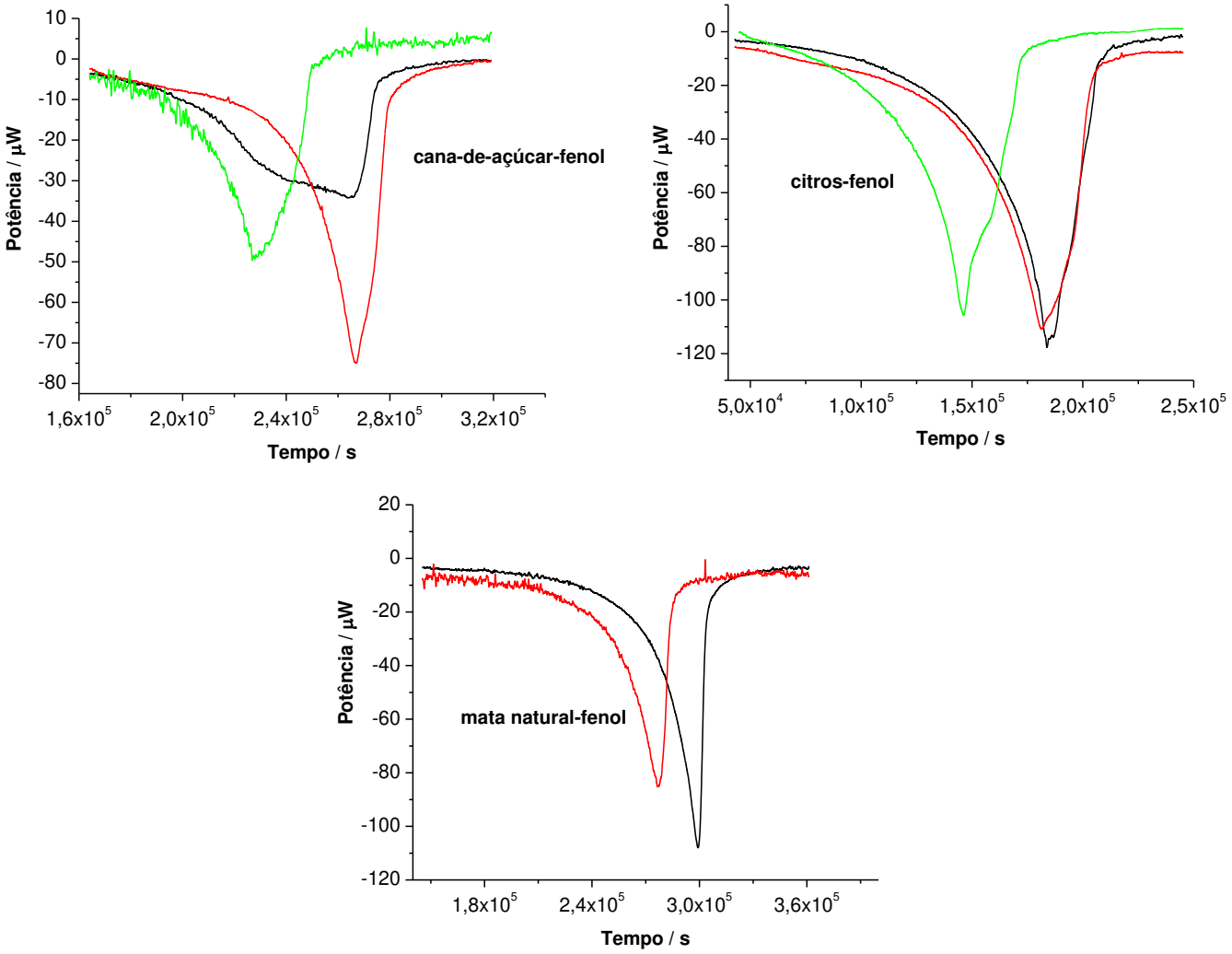

Figura 10. Curvas Calorimétricas para a adição de 3 µmol de fenol: cana-de-açúcar (a); citros (b); mata natural (c).

Tabela 16- Resultados da calorimetria aplicada para a adição de 1 mg de glicose após a adição de fenol aos três tipos de solos coletados há 8 meses.

Dado	Cana-de-açúcar	Citros	Mata natural
η_H/%	59,4 ± 4,0	55,0 ± 2,4	58,1 ± 9,0
Q / J g^{-1}	6,4 ± 0,4	7,1 ± 0,2	6,6 ± 0,5
P_T / h	8,4 ± 0,7	7,6 ± 0,1	10,0 ± 1,5
- $\Delta_R Hs$ / kJ mol^{-1}	1152 ± 72	1278 ± 36	1188± 90
k / 10^{-1} µW/min linear	-	2,0	2,57

Tabela 17- Resultados do balanço de massa das equações macroquímicas, para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos, após 8 meses de coleta e após aplicação de 3 µmol de fenol.

Cultivo/subst	$C_6H_{12}O_6$	O_2	NH_4^+	$CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$	CO_2	H_2O	H^+
cana-de-açúcar	0,58	2,42	0,2	1	2,47	2,87	0,2
citros	0,62	2,69	0,2	1	2,74	3,14	0,2
mata natural	0,59	2,49	0,2	1	2,54	2,94	0,2

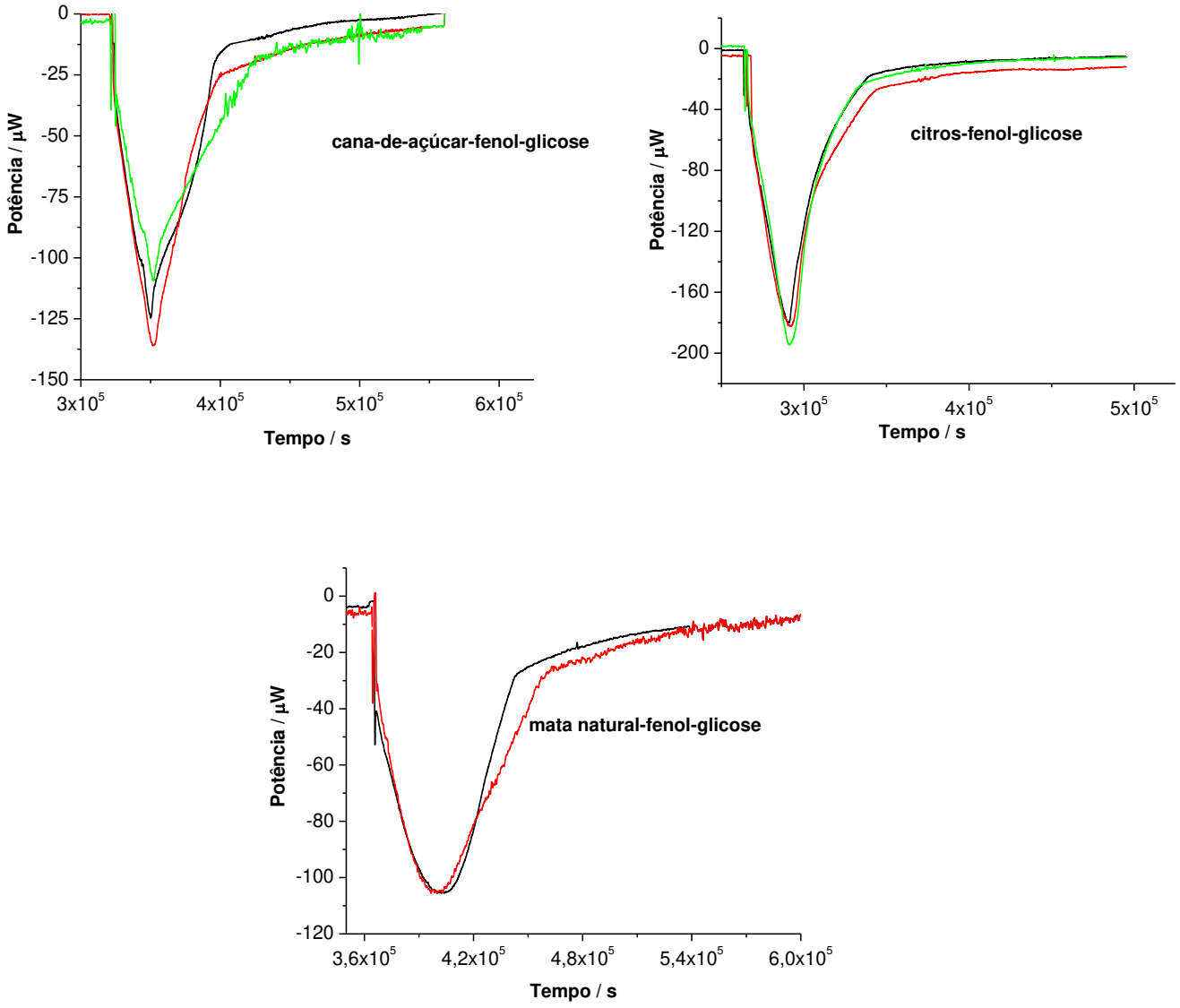

Figura 11. Curvas Calorimétricas para a adição de 1mg de glicose após adição de 3 µmol de fenol para os solos de cana-de-açúcar, citros e mata natural.

Tabela 18- Resultados da calorimetria para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos, após 1 ano de coleta.

Dado	Cana-de-açúcar	Citros	Mata natural
η_H/%	61,5 ± 3,1	59,4 ± 2,0	65,8 ± 3,2
Q / J g^{-1}	6,0 ± 0,2	6,4 ± 0,1	5,4 ± 0,5
P_T / h	15 ± 2	13,1± 0,3	22,8 ± 1,2
ΔX / mg (%)	0,370 (37 ± 2)	0,850 (85 ± 18)	-
$Y_{Q/X}$/ kJ mol^{-1} X	398 ± 36	185 ± 42	-
$Y_{X/S}$ / (molX/molS)	2,70 ± 0,15	6,22 ± 1,31	-
- $\Delta_R Hs$ / kJ mol^{-1}	1080 ± 36	1152 ± 18	972 ± 90
k / 10^{-2} µW/min linear	-	-	5,5± 0,3
k / 10^{-3} min^{-1}	3,1 ± 0,2	4,3 ± 0,1	-

Tabela 19- Resultados do balanço de massa das equações macroquímicas, para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos, após 1 ano de coleta.

Cultivo/subst	$C_6H_{12}O_6$	O_2	NH_4^+	$CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$	CO_2	H_2O	H^+
cana-de-açúcar	0,62	2,65	0,2	1	2,70	3,10	0,2
citros	0,58	2,42	0,2	1	2,47	2,87	0,2
mata natural	0,51	2,03	0,2	1	2,08	2,48	0,2

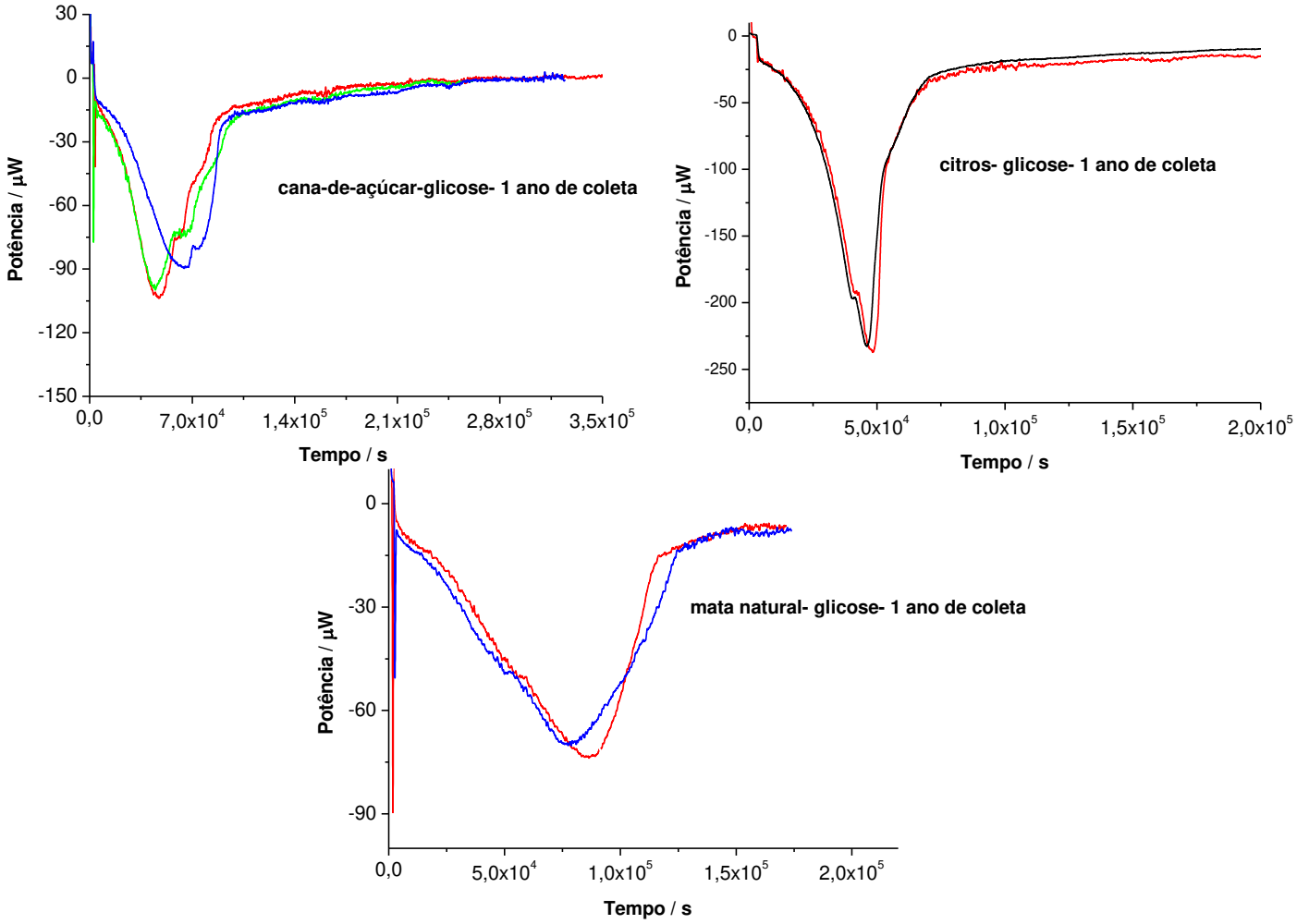

Figura 12. Curvas calorimétricas após adição de 1mg de glicose nos três tipos de solos após 1 ano de coleta.

Tabela 20- Resultados da calorimetria para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos após adição de 3 µmol de 4-clorofenol, para os solos coletados há 1 ano.

Dado	***Cana-de-açúcar***	***Citros***	***Mata natural***
η_H/%	55,6 ± 7,9	38,5 ± 1,6	36,0 ± 4,8
Q / J g^{-1}	7,0 ± 1,0	9,7 ± 0,4	10,1 ± 0,2
P_T / horas	64 ± 8	48 ± 4	35 ± 1
- $\Delta_R Hs$ / kJ mol^{-1}	1260 ± 180	1746 ± 72	1818 ± 36
k / 10^{-1} µW/min linear	3,2	1,1	1,1

Tabela 21- Resultados do balanço de massa das equações macroquímicas, para a adição de 1 miligrama de glicose aplicada aos três tipos de solos, após 1 ano de coleta e adição de 3 µmol de 4-clorofenol.

Cultivo/subst	$C_6H_{12}O_6$	O_2	NH_4^+	$CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$	CO_2	H_2O	H^+
cana-de-açúcar	0,62	2,65	0,2	1	2,70	3,10	0,2
citros	0,79	3,69	0,2	1	3,74	4,14	0,2
mata natural	0,82	3,84	0,2	1	3,89	4,29	0,2

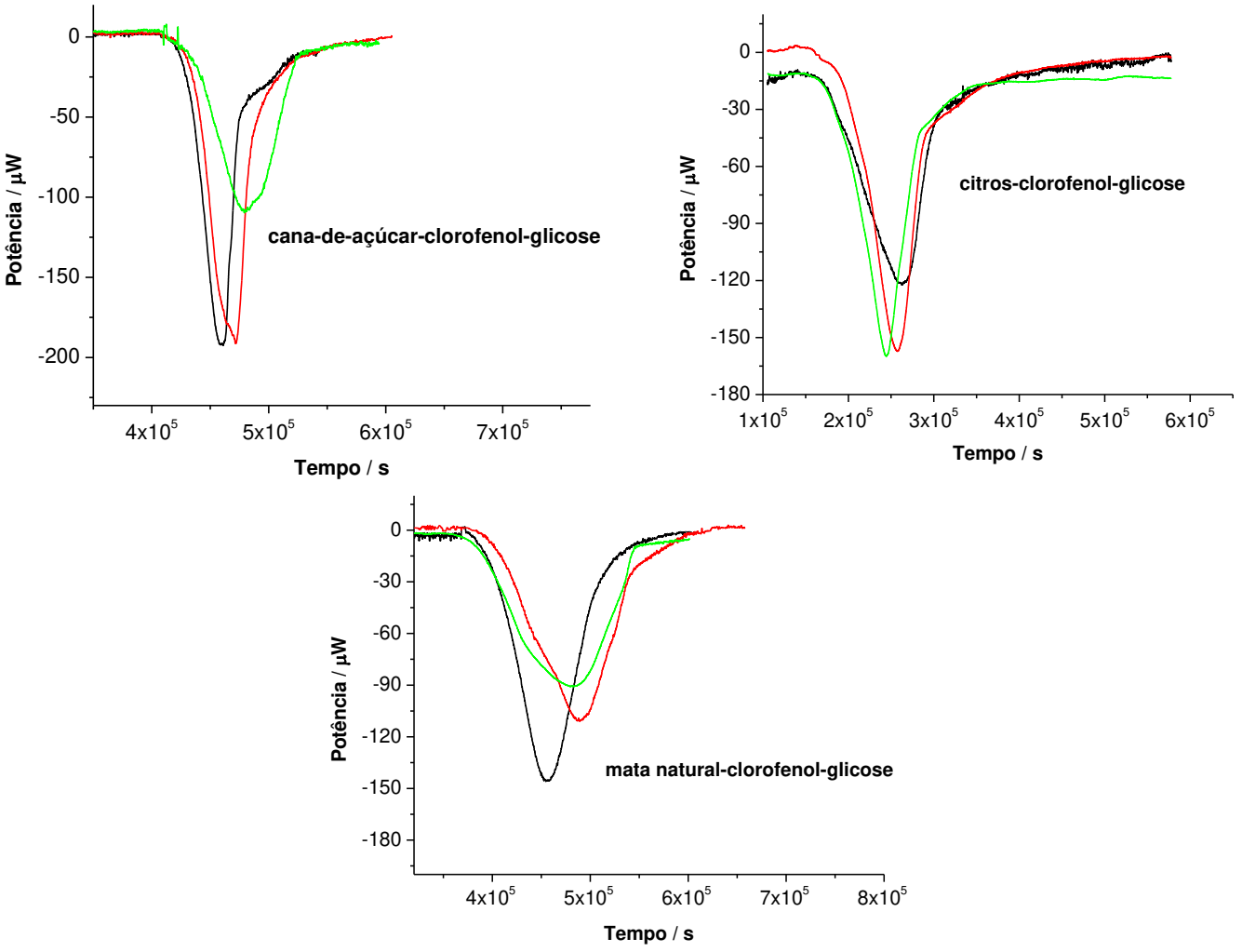

Figura 13 - Curvas calorimétricas com a adição de 1mg de glicose após adição inicial de 3 µmol de 4-clorofenol nos solos coletados há 1 ano.

Para uma maior clareza na discussão dos resultados, os mesmos foram agrupados em tabelas. Os resultados foram arredondados dentro da possível representatividade e os desvios experimentais foram omitidos.

4.7.1. Eficiência, η_H e rendimento de biomassa viva, ΔX

Os resultados do balanço de massa (η_H) e do crescimento de biomassa viva (ΔX) para as diversas condições de análise calorimétrica, encontram-se na tabela 22.

Tabela 22- Resultados de eficiência do balanço de massa (η_H) e do crescimento de biomassa viva ΔX, ambos em porcentagem**,** em porcentagem para as diversas condições experimentais.

Condição / Solo	Cana-de-açúcar	Citros	Mata natural
3 meses, η_H	63	50	64
ΔX	35	63	15
8 meses, η_H	63	60	69
ΔX	33	94	12
8 meses após fenol, η_H	59	55	58
ΔX	-	-	-
1 ano, η_H	62	59	66
ΔX	37	85	-
1 ano após clorofenol, η_H	56	39	36
ΔX	-	-	-
8 meses / fenol, η_H	77	50	71
ΔX	-	-	-

A eficiência η_H diz respeito à porcentagem mineralizada de substrato que não foi metabolizado a dióxido de carbono e água (combustão completa) e é calculada apenas com requisitos energéticos, conforme mostra equação 5,

enquanto que o crescimento de biomassa viva ΔX é calculado com requisitos cinéticos. Em princípio, os valores de ΔX só são maiores que a eficiência η_H, se os microorganismos utilizarem substratos pré existentes no meio, como aqueles avaliados pela análise de COT.

Os resultados mostram altos valores de η_H, todos acima de 50%, com exceção dos experimentos realizados após a adição do 4-clorofenol. Nessa sistemática, isso significa que mais da metade do substrato adicionado está permanecendo nesses solos de alguma forma.

Com o envelhecimento dos solos, não se observam grandes modificações nos valores de eficiência, os resultados oscilam entre 50 e 60%, sendo que o solo da mata sempre apresenta uma eficiência ligeiramente maior.

A adição de fenol não altera os valores de eficiência, dentro do desvio experimental, diferentemente do 4-clorofenol. A adição do 4-clorofenol provoca uma diminuição da eficiência η_H para os solos de citros e mata, enquanto não altera para o caso da cana-de-açúcar. ***O que estaria ocorrendo nesses casos?***

Como foi observado, não aparece efeito térmico para a adição de 4-clorofenol no período de 7 dias. Isso pode significar que os organismos presentes nesses solos não foram aptos para degradar essa substância durante esse período, ou que a degradação nesse período não liberou energia suficiente para ser detectada. No entanto, a literatura relata o uso de 4-clorofenol como biocida em aplicações domésticas, hospitalares e na atividade agropecuária. Essa mesma referência afirma que o mecanismo de degradação do 4-clorofenol envolve a ação da enzima monoxigenase, levando o 4-clorofenol a clorocatecol como primeiro intermediário e que fungos e bactérias podem cometabolizar o 4-clorofenol[56].

Dito isso, e levando-se em conta o baixo valor de η_H para os solos de citros e mata, é possível pensar que após a adição da glicose, alguns microorganismos podem ter cometabolizado as duas substâncias, 4-clorofenol e glicose. A análise aqui realizada baseia-se somente na calorimetria, uma técnica não específica. Se isso realmente ocorreu, a energia calculada envolveu a degradação das duas

substâncias, o que leva a um baixo valor de η_H, já que o mesmo foi calculado com base somente na glicose. ***E por que isso teria acontecido somente nesses dois casos?***

Os resultados da análise microbiológica (tabelas 6 e 7) revelam que o solo da citros tem um número elevado de bactérias, enquanto que o solo da mata tem um elevado número de fungos. Essa maior quantidade de microorganismos pode também corresponder a uma maior variedade. Dessa forma o cometabolismo associado a um sinergismo pode ser mais provável nesses dos casos do que no caso da cana-de-açúcar, o que poderia ser uma explicação. No entanto, não é possível afirmar isso com segurança, apenas com base nas informações levantadas nesse trabalho. Para isso seria necessário um trabalho mais específico sobre a biota do solo.

Em relação ao rendimento de biomassa viva, ΔX, a tabela 23 mostra que seus valores são sempre menores que os da eficiência, com exceção do solo da citros. O esperado é que o valor de ΔX seja sempre menor ou, no máximo, igual ao valor de η_H, uma vez que esse último reflete toda a matéria mineralizada, enquanto que ΔX representa uma parte dessa mineralização que se transforma em matéria viva (desconsiderando-se o uso de matéria orgânica previamente existente). O que ocorre no caso da citros, é que a sua adaptação ao substrato na fase de latênica não é bem definida pois a fase de crescimento é muito rápida e, praticamente, não deixa evidenciar a essa fase de latência . Assim, a aplicação da equação de Sparling (equação 3) fica comprometida, muito embora a curva calorimétrica tenha se ajustado muito bem à equação do crescimento microbiano. Um outro aspecto a considerar é o fato de que a adição de qualquer substrato pode levar os microrganismos a praticar o cometabolismo do substrato adicionado e daquele pré existente no solo.

4.7.2. Peak time, P_T.

Os resultados de “peak time” (P_T), sem as incertezas experimentais, para as diversas condições de análise calorimétrica, encontram-se na tabela 23 .

Tabela 23- Resultados de "peak time" P_T em horas, para os vários sistemas estudados.

Condição/Solo	cana-de-açúcar	citros	mata natural
3 meses	13,2	8,2	21,0
8 meses	13,5	11,0	25,8
8 meses após fenol	8,4	7,6	10,0
1 ano	15	13,1	22,8
1 ano após clorofenol	64	48	35
8 meses / fenol	70	48	72

Pela tabela 23 observa-se que o tempo para se atingir a máxima dissipação de energia, "peak time", apresenta um comportamento coerente. O solo cultivado por citros tem o menor valor $\mathbf{P_T}$, enquanto que o da cana-de-açúcar é intermediário e o da mata natural é o de maior valor, nas várias condições utilizadas.

Esse comportamento também é observado quando o experimento é realizado 8 meses e também 1 ano após a coleta dos solos. Um pequeno aumento no valor de $\mathbf{P_T}$ é observado em todas as condições, exceto para o solo de mata, após um ano da coleta. Esse comportamento geral indica o envelhecimento do solo, o que se caracteriza por uma diminuição do número de microorganismos e também na sua variedade.

Para os experimentos realizados com fenol também foi observado que o solo cultivado por citros tem o menor valor $\mathbf{P_T}$, enquanto que o da cana-de-açúcar é intermediário e o da mata é o maior, ou seja, é o que leva mais tempo para degradar o fenol, além do fato de que o fenol leva mais tempo para ser degradado do que a glicose, podendo ser até 5 vezes mais demorado após a sua adição, como no caso do solo de cana-de-açúcar.

Quando a glicose é adicionada após o fenol, novamente o tempo para sua degradação, mais uma vez, segue a mesma ordem de $\mathbf{P_T}$ observada anteriormente para os três tipos de solo. Outro aspecto relevante é o fato de que o tempo para degradação da glicose ($\mathbf{P_T}$) após a adição do fenol é ligeiramente menor do que quando se adiciona apenas glicose, chegando a ser até 2,5 vezes

menor como no caso do solo de mata. ***Seria novamente um possível cometabolismo da glicose com o fenol restante ou simplesmente um aumento do número de microorganismos após a adição de fenol?***

Quando a glicose é adicionada após o 4-clorofenol, observa-se que a atividade microbiana leva mais tempo para se iniciar. O valor de $\mathbf{P_T}$ tornou-se maior para o solo de cana-de-açúcar e menor para o de mata natural.

Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que o solo de citros apresentou o maior número de bactérias quando comparado com outros dois tipos de solo estudados. A literatura mostra que as bactérias quando comparadas com os demais microorganismos do solo possuem capacidade de crescer rapidamente e decompor uma grande variedade de substratos[57, 58].

4.7.3. Rendimento térmico, $Y_{Q/X}$.

O rendimento térmico é uma relação entre a quantidade de energia liberada, ***Q***, e a variação da biomassa, ΔX (em mol). Essa grandeza é uma indicação de como o substrato está sendo incorporado como biomassa no solo. Quanto maior for esse valor, menos matéria está sendo incorporada ao solo. Assim, substratos incorporados em quantidades reduzidas, maiores valores de $Y_{Q/X}$.

Tabela 24- Resultados de rendimento térmico, $Y_{Q/X}$, em kJ mol^{-1} de X, para os vários sistemas estudados .

Condição/Solo	cana-de-açúcar	citros	mata natural
3 meses	375	304	935
8 meses	432	164	1004
1 ano	398	185	-

Da mesma forma que o peak time, $\mathbf{P_T}$, o valor de $Y_{Q/X}$ obedece a ordem mata>cana-de-açúcar>citros. Isso significa que no solo de mata a biomassa está sendo estocada em menor quantidade ou em num estado mais oxidado. Ao longo

do tempo houve mudanças de $Y_{Q/X}$ mas não vale a pena tecer maiores comentários, já que foram poucos valores obtidos.

Com a adição de fenol e 4-clorofenol, não foi possível calcular valores de $Y_{Q/X}$ pois as curvas não evidenciaram patamares da fase de latência, além disso a aplicação da equação de Sparling subentende uma curva de crescimento exponencial, no entanto, o que se observou, foram curvas que se ajustaram a um variação linear da potência versus tempo.

4.7.4. Valores de $\Delta_R H_S$ - energia dissipada por mol de glicose.

A tabela 25 traz os valores de energia dissipada por mol de glicose para os diversos sistemas. Nessa tabela as incertezas não são apresentadas para melhor clareza na discussão.

Tabela 25- Resultados de $-\Delta_R Hs$ em kJ mol^{-1}, para os vários sistemas estudados.

Condição/Solo	cana-de-açúcar	citros	mata natural
3 meses	1044	1404	1026
8 meses	1044	1134	882
8 meses após fenol	1152	1278	1188
1 ano	1080	1152	972
1 ano após 4-clorofenol	1260	1746	1818

Comparando-se somente os valores de $\Delta_R H_S$, é observado, de um modo geral, que o solo de citros libera uma quantidade maior de energia quando comparado ao da cana-de-açúcar e ao da mata, o que evidencia uma conservação menor do substrato na forma de biomassa. O solo da cana-de-açúcar tem um valor intermediário e o solo da mata natural tem o menor valor. Quando são comparados os valores obtidos apenas na adição de glicose em função do tempo os valores de $\Delta_R H_S$ não mostram um comportamento definido. No caso da

cana-de-açúcar, por exemplo, os valores ficam bem constantes, enquanto os de citros tendem a uma pequena diminuição.

Após a adição do fenol, no entanto, os valores são maiores, e esta tendência pode refletir um aumento da população microbiana pelo consumo anterior do fenol.

Os valores de $\Delta_R H_S$ para o metabolismo da glicose após a adição do 4-clorofenol também se tornam maiores, e nesse caso, um aumento maior que no caso do fenol. É interessante notar que nem todos os organismos têm a capacidade de metabolizar o 4-clorofenol, inclusive isso não é, sequer verificado pela calorimetria no período de 10 dias de adição. No entanto, a literatura indica a degradação do 4-clorofenol pode ocorrer para certos organismos em um tempo de meia vida superior a 100 dias. Além disso, no caso dessa substância, inicialmente a reação de degradação ocorre pela saída do cloro do anel, um processo que envolve pequena energia. No entanto, a presença posterior de glicose poderia induzir o cometabolismo desses dois substratos, o que poderia esse aumento de energia metabólica. Resta concluir, pelos resultados aqui obtidos, que a adição de fenol e 4-clorofenol, por algum motivo pode ter levado a uma maior emissão de CO_2 quando se comparam os experimentos onde não se adicionaram essas substâncias com aqueles onde essa adição ocorreu. ***Seria apenas um estresse da população microbiana? Um cometabolismo? Um aumento de população? Ou uma modificação qualitativa da população microbiana?***

4.7.5. Constante da velocidade de crescimento, k.

A tabela 26 traz os valores das constantes de velocidade de crescimento microbiano, k, para alguns dos sistemas estudados.

Tabela 26- Resultados de **k / 10^{-3} min^{-1}**, para os vários sistemas estudados.

Condição/Solo	cana-de-açúcar	citros	mata natural
3 meses	2,10	3,00	1,08
8 meses	2,60	3,46	1,08
1 ano	3,10	4,30	-

O valor de **k** é maior para o solo de citros, menor para o solo da mata natural e intermediário para o solo da cana-de-açúcar, independentemente do período que passou entre a coleta do solo e o experimento. Esses resultados refletem, em parte, a alta população bacteriana do solo de citros em relação aos outros dois solos. O solo de mata tem a maior população de fungos que, sabidamente, são apresentam uma velocidade de crescimento menor.

Um aspecto relevante a comentar é o fato de que o solo de mata apresenta uma incerteza maior no resultado da constante de velocidade de crescimento, provavelmente devido a alta população de fungos, deve apresentar uma curva de crescimento que se sobrepõe, em termos temporais e significativos para a curva do registro calorimétrico, em que se efetuam as avaliações de k. Isso é, de tal forma, significativo que, em determinadas situações, o ajuste linear da curva para a obtenção dos valores de velocidade de crescimento, dá melhor resultado que o ajuste exponencial.

Para o metabolismo de fenol o melhor ajuste se faz pela linearização, o mesmo é valido para a adição de glicose após o fenol. Nesse último caso, inclusive, o crescimento microbiano é acelerado, além do fato de que ele se inicia muito mais rapidamente que aquele onde ocorreu a adição simples de glicose.

Para o metabolismo de glicose, após a adição do 4-clorofenol, observa-se que a degradação pode ser retardada, mas, uma vez iniciada ela ocorre em tempos aproximados, mesmo considerando-se que o efeito térmico é muito maior após a adição de 4-clorofenol, conforme mostra a figura 14.

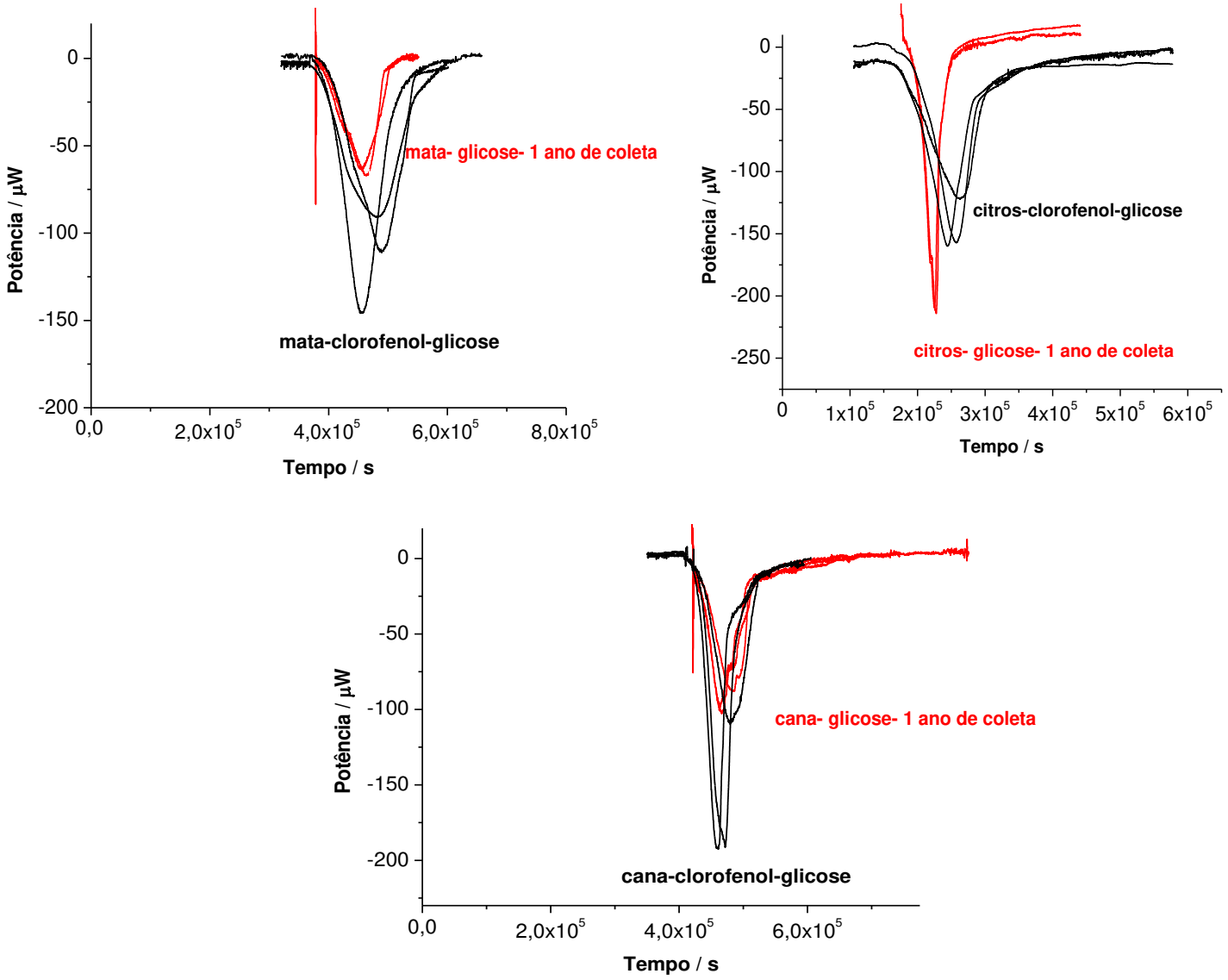

Figura 14 - Curvas calorimétricas ilustrativas da degradação microbiana de 1mg de glicose antes e após adição inicial de 3 µmol de 4-clorofenol nos solos coletados há 1 ano.

5. Conclusões

- Através dos parâmetros obtidos nas analises realizadas foi possível observar uma correlação entre a atividade microbiana e os manejos empregados no latossolo vermelho aqui estudado.
- As análises elementares revelam que o solo de mata natural tem uma porcentagem de carbono igual ao solo de cana-de-açúcar e bem maior que o solo de citros. Além disso, as análises de carbono orgânico total, COT, mostram que o solo de mata natural apresenta um teor de 4,94% contra cerca de 2,40% para os outros dois solos. Isso pode significar que o carbono orgânico da mata está num estado muito mais reduzido que as dos outros solos, provavelmente pelo elevado e freqüente aporte de matéria orgânica desse solo.
- A análise microbiológica mostra que o solo de citros apresenta um maior número de bactérias, o que se reflete numa velocidade de crescimento maior e um consumo mais rápido do substrato (glicose), quando comparado aos outros solos.
- O solo de mata natural apresenta um maior número de fungos, que têm uma velocidade de crescimento mais lenta e que se reflete num maior tempo de degradação do substrato.
- Os resultados mostram altos valores de eficiência, η_H, acima de 50%, com exceção dos experimentos realizados após a adição do 4-clorofenol, para todos os solos. Ao longo do tempo de estocagem do solo, não se observam grandes modificações nos valores de eficiência, sendo que os mesmos oscilam entre 50 e 60%, sendo que o solo de citros apresenta, sempre, uma eficiência ligeiramente menor. Isso significa que mais CO_2 é liberado no ambiente por esse solo, nas condições dos experimentos.
- A adição de um xenobiótico, no caso do fenol, não altera os valores da eficiência, η_H, mas provoca um aumento da velocidade de crescimento microbiano e consequentemente diminui o valor do “peak time”. Diferentemente, a adição do 4-clorofenol provoca uma diminuição da

eficiência, η_H, para os solos de citros e mata natural, enquanto não altera para o caso da cana-de-açúcar.

- Os resultados mostram que o tempo para se atingir à máxima dissipação de energia, "peak time" ou término da fase de crescimento exponencial, apresenta um comportamento coerente com a análise microbiológica. O valor $\mathbf{P_T}$, citros<cana-de-açúcar<mata natural, nas várias condições utilizadas.
- A adição de fenol provoca uma diminuição do "peak time" para todos os solos, cerca de metade do valor, mas essa influência é mais pronunciada para o solo de mata.
- A adição do 4-clorofenol aumenta em cerca de 4 vezes os valores de "peak time" para citros e cana-de-açúcar, mas tem uma influência menor no caso da mata natural, não chegando a duplicar o valor de P_T. Isso significa que essa substância tem uma influência muito menor para fungos.
- Da mesma forma que o peak time, $\mathbf{P_T}$, o valor do rendimento térmico, $\boldsymbol{Y_{Q/X}}$, obedece a ordem: **mata natural>cana-de-açúcar>citros**. Isso significa que no solo de mata a biomassa foi estocada em menor quantidade ou está num estado mais oxidado.
- Os valores de energia dissipada por mol de glicose adicionada, $\Delta_R \boldsymbol{H_S}$, de modo geral, obedecem a ordem: **citros>cana-de-açúcar>mata natural**. Após a adição do fenol, no entanto, os valores de $\Delta_R \boldsymbol{H_S}$ são maiores, e essa tendência parece refletir um aumento da população microbiana pelo consumo anterior do fenol.
- Os valores de $\Delta_R \boldsymbol{H_S}$ para o metabolismo da glicose após a adição do 4-clorofenol também se tornam maiores, e nesse caso, um aumento relativo é maior que no caso do fenol. O aumento relativo de $\Delta_R \boldsymbol{H_S}$ para o solo de mata natural é o maior de todos para a adição do 4-clorofenol.

6. Referências

1- Jacintha, P. A. Lal, R., *Land Degrad. Dev*. 12 (2001) 329-339.

2- Groffman, P. M. Mc Dowell, W. H., Myers, J.C., Merrian, J.,L.; *Soil Biol. Biochem*. 33 (2001) 1339-1348.

3- Sahani, U., Behera, N., *Land Degrad. Dev*. 12 (2001) 93-105.

4- Hilleman, B.; *Chem. Eng. News*. 1992, April 27.

5- M.A. Arshad, S. Martin*. Agriculture, ecosystems and environment* 88 (2002) 153-160.

6- Bollag, J. M.; Minard, R. D.; *Sci. Total Environ*. 205 (1992) 123-124.

7- Lory, S., Perry, J., J., Staley, J., T.; *Microbial Life, Sinauer Associates, Inc*., 2ª. edição.

8- Belaich, J., P.; *Biological Microcalorimetry*, Academic Press, London, 1980.

9- Sparling, G., P., *Soil Biol. Biochem.*, 13 (1981) 93.

10- Airoldi, C., Barros, N., Critter, S., A., M., Feijóo, S., Simoni, J., A., J. *Therm. Anal. Cal.*, 63 (2001) 577.

11- Reh, U.; *Thermochim. Acta* 1991, 193, 107.

12- Drong, K.; Lamprecht, I.; *Pure Appl. Chem.* 1993, 65, 1967.

13- Lamprecht, I.; Motzkus, C; Schaarschmidt.; B; Coenen-Stass, D.; *Termochim. Acta* 1990, 172, 87.

14- Becker, M.; Kraepelin, G.; Lamprecht, I.; *Thermochim. Acta* (1991) 187,15.

15- Drong, K.; Lmprecht, I.; Motzkus, C.; Schaarschmitdt, B.; *Thermochim. Acta* (1991) 193, 125.

16- Airoldi, C. *Química Nova*, 21(5) (1998) 635-641.

17- Rong XM, Huang QY, Jiang DH, Cai P & Liang W. *Pedosphere* 17: (2007) 137–145.

18- Braissant, O., Daniels, A. U., Göpfert, B., Wirz, D. *FEMS Microbiol Lett* 303 (2010) 1-8.

19- Barros, N., Feijóo, S., Salgado J.; *Thermochimica Acta.* 458 (2007) 11-17.

20- Barros, N, Gallego, M., Feijóo, S., *Thermochimica Acta.* 458 (2007) 18-22.

21- U. Mortesem, B. Norén, I. Wadsö, Bull. *Ecol. Res. Commum*. 17 (1973) 189-197.

22- P. N. Coody, L. E. Sommers, D. W Nelson, *Soil Biol. Biochem*. 18 (1986). 283-289.

23- G. P. Sparling, B. G. Ord, D. Vaugahm, *Soil Biol. Biochem*. 13 (1981) 99-104.

24- J. P. E. Anderson, K. H. Domsch, *Soil Biol. Biochem*. 10 (1978) 215-221.

25- L. Nuñez, I. Barja, *Themochim. Acta* 303 (1997) 155-159.

26- G. P. Sparling, *Soil. Biochem*. 13 (1981) 93-98.

27- G. P. Sparling, *Soil. Biochem*. 13 (1981) 373-376.

28- Marsh, K. N.; O'Hare, P. A. G.; *Solution Calorimetry*. Blackwell, London, 1994.

29- Ljunghlom, K., Norém, B., Sköld, Wadsö, *Oikos*, 33 (1979) 24.

30- Núñez-Fernández, O., Núñez-Regueira, L., Proupín-Castiñeiras, J., Rodríguez-Añón, J. A., J*.; Therm. Anal. Cal.*, 80 (2005) 35.

31- Barros, N., Feijoó, S., Simoni, J., Prado, A., Barboza, F., Airoldi, C. *Thermochimica Acta*. 328 (1999) 99-103.

32- Barros, N., Airoldi, C., Simoni, J., Ramajo, B., Espina, A., García, J. *Thermochimica Acta*. 441 (2006) 89-95.

33- Yao, J., Tian, L., Wang, Y., Djah, A., Wang, F., Chen, H., Su, C., Zhuang, R., Zhou, Y., Choi, M., Bramanti, E. *Ecotoxicology and Enviromental Safety*. 69 (2008) 289-295.

34- Demoling, A., Baath, Erland. *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 334-340.

35- Solomons, G. T. W., Fryhle, C. B. *Oganic Chemistry*. Eighth Edition.2003.

36- Horch, R., Spilker, G., and Stark, G.B. *Phenol burns and intoxications*. 1994. 45- 50.

37- Pedrosa, V. A., Codognoto, L., Avaca, L. A. *Química Nova.* 26. (2003). 844-849.

38- Merriman, J. C.; Anthony, D. H. J.; Kraft, J. A.; Wilkinson, R. J.; *Chemosphere* (1991), *23*, 1605.

39- Kristiansen, N.; Froshaug, M.; Aune, K.; Becher, G.; *Environ. Sci. Technol*. 28 (1994) 1669.

40- Rogers, K.; Gerlach, C.; *Environ. Sci. Technol*. 30 (1996) 486A.

41- US. Environmental Protection Agency, *Toxic Substance Control Act.* 1976.

42- Almeida, E.; Assalin, M. R.; Rosa, M. A; Duran, N. *Quim. Nova,* Vol. 27, No. 5, (2004) 818-824.

43- Topp, G. C. *Soil Sampling and methods of Analysis Edited* by Martin R. Carter for Cana-de-açúcardian Society of soil Sciencie; 141-143.

44- Miller, R. H.; *Methods of Soil Analysis, Part 2 – Chemical and Microbiological Properties*, Soil Science Society of America, Madison, 1982.

45- Sparling, G.P., J. *Soil Sci*. (1983) 381-390.

46- Battley, E. H., *The thermodynamics of microbial growth, in Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 4, From Macromolecules to Man, Kemp, R.B., Elsevier, (1999) 219-266.

47- Duboc, P., Marison, I. , Von Stockar, U. , *Quantitative Calorimetry and Biochemistry Engeneering, in Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 4, *From Macromolecules to Man*, Kemp, R.B., Elsevier, (1999) 267-364.

48- Von Stockar, U., Gustafsson, L., Larsson, C., Marison, I., Tissot, P., Gnaiger, E., *Biochim. Biophys. Acta* 1183 (1993) 221-240.

49- Chagas, A. P; *Termidinâmica Química*. Editora da Unicamp, 1999.

50- Moreira, F.; Siqueira, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo***.** Editora UFLA, 2002. 623 p.

51- Cruz, J. I., Souza, R., P., Lucendo, M. C. H., Elis,V. R., Fachin, F. J. S., Ustra, A. T., Borges, W. R.; *Brazilian Journal of Geophysics*, Vol. 26(4), (2008).

52- CERRI, C.C. *Dinâmica da matéria orgânica do solo no agroecossistema cana-de-açúcar-de-açúcar*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1986. 197p. (Tese de Livre Docência)

53- LIMA, J.M.J.C. *Alterações de propriedades de solos cultivados com cana-de-açúcar-de-açúcar*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1995. 173p. (Tese de Doutorado)

54- A. C. SANCHES(2), A. P. SILVA(3), C. A.TORMENA(4) & A. T. RIGOLIN(5)R. *Bras. Ci. Solo*, 23:91-99, 1999.

55- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H., Zheng. A., *Fuel 86* (2007) 1781–1788.

56- Jim A. Field and Reyes Sierra-Alvarez, Rev *Environ Sci Biotechnol* (2008) 7: 211–241.

57- Alexander, Martin. *Introduction to Soil Microbiology*. Second Edtion (1977).

58- Hattori, Tsutomu. *Microbial Life in soil-An Introduction*. Edited by Marcel Dekker, Inc. New York (1973).