

## TERMO DE REFERÊNCIA

### **MONITORAMENTO DO SOLO REFERENTE A INTERVENÇÕES E IMPACTOS COM CARACTERÍSTICAS PREDOMINANTEMENTE PROVENIENTES DE EFLUENTE SANITÁRIO**

#### **1. INTRODUÇÃO:**

O solo é um componente específico e essencial para a vida de um ecossistema, sendo produto de alteração do remanejamento e da organização do material original (rocha, sedimento ou outro solo) sob a ação de organismos vivos, tempo, clima e relevo.

O aumento de ações antrópicas que visam ao desenvolvimento socioeconômico, demandas industriais, agrícolas, de expansão e de crescimento demográfico em áreas urbanas acabam provocando alterações ao ambiente natural, podendo ocorrer contaminação do solo através de substâncias químicas provenientes de efluentes, dentre eles, o sanitário.

Os efluentes são classificados em dois principais grupos: sanitário (efluente cloacal) e industrial. O sanitário é formado por efluente doméstico ou domiciliar, proveniente principalmente de residências, edifícios comerciais, instituições ou quaisquer edificações que contenham banheiros, lavanderias, cozinhas, ou qualquer dispositivo de utilização de água para fins domésticos. É composto essencialmente da água de banho, urina, fezes, papel, resto de comida, cosméticos, sabão, detergentes, água de lavagem e uma parcela de águas pluviais e águas de infiltração.

#### **2. JUSTIFICATIVA:**

Diante da Resolução CONAMA n° 420/2009, a qual dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas, pode-se observar a importância de se realizar um monitoramento no solo, de maneira a prever alterações prejudiciais que possam resultar em perda de sua funcionalidade, tornando possível, desta forma, minimizá-las.

Ainda, em seu Art. 3°, a Resolução estabelece que “A proteção do solo deve ser realizada de maneira **preventiva**, a fim de garantir a manutenção da sua funcionalidade ou, de maneira **corretiva**, visando a restaurar sua qualidade ou recuperá-la de forma compatível com os usos previstos”.

#### **3. OBJETIVO:**

Monitorar a qualidade do solo, através de análises físico-químicas, microbiológicas e ecotoxicológicas, visando à proteção preventiva e/ou corretiva do mesmo, quando couber.

#### **4. PREVENÇÃO E CONTROLE DA QUALIDADE DO SOLO:**

Com vista à prevenção e ao controle da qualidade do solo, os empreendimentos que desenvolverem atividades com potencial de contaminação dos solos devido à geração de efluente sanitário deverão, a critério do



CIDADE  
HISTÓRICA  
RIO GRANDE  
PATRIMÔNIO DO  
RIO GRANDE DO SUL

ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL  
PREFEITURA MUNICIPAL DO RIO GRANDE  
SECRETARIA DE MUNICÍPIO DO MEIO AMBIENTE  
UNIDADE DE LICENCIAMENTO E FISCALIZAÇÃO AMBIENTAL



órgão ambiental competente:

- I – implantar programa de monitoramento da qualidade do solo na área do empreendimento;
- II – apresentar relatório técnico conclusivo sobre a qualidade do solo a cada solicitação de renovação de licença, bem como quando do encerramento das atividades.

**4.1 Quanto às amostragens, à análise e ao controle de qualidade para caracterização e monitoramento do solo, o empreendedor deverá:**

- I – contratar laboratório competente ou profissional habilitado à emissão de Anotação de Responsabilidade Técnica (ART) para realizar as coletas de amostras para determinações físico-químicas, microbiológicas e ecotoxicológicas, conforme Anexo I;
- II – atentar para adoção de procedimentos de coleta, manuseio, preservação, acondicionamento e transporte de amostras de acordo com normas nacionais e internacionais vigentes, respeitando-se os prazos de validade das amostras;
- III – promover a realização de análises físico-químicas, microbiológicas e ecotoxicológicas utilizando-se de metodologias que atendam às especificações descritas em normas vigentes reconhecidas internacionalmente.

**4.2 Quanto aos resultados das determinações, estes devem ser reportados em laudos analíticos e conclusivos, a ser emitido por laboratório acreditado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO, contendo:**

- I – local da amostragem, data e horário da coleta e da entrada da amostra no laboratório;
- II – indicação do método utilizado em cada análise e para cada parâmetro analisado;
- III – LQAs (Limite de Quantificação da Amostra) para cada parâmetro analisado;
- IV – resultados dos brancos do método, quando for o caso;
- V – os ensaios de adição e recuperação dos analitos na matriz, quando for o caso.

Quando necessário, o órgão ambiental competente poderá solicitar complementação de documentos, tais como: cartas-controle, cromatogramas, resultados obtidos em ensaios de proficiência e em material de referência certificado.

**5. QUANTO ÀS ANÁLISES:**

**5.1 Análises físico-químicas:**

- I – Capacidade de Campo;
- II – Granulometria;
- III – CTC (Capacidade de Troca de Cátions);
- IV – Acidez;



CIDADE  
HISTÓRICA  
RIO GRANDE  
PATRIMÔNIO DO  
RIO GRANDE DO SUL

ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL  
PREFEITURA MUNICIPAL DO RIO GRANDE  
SECRETARIA DE MUNICÍPIO DO MEIO AMBIENTE  
UNIDADE DE LICENCIAMENTO E FISCALIZAÇÃO AMBIENTAL



- V – Metais (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, Se e Zn);
- VI – pH;
- VII – Carbono Orgânico;
- VIII – Percentagem de Saturação com Alumínio; e
- IX – Ferro, Alumínio, Manganês e Sílica.

**5.2 Análises microbiológicas:**

- I – Coliformes totais, fecais e termotolerantes;
- II – Biomassa microbiana;
- III – Atividade enzimática total;
- IV – Respiração do solo;
- V – Mineração de nutrientes (N, P e S); e
- VI – Fixação biológica do N<sub>2</sub>.

**5.3 Testes de Genotoxicidade:**

- I – Ensaio de mutação reversa Salmonella/microsoma ou teste de Ames.

**5.4 Ensaios Ecotoxicológicos, conforme Anexo I:**

- I – Restrição ao solo;
- II – Teste de Fuga (Comportamental);
- III – Toxicidade aguda e crônica com *Oligoqueta (Eiseniaandrei)*; e
- IV – Fitotoxicidade.

## ANEXO I

### ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS PARA MONITORAMENTO DO SOLO

#### 1. TÉCNICA PARA CULTIVO *Eisenia andrei* e *Eisenia Fetida*

O meio de cultivo recomendado é uma mistura de um volume de estrume de cavalo ou gado e um volume de turfa ou pó de casca de coco. Recomenda-se que o meio tenha um valor de pH entre 6 a 7 (ajustado com carbonato de cálcio), uma baixa condutividade iônica (menor que 6 mg/kg de massa seca de solo ou menor que 0,5 da concentração de sal comum), e não pode estar excessivamente contaminado com amônia ou urina animal. O substrato deve ser mantido úmido, mas não molhado (quando o solo é suavemente apertado com a mão, convém que somente pequenas gotas d'água apareçam entre os dedos). As caixas para cultivo devem ter capacidade de 10 L a 50 L. O cultivo é preferencialmente realizado dentro de uma câmara ambiental ou área cercada a  $(20 \pm 2)$  °C. A essa temperatura as minhocas tornam-se maduras depois de dois a três meses.

#### 2. RESTRIÇÃO DE SOLO:

##### 2.1 SUBSTRATO-TESTE

O amostra de solo a ser ensaiado deve ser peneirado em malha de 2 mm e ajustado por aproximadamente 60% de capacidade máxima de retenção de água.

##### 2.2 SOLO-CONTROLE

O solo-controle utilizado deve ser similar ao solo-teste em todas as características, exceto na presença de contaminantes. Deve ser peneirado em malha de 2 mm e ajustado por aproximadamente 60% da capacidade máxima de retenção de água.

##### 2.3 RECIPIENTE-TESTE

Os recipientes-teste podem ser constituídos de vidro ou de plástico e devem ter capacidade de aproximadamente 200 mL permitindo a troca gasosa entre o meio e a atmosfera, não sendo necessária a utilização de tampas.

##### 2.4 PROCEDIMENTO

O teste deve ser realizado utilizando dez réplicas para cada solo-teste e solo-controle. Deve-se preencher até a metade dos recipientes-teste com os solos a serem analisados, em seguida coloca-se um organismo (*Eisenia Andrei* ou *Eisenia Fetida*) por réplica. O tempo de exposição é de duas horas, verificando após o termino se a minhoca preferiu adentrar o solo ou fugir (ficando superfície do solo). O teste deverá ser realizado em um local com a temperatura ambiente de  $20 \pm 2$ °C.

##### 2.5 RESULTADOS

Deve-se determinar a média, mais ou menos o desvio-padrão dos organismos vivos no solo-teste para cada tratamento ao final do ensaio. Os resultados são apresentados com a média de indivíduos que adentrou o solo e fugiu do solo, podendo ser aplicados cálculos estatísticos quando necessário.

### **3. ENSAIO DE FUGA:**

#### **3.1 SUBSTRATO-TESTE**

O solo a ser ensaiado deve ser peneirado em malha de 2 mm e ajustado por aproximadamente 60% de capacidade máxima de retenção de água.

#### **3.2 SOLO-CONTROLE**

O solo-controle utilizado deve ser similar ao solo-teste em todas as características, exceto na presença de contaminantes. Deve ser peneirado em malha de 2 mm e ajustado por aproximadamente 60% da capacidade máxima de retenção de água.

#### **3.3 RECIPIENTE-TESTE (CÂMARA DE DUAS SEÇÕES)**

Os recipientes-teste devem ter capacidade para 1 L a 2 L, com área de 0,02 m<sup>2</sup>, que permita a adição de uma camada de 50 mm a 60 mm de solo. Os recipientes devem permitir a troca gasosa entre o meio e a atmosfera, bem como acesso da luz, além devem prevenir também o escape das minhocas.

#### **3.4 ORGANISMOS-TESTE**

Os organismos-teste devem ter idade superior a dois meses, apresentar clitelo e possuir massa individual entre 300 mg e 600 mg. As minhocas devem ser selecionadas e aclimatadas previamente por 24 h no solo-controle.

#### **3.5 PROCEDIMENTO**

Os recipientes-teste devem ser divididos em duas seções iguais por meio de um divisor introduzido verticalmente. Os recipientes-teste são preenchidos com solo peneirado até uma altura de 50 mm a 60 mm. Uma das metades do recipiente-teste é preenchida com o solo-teste e a outra metade é preenchida com solo-controle. Depois o separador é removido e 10 minhocas são colocadas na linha de separação de cada recipiente. Os recipientes são cobertos e colocados na sala ou câmara de incubação, que deve ser mantida a 20 ± 2°C.

Durante o ensaio os organismos não podem ser alimentados e deverá ser realizado com cinco replicatas por tratamento.

Ao final do período do ensaio (48 h) o solo-controle e o solo-teste em cada recipiente-teste são separados pela inserção dos divisores. O número de minhocas é determinado para ambas as seções dos recipientes-teste. As minhocas divididas, devido à inserção dos divisores, são contadas como 0,5 independentemente do comprimento do restante do corpo. Tanto as minhocas que escaparem do recipiente-teste, quanto as que morrerem e se desintegrarem durante o ensaio, são consideradas perdidas.

#### **3.6 RESULTADOS**

A média mais ou menos o desvio-padrão dos organismos vivos no solo-teste é determinada para cada tratamento ao final do ensaio. Os resultados são apresentados como o número de indivíduos no solo-teste por recipiente-teste. Se o solo-teste e o solo-controle diferirem somente em relação à contaminação, cálculos estatísticos podem ser realizados conforme a Norma Brasileira ABNT NBR ISSO 17512-1.

Se uma atração de > 80 % pelo solo-teste for observada, a presença de substâncias químicas não pode ser descartada. Os resultados devem ser avaliados como um efeito.

O ensaio é invalidado se o número de minhocas mortas ou perdidas for > 10% por tratamento. Em média

a proporção de minhocas deve estar em cada compartimento entre a faixa de 60% : 40%.

#### **4. TOXICIDADE AGUDA (Eisenia Andrei ou *Eisenia Fetida*):**

##### **4.1 SOLOS-TESTE**

Os solos-teste devem ser peneirados em malha de 2 mm e estar na temperatura do ensaio ( $25\text{ °C} \pm 2\text{°C}$ ), no momento da transferência dos organismos. Deve-se ajustar a umidade final entre 40 % e 60 % da capacidade máxima de retenção de água.

##### **4.2 SOLOS-CONTROLE**

O solo-controle deve ser seco naturalmente em local sombreado, peneirado em malha de 2 mm e em seguida exposto a dois ciclos de congelamento de 48 h, seguidos por igual período em temperatura ambiente para eliminação de casulos de minhocas e outros invertebrados. Deve-se ajustar a umidade final entre 40 % e 60 % da capacidade máxima de retenção de água.

##### **4.3 ORGANISMOS-TESTE**

Os organismos-teste devem ter idade superior a dois meses, apresentar clitelo e possuir massa individual entre 300 mg e 600 mg. Os organismos-teste devem pertencer a lotes homogêneos e estar aclimatados no solo-controle durante 24 h antes de sua utilização no ensaio.

##### **4.4 RECIPIENTE-TESTE**

Os recipientes a serem utilizados devem comportar 500 g de substrato, podendo ser de plástico. São necessárias tampas perfuradas para que possam ocorrer trocas gasosas entre o meio e a atmosfera e evitar que os organismos fujam do recipiente.

##### **4.5 PROCEDIMENTO**

Para cada solo-teste e controle deve-se realizar no mínimo quatro réplicas, com aproximadamente 500 g de massa de solo seca em cada recipiente de modo a obter uma camada entre 5 cm e 6 cm. Em cada réplica devem ser adicionados sobre o solo no mínimo 10 organismos-teste previamente aclimatados. Em seguida os recipientes devem ser cobertos com tampa perfurada para evitar o ressecamento do solo e permitir trocas gasosas.

O ensaio deve ser conduzido sem alimentação dos organismos-teste. Sendo mantido em temperatura de  $25\text{°C} \pm 2\text{°C}$ , com fotoperíodo de 12 h. A letalidade deve ser registrada no 7º dia e no final do ensaio.

A letalidade é avaliada pela transferência do solo-teste do recipiente-teste para uma bandeja, seguida de segregação dos organismos-teste e aplicação de estímulo mecânico, na parte anterior do corpo, com o auxílio de uma pinça ou agulha. Os organismos-teste são considerados mortos quando não apresentarem qualquer reação ao estímulo mecânico. O organismo-teste morto deve ser removido do ensaio. Após o registro da letalidade do 7º dia, os organismos-teste vivos e o solo-teste devem ser recolocados nos recipientes-teste de origem, e assim mantidos até o final do ensaio (14 dias).

##### **4.5 RESULTADOS**

Os resultados devem ser expressos em CL50 – 14 dias, ou de forma qualitativa (tóxico ou não tóxico), sendo expresso em miligramas por quilograma de solo seco. Ao final do ensaio se não houver diferença

significativa na letalidade em relação ao controle, os resultados devem ser expressos como “não tóxico”. Se houver diferença significativa, o resultado deve ser expresso como “tóxico”.

Os resultados são considerados válidos se, ao término do período de ensaio, a letalidade dos organismos-teste no controle for menor ou igual a 10%.

## **5. TOXICIDADE CRÔNICA (Eisenia Andrei ou *Eisenia Fetida*):**

### **5.1 SOLOS-TESTE**

Os solos-teste devem ser peneirados em malha de 2 mm e estar na temperatura do ensaio ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), no momento da transferência dos organismos. Deve-se ajustar a umidade final entre 40 % e 60 % da capacidade máxima de retenção de água.

### **5.2 SOLOS-CONTROLE**

O solo natural deve ser seco naturalmente em local sombreado, peneirado em malha de 2 mm e em seguida exposto a dois ciclos de congelamento de 48 h, seguidos por igual período em temperatura ambiente para eliminação de casulos de minhocas e outros invertebrados. Deve-se ajustar a umidade final entre 40 % e 60 % da capacidade máxima de retenção de água.

### **5.3 ORGANISTOS-TESTE**

Os organismos-teste devem ter idade superior a dois meses, apresentar clitelo e possuir massa individual entre 300 mg e 600 mg. Os organismos-teste devem pertencer a lotes homogêneos e estar aclimatados ao solo-controle durante 24 h antes de sua utilização no ensaio.

### **5.4 RECIPIENTE-TESTE**

Os recipientes a serem utilizados devem comportar 500 g de substrato, podendo ser de plástico. São necessárias tampas perfuradas para que possam ocorrer trocas gasosas entre o meio e a atmosfera e evitar que os organismos fujam do recipiente.

### **5.5 PROCEDIMENTO**

Para cada solo-teste e solo-controle deve-se realizar no mínimo quatro réplicas, com aproximadamente 500 g de massa de solo seca em cada recipiente de modo a obter uma camada entre 5 cm e 6 cm. Em cada réplica devem ser adicionados sobre o solo no mínimo 10 organismos-teste previamente aclimatados. Em seguida os recipientes devem ser cobertos com tampa perfurada para evitar o ressecamento do solo e permitir trocas gasosas. O teste deve ser mantido em local com a temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 h.

A cada semana deve-se adicionar em cada recipiente 5 g de esterco bovino seco e triturado, que servirá de alimento para os organismos. Devem-se pesar os recipientes semanalmente e adicionar água em quantidade correspondente à diferença encontrada.

Após 28 dias do início do teste, os indivíduos adultos devem ser retirados manualmente dos recipientes, analisando mudanças morfológicas e comportamentais e o número de sobreviventes. Deve-se realizar ao final a pesagem dos animais. Após mais 28 dias os animais juvenis devem ser retirados dos recipientes através do método de extração em banho-maria seguido de seleção manual e contagem dos indivíduos de cada recipiente.

### **5.6 RESULTADOS**

Para a avaliação dos resultados deve-se analisar a reprodução dos organismos adultos, mortalidade e perda de peso. Deve-se realizar Análise de Variância aplicada que possibilitam avaliar se a porcentagem de perda de peso dos indivíduos e a diferença no número de juvenis obteve diferença significativa entre os tratamentos.

## **6. FITOTOXICIDADE:**

### **6.1 SUBSTRATO-TESTE:**

As amostras de solo-teste após serem coletadas devem ser peneiradas em malha de 4 mm de abertura e devem ser completamente homogêneos para a remoção de fragmentos grosseiros. Se necessário, o solo pode ser seco sem a utilização de aquecimento antes do peneiramento. Deve-se ajustar a sua capacidade máxima de retenção de água para 20 % a 40 %.

### **6.2 SOLO-CONTROLE:**

O solo-controle utilizado deve ser similar ao solo-teste em todas as características, exceto na presença de contaminantes. Deve ser peneirado em malha de 4 mm. Sendo recomendável a adição de nutrientes nos solos-teste e solo-controle, pois uma diferença de nutrientes entre os solos pode acarretar em um falso negativo ou falso positivo.

### **6.3 PLANTAS-TESTE:**

Deve ser utilizada uma espécie de monocotiledônea e uma espécie de dicotiledônea sendo testadas em paralelo. A aveia (*Avena sativa*) é recomendada como uma monocotiledônea e o nabo silvestre (*Brassica rapa*) e/ou a sua variedade (*Brassica rapa ssp. rapa*) como uma espécie de planta dicotiledônea.

### **6.4 RECIPIENTE-TESTE:**

Os recipientes-teste devem ser esmaltados ou de plástico não poroso com diâmetro interno na parte superior entre 85 mm e 95 mm. É recomendável o uso de um sistema automático de rega, por exemplo, recipientes equipados com pavio de fibra de vidro, que evitam a perda de tempo consumido diariamente para o ajuste manual da umidade do solo. Um ou dois pavios de fibra de vidro devem ser introduzidos pelo fundo dos recipientes. O pavio alcança um reservatório de água e assegura o suprimento de água durante o ensaio.

### **6.5 PROCEDIMENTO:**

Os solos devem ser homogêneos uma segunda vez antes de serem utilizados. Os recipientes-teste são preenchidos com os solos até aproximadamente 1 cm abaixo de sua borda superior. Imediatamente após o preenchimento dos recipientes, plantar, uniformemente, 10 sementes sem casca das espécies selecionadas. Abrir orifícios com profundidade de 5 mm a 10 mm para *Brassica rapa* ou 10 mm a 15 mm para a *Avena sativa*, colocar uma semente em cada orifício e cuidadosamente nivelar a superfície do solo.

Os ensaios podem ser realizados em sala ambientalmente controlada, para o fotoperíodo, podem ser utilizadas lâmpadas fluorescentes, de descarga de gás, de vapor metálico ou de mercúrio de alta pressão ou lâmpadas de sódio de alta pressão. Convém que as lâmpadas sejam fortes o suficiente para serem instaladas no mínimo a 1 m acima da superfície do solo. Recomenda-se um período de iluminação de 16 h com uma intensidade de no mínimo 7 000 lux, seguida de um período de 8 h de escuridão. A temperatura deve ser de 23



CIDADE  
HISTÓRICA  
RIO GRANDE  
PATRIMÔNIO DO  
RIO GRANDE DO SUL

ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL  
PREFEITURA MUNICIPAL DO RIO GRANDE  
SECRETARIA DE MUNICÍPIO DO MEIO AMBIENTE  
UNIDADE DE LICENCIAMENTO E FISCALIZAÇÃO AMBIENTAL



°C  $\pm$  3 °C.

Para compensar as sementes que não germinarem, um número maior de sementes é plantado (em geral 10 sementes) em cada recipiente. Após a avaliação de emergência em cada recipiente-teste (sete a oito dias após semeadura), remover as plântulas de modo que permaneça um total de cinco exemplares. É importante que a densidade das plantas no recipiente-teste não limite o crescimento normal. Para retirar as plantas, elas podem ser puxadas ou cortadas. Terminar o ensaio entre 14 dias e 21 dias após a emergência de 50% das plântulas do controle.

### 6.6 RESULTADOS

Apresentar os dados em forma de tabelas, registrando o número de plantas que emergiram por réplica e a massa seca total por réplica da parte aérea das plântulas desbastadas, após a secagem a 70 °C a 80 °C por 16 h. Recomenda-se a preparação de apresentação gráfica com a média dos valores incluindo os desvios-padrão dos valores medidos em comparação com a proporção do solo-teste. Análises estatísticas padronizadas geralmente são suficientes para analisar os resultados.

Para o ensaio ser validado devem ser obtidos nos controles: a emergência deve ser suficiente para obter sete plântulas saudáveis, das 10 sementes plantadas por recipiente, as plântulas não apresentam efeitos de fitotoxicidade visíveis (por exemplo, clorose, necrose, murchamento, folhas e caule deformados), e as plantas apresentarem apenas variações no crescimento e na morfologia comum à espécie e a sobrevivência média das plântulas que emergiram é de no mínimo 90 % durante o período do ensaio.