

**Lia Emi Nakagawa**

**Alteração de características do solo para  
remoção de hexaclorobenzeno  
de área contaminada**

**São Paulo**  
2003

**Lia Emi Nakagawa**

**Alteração de características do solo para  
remoção de hexaclorobenzeno  
de área contaminada**

**Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade de São Paulo,  
para a obtenção de Título de Doutor em  
Ciências na área de Ecossistemas  
Terrestres e Aquáticos.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mara M. de  
Andréa.**

**São Paulo  
2003**

Nakagawa, Lia

Alteração de características do solo para  
remoção de hexaclorobenzeno de área  
contaminada

55 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências  
da Universidade de São Paulo. Departamento de  
Ecologia Geral.

1. Hexaclorobenzeno 2. Solo I.

Universidade de São Paulo. Instituto de  
Biociências. Departamento de Ecologia Geral.

### Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a). Mara M. de Andréa  
Orientador(a)

À minha família

## **AGRADECIMENTOS**

Aos colegas, estagiários e funcionários de apoio do Laboratório de Ecologia de Agroquímicos do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental do Instituto Biológico.

À Dra. Mara M. de Andréa pela orientação.

Ao Dr. Luiz C. Luchini pela colaboração e auxílio nas análises cromatográficas.

À Terezinha e Solange pela colaboração, apoio e amizade.

Aos estagiários Fabio, Gustavo, Priscila, Renata, Thabata, Luiz Fábio e Tatiana pela inestimável colaboração.

À D. Auxiliadora e S. Manoel.

Ao Dr. Dácio Roberto Matheus e Vera M. V. Vitalli do Instituto de Botânica pela colaboração e incentivo.

Ao Dr. Marcus B. Matallo pela colaboração.

À colaboração com o Instituto de Botânica através do Projeto “Avaliação do potencial de aplicação de fungos em processos de biorremediação de solos contaminados por resíduos organoclorados”, coordenado pelo Dr. Dácio Roberto Matheus e Dra. Vera L. R. Bononi.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio ao Projeto de Processo nº 98/16541-9.

## ÍNDICE

	página
I - Introdução -----	1
II - Objetivos -----	4
III - Revisão de Literatura	
1 - Compostos Poluentes Persistentes -----	5
2 - Hexaclorobenzeno -----	5
3 - Degradação de Compostos no Ambiente -----	8
4 - Adsorção de Compostos no Solo -----	10
5 - Biorrecuperação -----	10
6 - Volatilização de Compostos no Ambiente -----	13
7 - Mobilidade de Compostos no Solo -----	14
8 - Persistência de Compostos no Ambiente -----	14
IV - Materiais e Métodos	
1 - Composto radiomarcado ( $^{14}\text{C}$ -hexaclorobenzeno) -----	15
2 - Solo contaminado com hexaclorobenzeno -----	15
3 - Análise da contaminação inicial da terra -----	16
4 - Tratamentos da terra contaminada com hexaclorobenzeno -----	17
5 - Mineralização, volatilização, resíduos ligados e metabólitos do hexaclorobenzeno em terra contaminada -----	19
6 - Atividade e da densidade de microrganismos de terra contaminada com hexaclorobenzeno -----	20
7 - Mobilidade do hexaclorobenzeno em terra contaminada -----	21

8 - Análise estatística -----	23
	página
V - Resultados e Discussão	
1 - Análise da contaminação inicial da terra -----	24
2 - Mineralização, volatilização, resíduos ligados e metabólitos do hexaclorobenzeno em terra contaminada -----	26
3 - Atividade e densidade de microrganismos em terra contaminada com hexaclorobenzeno -----	37
4 - Relação entre atividade e densidade microbiana e formação de <sup>14</sup> C-compostos voláteis em terra contaminada com hexaclorobenzeno -----	40
-	
5 - Mobilidade do hexaclorobenzeno em terra contaminada -----	41
VI - Conclusões -----	42
VII - Resumo -----	43
VIII - <i>Abstract</i> -----	45
XIX - Referências Bibliográficas -----	47

## Lista de Figuras

	página
Figura 1 - Fórmula estrutural do HCB -----	6
Figura 2 - Vias de descloração propostas para o HCB -----	9
Figura 3 - Diagrama esquemático de: a) Tratamentos das amostras de terra contaminada com HCB; b) Mineralização, volatilização, resíduos ligados e metabólitos de HCB em terra contaminada; c) Atividade e densidade de microrganismos em terra contaminada com HCB -----	18
Figura 4 - Diagrama esquemático de: 1) Tratamentos das amostras de terra contaminada com HCB; 2) Montagem e percolação de água através de coluna de terra; 3) Lixiviação de <sup>14</sup> C-HCB; 4) Mobilidade <sup>14</sup> C-HCB em coluna de terra -----	22
Figura 5 - Cromatograma dos compostos extraíveis de terra contaminada com HCB	25
Figura 6 - Curvas de calibração de HCB e dos metabólitos 1,2,4,5 TCB, 1,2,3,4 TCB e PCB -----	26
Figura 7 - <sup>14</sup> C-compostos volatilizados de terra contaminada HCB em porcentagem em relação ao <sup>14</sup> C-HCB aplicado, após diferentes tratamentos -----	28
Figura 8 - Cromatograma típico dos compostos volatilizados obtidos por cromatografia gasosa de uma amostra típica de terra contaminada com HCB -----	31
Figura 9 - Compostos volatilizados e <sup>14</sup> C-compostos volatilizados de terra contaminada com HCB -----	32
Figura 10 - <sup>14</sup> C-compostos extraíveis de terra contaminada com HCB após diferentes tratamentos-----	34
Figura 11 - Recuperação total dos <sup>14</sup> C-compostos em terra contaminada com HCB após diferentes tratamentos -----	36
Figura 12 - Número de unidades formadoras de colônias de bactérias (UFC x 10 <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	39

terra) em terra contaminada com HCB após diferentes tratamentos -----

Figura 13 - Número de unidades formadoras de colônias de fungos ( $\text{UFC} \times 10^3 \text{ g}^{-1}$  terra) em terra contaminada com HCB após diferentes tratamentos ----- 39

terra) em terra contaminada com HCB após diferentes tratamentos -----

### Lista de Tabelas

	página
Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do hexaclorobenzeno -----	7
Tabela 2 - Recuperação de métodos de extração de $^{14}\text{C}$ -HCB de terra -----	24
Tabela 3 - Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ terra) de compostos extraíveis de terra contaminada com HCB -----	25
Tabela 4 - Formação de $^{14}\text{C}$ -voláteis a partir de diferentes tratamentos de terra contaminada com HCB -----	28
Tabela 5 - Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ solo) de compostos volatilizados de terra contaminada com HCB sob diferentes tratamentos e porcentagem em relação à concentração presente inicialmente na terra -----	31
Tabela 6 - Recuperação dos $^{14}\text{C}$ -compostos em terra contaminada com HCB sob diferentes tratamentos -----	35
Tabela 7 - Respiração microbiana em terra contaminada com HCB após diferentes tratamentos -----	38
Tabela 8 - Número de unidades formadoras de colônias ( $\text{UFC} \times 10^3 \text{ g}^{-1}$ terra) em amostras de terra contaminada com HCB -----	38
Tabela 9 - Efeito dos tratamentos de terra contaminada sobre a formação de $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis, a densidade e a atividade microbiana -----	40

# 1. INTRODUÇÃO

O ar, a água e o solo são os meios que suportam a vida. Estes meios apresentam uma considerável capacidade de se recuperar de distúrbios periódicos de curta duração, tais como tempestades, incêndios, episódios de poluição, ou remoção de culturas. Isto ocorre porque os organismos e os processos do ecossistema estão adaptados aos distúrbios naturais que ocorrem e têm ocorrido através da história geológica e humana (ODUM, 1997). Segundo BEEBY (1993), o efeito coletivo das adaptações das espécies individuais pode permitir que todo o ecossistema se adapte a um distúrbio e mantenha seu equilíbrio.

O que é novo nos tempos recentes é o aumento em intensidade e extensão geográfica do distúrbio antropogênico e, de especial preocupação, a introdução em larga escala no ambiente de novos compostos químicos tais como os agrotóxicos e os resíduos industriais (ODUM, 1997). Isto tem ocorrido porque, em busca do desenvolvimento, todos os países têm acelerado a industrialização e intensificado a agricultura (CHAABAN, 2001).

Os primeiros agrotóxicos sintéticos se tornaram disponíveis durante os anos 40, gerando grandes benefícios para a produção de alimentos (VAN DER WERF, 1996). Segundo RICHARDSON (1998), quando usados corretamente, os agrotóxicos podem evitar mais de 40% da perda de cultura; entretanto, o uso incorreto dos agrotóxicos, como a aplicação em quantidade excessiva, ou em culturas e condições não específicas para cada produto, pode resultar no acúmulo de resíduos destes compostos no ambiente gerando conseqüências ambientais e para a saúde pública.

A cada ano estima-se que 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos são aplicados em culturas agrícolas em todo o mundo. Como o uso de agrotóxicos na agricultura leva à exposição de organismos não alvo, efeitos colaterais indesejáveis podem ocorrer sobre algumas comunidades, gerando o desequilíbrio do ecossistema como um todo (VAN DER WERF, 1996). As aplicações iniciais de agrotóxicos têm sido muito efetivas na redução da infestação de pragas e no aumento da produção agrícola e da produtividade resultando em maior disponibilidade de alimentos. Entretanto, com o tempo, as pragas atingidas têm desenvolvido resistência aos agrotóxicos tornando necessário o aumento das aplicações, ou resultando no aumento da população de pragas. Além do aumento de resistência, há também a destruição de espécies não alvo como os predadores naturais das pragas e parasitas, além das abelhas, vitais para a polinização de culturas, e dos organismos do solo como os artrópodes, minhocas, fungos, bactérias e protozoários, que são fundamentais tanto para a estrutura como para a

função dos ecossistemas. Os agrotóxicos também contaminam a água potável e as culturas de alimentos, especialmente de frutas, legumes e hortaliças, representando um perigo potencial à saúde dos consumidores, atingindo principalmente as crianças, que são as mais vulneráveis aos efeitos tóxicos destes compostos (WILSON & TISDELL, 2001).

Além da atividade agrícola, a atividade industrial também contribui para a contaminação ambiental, através da emissão de resíduos para o ar, o solo e a água.

Os resíduos tóxicos industriais foram considerados até recentemente, apenas uma consequência normal da atividade industrial, não digna de atenção. Assim, o material indesejável foi colocado em depósitos de resíduos tóxicos ou somente depositado clandestinamente em locais não adequados até que vários desastres locais começaram a chamar a atenção pública (ODUM, 1997). Vários incidentes de contaminação de água subterrânea, contaminação de água superficial, poluição do ar, incêndios, explosões e envenenamentos durante o despejo de resíduos têm sido observados em todo mundo. Estes incidentes têm obrigado os governantes em todo o mundo a impor uma legislação controlando a disposição e a geração de resíduos (POLPRASERT & LIYANAGE, 1996).

No Brasil, na década de 50, várias indústrias químicas foram atraídas para a Baixada Santista no Estado de São Paulo devido à instalação da Refinaria Presidente Artur Bernardes de Cubatão (grupo Petrobrás – Petróleo Brasileiro S/A), às facilidades de transporte propiciadas pelo Porto de Santos e à proximidade com a região metropolitana de São Paulo (MATHEUS, 1998). Uma destas indústrias foi a Clorogil S/A – Indústrias Químicas, instalada em 1962, que começou a produzir pentaclorofenato de sódio, além de solventes organoclorados, como o tetracloreto de carbono, que é um desengraxante utilizado na indústria metalúrgica (MATHEUS, 1998). Em 1976, a indústria Clorogil foi incorporada pela Rhodia S/A (MATHEUS, 1998). Os resíduos gerados pela Clorogil e pela Rhodia foram sendo dispostos de forma inadequada em vários locais da planície arenosa da Baixada Santista. No período de 1966 a 1988, estima-se que foram descartados 12 mil toneladas de produtos tóxicos, de dois tipos: um com elevadas concentrações de pentaclorofenol oriundo da produção de pentaclorofenato de sódio e outro oriundo da produção de tetracloreto de carbono, contendo compostos organoclorados, principalmente o hexaclorobenzeno (MATHEUS, 1998). Hoje são conhecidas pelo menos 11 áreas contaminadas distribuídas nos municípios de São Vicente, Cubatão e Itanhaém (MATHEUS, 1998).

Por exigência da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – CETESB (Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo), a Rhodia S/A construiu um incinerador para queimar o material contaminado. Enquanto se aguardava a instalação do incinerador, foi construída uma “Estação de Espera” onde estão armazenadas cerca de 33 mil toneladas de solo contaminado removido de três áreas do Distrito de Samaritá, em São Vicente. Após o início da operação do incinerador, o material contaminado de outros locais, como Itanhaém e Cubatão, foi sendo removido diretamente para a incineração. Entretanto, a incineração destes materiais provocou a liberação de resíduos tóxicos para o ar tornando necessária a interdição do incinerador. Assim, a “Estação de Espera” continuou aguardando a oportunidade de ter o seu material tratado (MATHEUS, 1998).

O tratamento dos resíduos presentes nestas áreas é necessário devido ao risco ambiental e à saúde humana. No município de São Vicente, a população atraída pela atividade industrial e pelo Porto de Santos, passou a ocupar áreas próximas a esses locais contaminados (MATHEUS, 1998), podendo ser exposta a resíduos tóxicos e potencialmente cancerígenos. Além disso, como estes compostos são muito persistentes, podem contaminar outras partes do ambiente, principalmente as águas subterrâneas e comprometer o futuro destes ecossistemas. Os resíduos armazenados na “Estação de Espera” também precisam de um destino mais adequado, já que não podem ser mantidos indefinidamente neste local sem que haja também o risco de contaminação do ambiente.

Entretanto, esse tratamento requer a realização prévia de estudos que indiquem as formas mais eficientes que levem à sua diminuição ou eliminação. Estes estudos devem permitir avaliar a possibilidade de degradar compostos poluentes, como no processo de biorrecuperação, que utiliza microrganismos para realizar esta degradação. Estes estudos devem também, permitir a previsão de uma possível contaminação do ar e da água através da volatilização e da lixiviação destes compostos.

## 2. OBJETIVOS

A introdução de resíduos tóxicos no solo, tanto de origem agrícola como industrial, pode resultar na contaminação do Ecossistema como um todo e provocar o seu desequilíbrio. Neste estudo, o despejo de resíduos industriais contendo compostos como o hexaclorobenzeno (HCB), que também é um agrotóxico e tem grande persistência no ambiente, resultou na contaminação do solo de várias áreas e levou ao risco de dispersão deste composto para outras partes do Ecossistema.

Assim, este estudo pretendeu verificar a possibilidade de remoção de resíduos de hexaclorobenzeno do solo através de alterações de características do solo, analisando também a possibilidade de contaminação do ar e da água.

- Objetivos:

I - Verificar a eficiência da adição de matéria orgânica, da alteração de pH e do alagamento do solo na biorrecuperação de área contaminada com hexaclorobenzeno, analisando:

a) O efeito da adição de matéria orgânica, da alteração de pH e do alagamento sobre:

- a densidade e a atividade de microrganismos em amostras de terra contaminada com hexaclorobenzeno.

- a biodegradação do hexaclorobenzeno.

b) O efeito do aumento da densidade e atividade microbiana, sobre a biodegradação do hexaclorobenzeno.

II – Verificar a possibilidade de contaminação do ar, analisando:

- O efeito da adição de matéria orgânica, da alteração de pH e do alagamento de amostras de terra contaminada sobre a volatilização do HCB.

III – Verificar a possibilidade de contaminação da água, analisando:

- O efeito da adição de matéria orgânica e da alteração de pH sobre a mobilidade de HCB em amostras de terra contaminada.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Compostos Poluentes Persistentes

Compostos poluentes persistentes são, por definição, substâncias que têm meia-vida longa ou lenta taxa de desaparecimento no ambiente, principalmente devido a sua estabilidade química, mas também devido a condições ambientais desfavoráveis aos processos de mineralização ambiental ou biológica (BRO-RASMUSSEN, 1996).

É o caso de vários compostos feitos pelo homem que têm estruturas que não são encontradas nos compostos naturais e podem ser portanto pouco degradáveis e persistir no ambiente, sendo chamados de recalcitrantes (HÄGGBLÖM, 1992). Um grupo importante de tais xenobióticos é o dos compostos aromáticos halogenados. Estes compostos, particularmente, os aromáticos clorados, têm sido produzidos em grandes quantidades nos últimos 50 anos para uso como biocidas (herbicidas, fungicidas, inseticidas) e para inúmeras outras aplicações (HÄGGBLÖM, 1992). São poluentes de grande preocupação porque freqüentemente entram no ambiente em quantidades substanciais, são tóxicos e resistentes à degradação e se acumulam em sedimentos e na biota (SUFLITA *et al.*, 1982).

Entre os compostos poluentes persistentes, estão alguns agrotóxicos e resíduos industriais como o hexaclorobenzeno (HCB) e o pentaclorofenol (PCP). Os agrotóxicos atingem as diversas partes do ambiente por aplicação intencional no solo, na água ou nos vegetais, ou por contaminação não intencional, por deriva durante a aplicação, atingindo a água, o ar ou o solo. Os resíduos industriais são lançados no ambiente, tanto no solo como na água, como forma de descarte de subprodutos indesejáveis.

#### 3.2. Hexaclorobenzeno

O **hexaclorobenzeno** (HCB) é um composto aromático halogenado que apresenta o núcleo benzênico completamente clorado (STAN, 1981). Esta característica confere estabilidade ao composto, já que o cloro ligado organicamente inibe a sua biodegradação e, embora a ligação carbono-cloro não seja totalmente estranha na natureza, a maioria dos organismos não dispõe de enzimas que a quebrem (SCHEUNERT, 1992). Assim, devido a sua estrutura química (Fig. 1) o HCB é extremamente persistente em todos os compartimentos do ambiente. Segundo BRO-RASMUSSEN (1986), a sua fotooxidação é lenta, a meia-vida em

sistemas bacterianos é longa (de 1 a 5,3 anos) e o HCB é dificilmente transformado por organismos vivos.

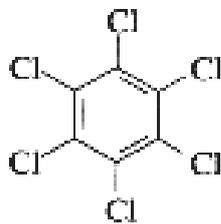


Figura 1: Fórmula estrutural do HCB (VERCHUEREN, 2001).

O HCB foi introduzido em 1945 para o tratamento de sementes especialmente para controle de fungo de trigo (EDWARDS, 1991). Entretanto, na maioria dos países, a produção do HCB como fungicida foi interrompida entre meados dos anos de 1970 e início dos anos de 1980 (MORRIS e CABRAL, 1986). Embora o HCB tenha toxicidade aguda moderada, deve ser classificado como um risco ao ambiente devido a sua persistência e alta taxa de bioacumulação (BRO-RASMUSSEN, 1986). Por isso, o HCB está na lista dos poluentes orgânicos persistentes (POPs), que foram assim classificados pelo “Programa as Nações Unidas para o Meio Ambiente” (PNUMA) em função da sua toxicidade, persistência, capacidade de bioacumulação e de transporte atmosférico (ALCOCK & JONES, 1999).

A maioria do HCB existente atualmente, teve como origem a atividade industrial (TOPP *et al.*, 1989)

O HCB é sintetizado através de cloração de benzeno sob altas temperaturas na presença de um catalizador (BAILEY, 2001). Entretanto, o HCB também pode ser formado como subproduto em vários tipos de reações. Em indústrias químicas, por exemplo, o HCB é formado como subproduto durante a produção de compostos clorados como os solventes percloroetileno e tricloroetileno, além de agrotóxicos clorados. O HCB também é formado como subproduto de combustão incompleta na presença de cloro, em processos como a incineração de lixo urbano e a queima de carvão para a produção de cimento. Segundo BAILEY (2001), 23000 kg ano<sup>-1</sup> de HCB são adicionados ao ambiente global.

O HCB tem sido detectado em todo o mundo, no ar, na água e na biota (BAILEY, 2001), sendo considerado portanto, um contaminante ambiental amplamente distribuído

(SOTIRIOU *et al.*, 1994; MANSOUR *et al.*, 1986). A sua ampla distribuição no mundo e presença em tecidos humanos se deve à alta persistência, baixa solubilidade em água e alta solubilidade em gordura (Tab. 1).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do hexaclorobenzeno.

Ponto de fusão	226°C (VERSCHUEREN, 2001)
Pressão de vapor a 20°C	1,1 x 10 <sup>-5</sup> mmHg (VERSCHUEREN, 2001)
Solubilidade em água a 20°C	3.2 x 10 <sup>-6</sup> g L <sup>-1</sup> (MANSOUR <i>et al.</i> , 1986)
Coefficiente de partição Log n-octanol/água	5,2 (MANSOUR <i>et al.</i> , 1986)
Solubilidade em gordura	9,8 g kg <sup>-1</sup> (MANSOUR <i>et al.</i> , 1986).

A despeito da relativamente baixa pressão de vapor do HCB, a sua baixa solubilidade em água permite que o HCB seja volatilizado em taxas significativas sendo portanto, passível de transporte atmosférico (MANSOUR *et al.*, 1986). SCHEUNERT e KORTE (1986), por exemplo, observaram que após apenas 1 semana, 6,0% do <sup>14</sup>C-HCB aplicado no solo foi volatilizado.

Além disso, têm-se verificado que a baixa hidrossolubilidade e ao elevado coeficiente de partição n-octanol/água resultam em alto grau de adsorção no solo e em sedimentos (SOTIRIOU *et al.*, 1994; EGELER *et al.*, 1997) e também em alto fator de bioconcentração (MANSOUR *et al.*, 1986; SOTIRIOU *et al.*, 1994; EGELER *et al.*, 1997). WILKEN e WIRTH (1986), observaram porcentagens de adsorção do HCB de 11% em areia, 96% em lodo ativado, de 69% a 94% em carvão e de 75 a 81% em matéria particulada suspensa. Em estudo com uma espécie de minhoca de sedimento, EGELER e col. (1997) observaram que a concentração de HCB nestes animais era 7 vezes maior que no sedimento. RUUS e col. (1999) detectaram de 11 a 43 ng de HCB g<sup>-1</sup> gordura em focas e peixes de ambiente marinho. Além disso, o HCB foi um dos primeiros e mais freqüentes compostos detectados no leite humano (LEVINE, 1991).

O HCB tem toxicidade aguda moderada (STRIK, 1986) mas tem alta toxicidade cumulativa (KREWSKI *et al.*, 1986). Em estudos de 21 a 104 dias de duração, KUIPER-GOODMAN e GRANT (1986) observaram a ocorrência de danos no fígado em ratos, principalmente em fêmeas. Além disso, o HCB é carcinogênico para hamster e ratos e em humanos produz lesões na pele e porfíria hepática (KREWSKI *et al.*, 1986).

### 3.3. Degradação de Compostos no Ambiente

No ambiente, compostos como os agrotóxicos e os resíduos industriais sofrem diferentes reações de transformação bióticas e a bióticas.

As reações bióticas são as que ocorrem em organismos vivos ou são catalizadas por enzimas fora das células (SCHEUNERT, 1992). Esses processos podem ocorrer por metabolismo ou cometabolismo.

A reação biótica que ocorre por metabolismo freqüentemente resulta na completa mineralização do composto e na sua conversão a dióxido de carbono, água e íons inorgânicos (LUCHINI & ANDRÉA, 2002). Ocorre com um número limitado de compostos e com algumas poucas cepas de microrganismos que são capazes de crescer usando estes compostos como única fonte de carbono (SCHEUNERT, 1992). A mineralização, ou seja, a completa degradação de uma molécula orgânica a moléculas inorgânicas pequenas ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cl}$ ) é quase sempre uma conseqüência da atividade microbiana, e é a única via que leva à completa eliminação do compostos do ambiente (SCHEUNERT, 1992).

Por outro lado, na reação biótica que ocorre por cometabolismo, os microrganismos realizam transformações dos compostos mas não obtém nem energia nem carbono a partir destas reações, que conseqüentemente não promovem o crescimento destes microrganismos (SCHEUNERT, 1992). A falta ou inibição de certas enzimas faz com que microrganismos degradadores usem para o crescimento um co-substrato que pode ser encontrado na matéria orgânica endógena ou deve ser introduzido no ambiente. Neste caso, os microrganismos não são capazes de realizar a degradação completa do composto (FOURNIER *et al.*, 1993) resultando na formação de produtos intermediários (LUCHINI & ANDRÉA, 2002). Este processo ocorre para a maioria dos agrotóxicos (FOURNIER *et al.*, 1993).

As reações de transformação bióticas são divididas basicamente em reações oxidativas, redutivas e hidrolíticas.

As reações oxidativas mais comuns são descarboxilação,  $\beta$ -oxidação, epoxidação, dehidrogenação, N-desmetilação, substituição de O por S e quebra de éter. A quebra da ligação C=C por oxidação microbiana (epoxidação) ocorre, por exemplo, para o aldrin e outros compostos com anel aromático e é importante porque inicia a degradação molecular (SCHEUNERT, 1992).

As reações hidrolíticas são importantes porque uma das cadeias mais comumente presentes nos agrotóxicos é a ligação éster e a hidrólise desta ligação leva à formação de

produtos não tóxicos. Neste tipo de reação, os microrganismos excretam enzimas hidrolíticas que levam à redução dos compostos a moléculas menores que podem passar pela membrana da célula (MATSUMURA, 1982). Para o pentaclorofenol, por exemplo, a remoção do primeiro substituinte cloro ocorre por hidrólise sob condições aeróbias (SCHEUNERT, 1992).

As reações redutivas prevalecem em zonas anaeróbias do solo, em solo alagado, em sedimentos e em lodo de esgoto anaeróbio. A desalogenação redutiva é a reação mais importante do ponto de vista ecotoxicológico pois muitos compostos ambientalmente problemáticos são halogenados, como os organoclorados, e este processo leva à quebra a ligação C-Cl, permitindo o início da degradação molecular (SCHEUNERT, 1992). Um exemplo de composto que sofre este tipo de reação é o hexaclorobenzeno (Fig. 2). Segundo SCHEUNERT (1992), a descloração redutiva é um processo cometabólico que não sustenta crescimento. Assim, mesmo que não ocorra degradação completa por uma única espécie, o produto desclorado pode ser aproveitado para metabolismo de outras espécies ou até degradado abioticamente. Além disso, produtos desclorados são usualmente menos tóxicos e mais facilmente degradáveis (MIKESELL & BOYD, 1986).

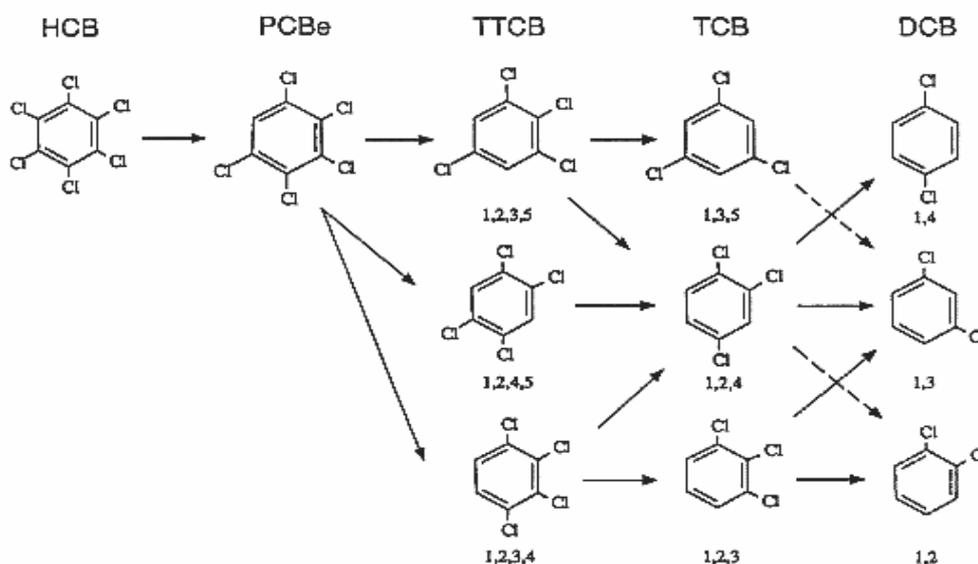


Figura 2: Vias de descloração propostas para o HCB (VAN HOOFF e JAFVERT, 1996)

Os processos abióticos por outro lado compreendem todas as reações não enzimáticas e incluem oxidação, desidrocloração, redução, hidrólise, conjugação, assim como processos fotolíticos. No solo esses processos são catalizados por óxidos metálicos, superfícies orgânicas ou minerais (GORING *et al.*, 1975).

### **3.4. Adsorção de Compostos no Solo**

A adsorção é definida como a adesão ou a atração de uma ou mais camadas iônicas ou moleculares a uma superfície (SCHEUNERT, 1993). No solo, a soma de todos os tipos de fixação de íons ou moléculas sobre ou dentro da fase sólida é chamada de adsorção (SCHEUNERT, 1993). A adsorção de compostos ao solo pode se dar por meios puramente físicos, como através das forças de Van der Waals, ou pode ser química, por ligações eletrostáticas e pontes de hidrogênio ou ambos (LUCHINI & ANDRÉA, 2002). São ligações de intensidade intermediária que permitem que os compostos sejam liberados novamente dependendo do tipo de ligação. Porém, ocorrem ligações químicas fortes e freqüentemente irreversíveis, gerando os resíduos ligados. Já no caso da adsorção física, os compostos adsorvidos podem ser prontamente desorvidos ou liberados (LUCHINI & ANDRÉA, 2002). A adsorção pode ocorrer sobre a matéria orgânica e sobre fração inorgânica do solo. A adsorção de um composto ao solo também depende da sua solubilidade em água, do seu coeficiente de partição n-octanol-água, da estrutura e do tamanho da molécula (SCHEUNERT, 1993).

### **3.5. Biorrecuperação**

A biorrecuperação, ou seja, o uso de organismos para degradar ou controlar a presença de compostos poluentes, constitui-se em uma das mais promissoras tecnologias para despoluição de locais contaminados por resíduos de agrotóxicos e industriais (FABRIS *et al.*, 1996). Os métodos usuais de disposição de solos contaminados com resíduos, como a escavação e subsequente aterro ou incineração, são caros e geralmente representam somente a transferência do resíduo de um local para outro ou na conversão dos resíduos para outras formas. Assim é importante tentar encontrar tecnologias alternativas que resultem na eliminação ou redução permanente de resíduos (DZANTOR *et al.*, 1993).

A biorrecuperação é uma alternativa de baixo custo e ambientalmente mais desejável, pois é baseada em uma visão ecológica (HAIMI, 2000). É uma forma ecológica de recuperação porque envolve a manipulação de processos inerentes ao solo para mobilizar, imobilizar, transformar ou degradar contaminantes. A biorrecuperação pode incluir a fermentação ou a calagem do solo, a revegetação do local e a correção orgânica para estimular a atividade biológica do solo. Segundo HAIMI (2000), o conceito de biorrecuperação pode ser estendido para recuperação ecológica, já que requer, além da degradação dos resíduos, o estabelecimento ou a recuperação de comunidades microbianas, vegetais ou animais, apropriadas para a formação e funcionamento de um ecossistema.

A biorrecuperação de áreas contaminadas pode ocorrer naturalmente, com a degradação dos contaminantes sendo feita pela microbiota endógena nas condições naturais do solo. Entretanto, existem métodos que podem aumentar a eficiência da biorrecuperação como alterações de condições físico-químicas do solo e a introdução de nutrientes ou de inóculo de microrganismos eficientes na degradação de compostos contaminantes (ROMANTSCHUK *et al.*, 2000).

Assim, o aumento da eficiência da biorrecuperação de áreas contaminadas pode ser provocado ou estimulado através de: a) bioestimulação, ou seja, estimulação dos organismos presentes no local, através do controle das condições de crescimento, como nutrientes, oxigênio e umidade favoráveis a esses organismos; e b) bioaumentação ou bioenriquecimento, através da introdução de organismos capazes de degradar os compostos poluentes previamente isolados de outros locais ou do próprio local (FABRIS *et al.*, 1996). Se a recalcitrância ambiental de um composto ocorrer por ausência ou escassez de microrganismos capazes de sua degradação, a inoculação de tais microrganismos pode favorecer a recuperação da área contaminada. Nos casos em que degradadores do próprio local estão presentes em quantidade suficiente, a biorrecuperação é possível sem inoculação, apenas com o estímulo ao crescimento desses microrganismos (HÄGGBLÖM, 1992).

A adição de compostos orgânicos que podem representar nutrientes, geralmente estimula a atividade microbiana do solo (BARRIUSO *et al.*, 1997) por favorecer o crescimento e também o cometabolismo. Isto resulta em aumento da biomassa microbiana (LUNDQUIST *et al.*, 1999) podendo acelerar a degradação de várias substâncias presentes, inclusive os agrotóxicos (SETHUNATHAN *et al.*, 1982). Segundo VOOS e GROFFMAN (1997), quanto maior a biomassa microbiana, maior pode ser o nível de atividade biológica total no ambiente e,

conseqüentemente, maior a diversidade de vias biológicas de metabolismo que podem levar à maior degradação de compostos. Além disso, a matéria orgânica também influencia a degradação abiótica, pois, onde a decomposição química é catalizada nas superfícies orgânicas, o aumento da matéria orgânica (M.O.) deve aumentar a taxa de decomposição de compostos (GORING *et al.*, 1975).

Porém, a redução na degradação devido à presença de M.O. também pode ocorrer e é geralmente explicada pela diminuição na disponibilidade do composto devido ao aumento da sua adsorção (BARRIUSO *et al.*, 1997). Além disso, materiais orgânicos de fácil utilização pelos microrganismos (glicose, por exemplo) podem afetar adversamente a proliferação de microrganismos degradadores de agrotóxicos, já que estes nutrientes podem favorecer a proliferação de microrganismos de forma geral, gerando maior competição entre as diferentes espécies (SATO & LEE, 1996).

Outro tipo de alteração que pode ser provocada no ambiente e pode estimular a degradação química ou biológica de compostos pode se dar através de alteração do pH. A variação no pH afeta a taxa de degradação de compostos no ambiente por processos puramente químicos (ANDRÉA *et al.*, 1997) e também atua sobre processos de seleção de microrganismos que podem ser biodegradadores. Para a maioria das bactérias, o pH do meio ideal para o seu crescimento situa-se ao redor de 7,0; os actinomicetos são favorecidos em solos básicos e os fungos predominam em solos ácidos (ALEXANDER, 1977). ANDERSON e JOERGENSEN (1997) observaram que em solos ácidos ocorreu uma predominância na biomassa de fungos em relação à biomassa de bactérias e que esta mudança na comunidade microbiana poderia causar mudança na utilização de substrato, ou seja, uma molécula de agrotóxico poderia passar a ser utilizada para o crescimento dos fungos. Entretanto, em estudo realizado com solos contaminados com pentaclorofenol observou-se que a abundância de microrganismos foi menor em solos mais ácidos (BROCKELMANN *et al.*, 1996).

O aumento da temperatura geralmente tem como conseqüência o aumento das taxas de degradação, devido ao aumento da velocidade das reações químicas no caso da degradação abiótica, e ao aumento na atividade dos microrganismos do solo (SCHEUNERT, 1992).

Por outro lado, em condições ambientais, o aumento da temperatura é acompanhado pela diminuição da umidade do solo. Esta menor umidade do solo leva à diminuição das taxas de degradação pois diminui a quantidade de compostos dissolvidos na solução do solo e portanto disponíveis à degradação microbiana, além de inibir a atividade dos microrganismos (SCHEUNERT, 1992). Entretanto, em níveis excessivos de umidade próximos à saturação do

solo pode ocorrer mudança de condição aeróbia para anaeróbia, e então, a taxa de decomposição total do composto pode ser determinada não pelo conteúdo de umidade, mas pelas taxas relativas de degradação sob condições aeróbias versus condições anaeróbias (GORING *et al.*, 1975). Desta forma o processo de degradação pode ser mudado, mas ainda assim a degradação pode ocorrer. Assim, a ausência de oxigênio no solo provoca a anaerobiose e pode afetar a comunidade microbiana, promovendo a seleção de microrganismos anaeróbios que podem ou não possuir maior capacidade de degradação de determinados compostos. Em zonas anaeróbias do solo e em solos alagados, por exemplo, prevalecem os processos enzimáticos redutivos (SCHEUNERT, 1992).

### **3.6. Volatilização de Compostos no Ambiente**

As circunstâncias promotoras da degradação devem ser otimizadas, mas devem também minimizar a evaporação e lixiviação do contaminante (ROMANTSCHUK *et al.*, 2000), já que estes processos resultam em contaminação do ar, do solo e de águas subterrâneas.

A **volatilização** de compostos do solo, ou seja, a sua transferência na forma de gás através da interface solo-ar sob condições ambientais foi subestimada por um longo tempo pois os agrotóxicos têm, em geral, baixa pressão de vapor (SCHEUNERT, 1993). Entretanto, a volatilização de compostos das superfícies do solo é importante porque contribui consideravelmente para que a quantidade destes resíduos diminua e, por isso, pode ser erroneamente interpretada como degradação. Para compostos persistentes com baixas taxas de degradação no solo, a volatilização é a principal via de declínio nos ecossistemas terrestres (SCHEUNERT, 1993). Entretanto, enquanto a degradação, especialmente por mineralização, é um mecanismo que leva à real eliminação do problema de resíduo de certos compostos, a volatilização somente transfere o problema de um compartimento do ambiente para outro. Desta forma, a volatilização pode contribuir significativamente para a poluição do ar e para o transporte de compostos poluentes por longas distâncias (SCHEUNERT *et al.*, 1993).

O potencial de volatilização de um composto está relacionado à sua pressão de vapor, mas a taxa de volatilização real dependerá de condições ambientais e todos os fatores que modificam ou atenuam a pressão de vapor efetiva do composto, tais como temperatura, propriedades físico-químicas e umidade do solo, e natureza do composto, particularmente a sua solubilidade na solução do solo e seu grau de adsorção nas partículas minerais (SPENCER & CLIATH, 1974).

Alguns produtos de degradação podem ser muito mais voláteis que os compostos originais. Por isso, em alguns casos, a volatilização destes produtos de degradação pode ser uma importante via de dissipação de compostos poluentes (SPENCER & CLIATH, 1974).

### **3.7. Mobilidade de Compostos no Solo**

A mobilidade dos compostos no solo pode levar à sua lixiviação atingindo águas subterrâneas, sendo portanto, uma causa potencial de contaminação de lençol freático, rios e lagos e do próprio perfil do solo.

A mobilidade de compostos no solo está relacionada por um lado, à adsorção, e por outro, ao fluxo de massa de frações diluídas, sendo que a adsorção retarda o fluxo de massa (SCHEUNERT, 1993). Assim, a mobilidade depende das características do composto, como a hidrossolubilidade, e das características do solo como quantidade de argila e de matéria orgânica, e da porosidade.

A matéria orgânica do solo pode afetar a mobilidade e a lixiviação de compostos por promover a adsorção ou ligação destes compostos aos seus componentes. Se os componentes da matéria orgânica ao qual os compostos estiverem adsorvidos ou ligados tiverem alto peso molecular e forem insolúveis em água, haverá uma retenção destes compostos, e portanto uma menor mobilidade. Por outro lado, se estes componentes tiverem baixo peso molecular e forem solúveis em água, os compostos serão carregados pela água juntamente com a matéria orgânica resultando em aumento da mobilidade (SCHEUNERT, 1993; SCHEUNERT *et al.*, 1992).

### **3.8. Persistência de Compostos no Ambiente**

A persistência de um composto no ambiente é definida como o tempo de residência ou permanência deste composto em um compartimento especificamente definido do ambiente (solo, água, ar, animal ou planta) e é normalmente expressa em termos de meia-vida, que é o tempo necessário para que metade da quantidade aplicada seja degradada ou desapareça do ambiente (GREENHALGH, 1980). Portanto, depende tanto dos processos de transferência como das reações de transformação do composto podendo significar seu real desaparecimento,

sua transformação em outros compostos ou na sua transferência para outros compartimentos do ambiente.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os estudos foram efetuados no Laboratório de Ecologia de Agroquímicos do Instituto Biológico, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

### 4.1. Composto radiomarcado ( $^{14}\text{C}$ -hexaclorobenzeno)

Uma solução de  $^{14}\text{C}$ -hexaclorobenzeno ( $^{14}\text{C}$ -HCB) com 4,05 kBq e  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  hexano foi preparada a partir de hexaclorobenzeno (HCB) uniformemente radiomarcado no anel aromático, com atividade específica de  $11,46 \text{ GBq mmol}^{-1}$  e 97% de pureza radioquímica, obtido da “International Isotopes München” (Alemanha).

Para a realização dos testes de recuperação das metodologias de extração e volatilização de  $^{14}\text{C}$ -HCB, uma solução de trabalho de  $^{14}\text{C}$ -HCB com 4,07 kBq e  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$  hexano foi preparada misturando a solução de  $^{14}\text{C}$ -HCB (4,05 kBq e  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  de hexano) a uma solução de HCB técnico de  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  hexano.

### 4.2. Solo contaminado com hexaclorobenzeno

Amostras de terra contaminada com hexaclorobenzeno (HCB) foram cedidas pela Rhodia do Brasil Ltda e tiveram como origem a “Estação de Espera” onde está armazenado o solo contaminado proveniente de áreas do município de São Vicente (SP).

Amostras de terra não contaminada foram coletadas em áreas do município de São Vicente (SP) e apresentaram as seguintes características físico-químicas:  $2,0 \text{ g dm}^{-3}$  de matéria orgânica; 99,8% de areia; 0,1% de limo; 0,1% de argila, conforme determinação do Laboratório Agrônomo S/C LTDA (Campinas, SP). Análises do pH de terra (10 g de terra em 25 mL de água) foram realizadas com pH-metro Analion PM 608 e indicaram pH 3,6.

A terra contaminada foi armazenada em congelador a -18 °C, para manter a integridade dos compostos nela presentes e a terra não contaminada foi armazenada em geladeira a 4 °C para garantir a manutenção das suas características microbiológicas.

Para os estudos, utilizou-se amostra de terra contaminada misturada a terra não contaminada na proporção de 1:10. Este procedimento foi realizado porque segundo DZANTOR e col. (1993) a diluição do solo contaminado e portanto diminuição da concentração dos contaminantes pode melhorar a eficiência do processo de biorrecuperação.

### **4.3. Análise da contaminação inicial da terra**

Previamente, determinou-se a metodologia mais eficiente para a extração do HCB das amostras de terra. Amostras de terra não contaminada tratadas com solução de trabalho de <sup>14</sup>C-HCB (0,160 kBq e 2 mg HCB g<sup>-1</sup> terra) sofreram processo de extração por soxhlet (150 mL para 10 g de terra) por 6 horas e também por energia de microondas (10 mL para 3 g de terra) em 2 ciclos de 4 minutos ou 12 ciclos de 1 minuto, com os seguintes sistemas de solventes: hexano, tolueno, hexano: acetona (9:1), hexano: acetona (75:25) e tolueno:acetona (9:1). Alíquotas dos extratos tiveram o radiocarbono quantificado por Espectrometria de Cintilação Líquida (ECL), em aparelho Packard LSI600, por 10 minutos, após adição de líquido cintilador para soluções aquosas conforme MESQUITA e RÜEGG (1984).

A contaminação inicial da terra foi determinada através de extração das amostras de terra contaminada misturada a terra não contaminada e posterior análise dos extratos por cromatografia gasosa. A extração das amostras terra foi realizada por energia de microondas (80W), em 12 ciclos de 1 minuto, intercalados por resfriamento em gelo (ANDRÉA *et al.*, 2001), de 3,0 g de terra com 10 mL de uma mistura de hexano:acetona (75:25). A seguir, os extratos da terra foram submetidos a um “clean-up” em filtro com membrana “durapore” de 0,45 µm de poro, e analisados em cromatógrafo à gás Varian 3400 nas seguintes condições: coluna megabore de fase estacionária DB-17 com 30 m de comprimento, 0,53 mm d.i. e filme de 1,0 µm, com rampa de temperatura de 188°C a 240°C (10°C min<sup>-1</sup>), tendo como gás de arraste o Nitrogênio a 1,5 mL min<sup>-1</sup> de vazão; detector de captura eletrônica (DCE) mantido à temperatura de 300°C; injetor splitless à temperatura de 220°C. Além do HCB, os seguintes metabólitos foram analisados: 1,2,4,5 tetraclorobenzeno (1,2,4,5 TCB); 1,2,3,4 tetraclorobenzeno (1,2,3,4 TCB) e pentaclorobenzeno (PCB), por comparação com padrões

dessas substâncias. As curvas de calibração para quantificação destes compostos foram feitas pelo método de MEIER e ZÜND (1993) com cinco concentrações de cada composto, dentro dos seguintes intervalos: de 0,06 a 0,15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para 1,2,4,5 TCB, de 0,03 a 0,075  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para 1, 2, 4, 5 TCB, de 0,15 a 1,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para PCB e de 6 a 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para HCB, com limite de confiança de 98%.

#### **4.4. Tratamentos da terra contaminada com hexaclorobenzeno**

Os tratamentos consistiram em adição de matéria orgânica, alteração do pH e alagamento das misturas de terra contaminada com a não contaminada.

Amostras de terra contaminada misturada a terra não contaminada (100 g de peso seco) receberam: 1) bagaço de cana (0,025 g  $\text{g}^{-1}$  terra), que foi escolhido por ser fonte abundante e barata, e 2) vermicomposto ou húmus de minhoca (0,025 g  $\text{g}^{-1}$  terra), como fonte alternativa.

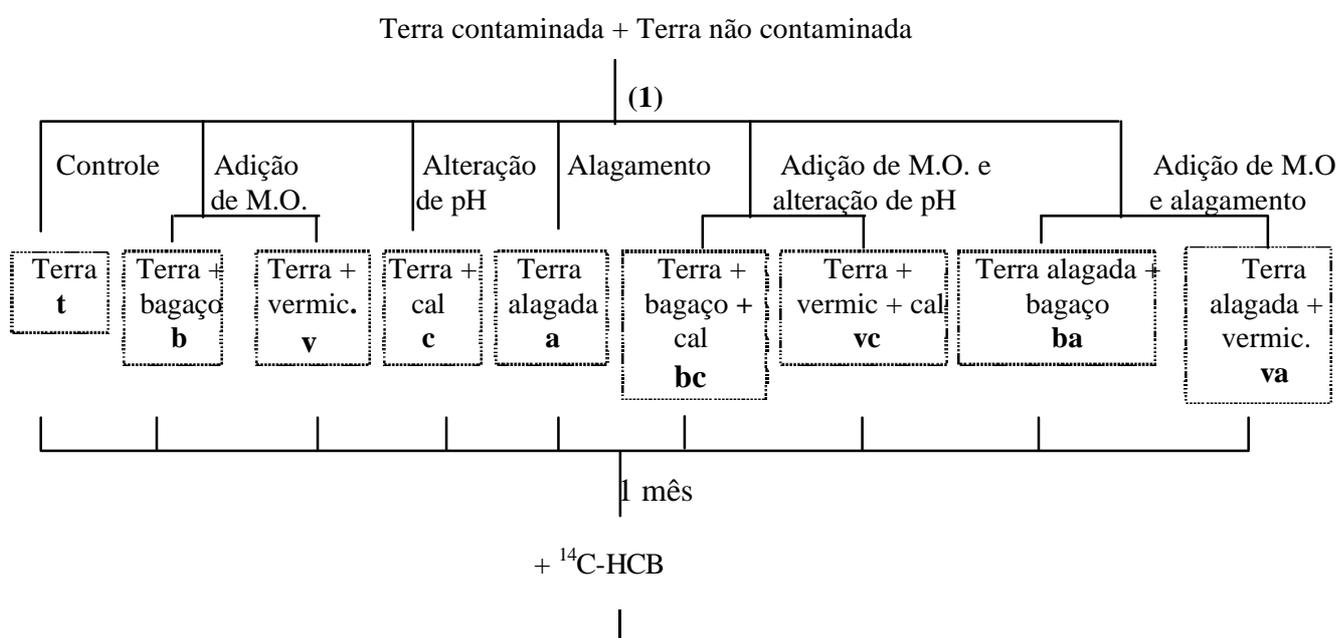
O aumento do pH da terra foi feito conforme KIËHL (1979), adicionando-se carbonato de Cálcio (cal) a 0,6 mg  $\text{g}^{-1}$  terra, até pH 5,6 na terra com cal, pH 5,0 na terra com cal e bagaço e pH 4,6 na terra com cal e vermicomposto.

O alagamento das amostras de terra consistiu em adição de água de modo a formar uma camada de cerca de 1 cm acima da superfície propiciando condições de anaerobiose.

Outras amostras não sofreram qualquer tipo de tratamento, servindo como controle, e outras receberam uma mistura de tratamentos: adição de matéria orgânica e cal, ou adição matéria orgânica e alagamento.

Desta forma, foram preparadas triplicatas dos seguintes tratamentos: 1) controle (t); 2) adição de bagaço (b); 3) adição de vermicomposto (v); 4) adição de cal (c); 5) alagamento (a); 6) adição de bagaço e cal (bc); 7) adição de vermicomposto e cal (vc); 8) adição de bagaço e alagamento (ba) e 9) adição de vermicomposto e alagamento (va), conforme a Figura 3. A umidade natural das amostras foi analisada em balança de determinação de peso seco (Mettler LJ16) e todas as amostras, com exceção das amostras alagadas, receberam água até atingir 50% da CMRA que foi determinada através de repetidas percolações com 10 mL de água em 10 g de terra (DRAFT INTERNATIONAL STANDART, 1992; KLUTE, 1986).

Todas as amostras de terra foram colocadas em frascos de vidro e incubadas em câmara de temperatura controlada (Fanen M347-6) a aproximadamente 29°C durante um mês, para propiciar a reativação dos microrganismos presentes.



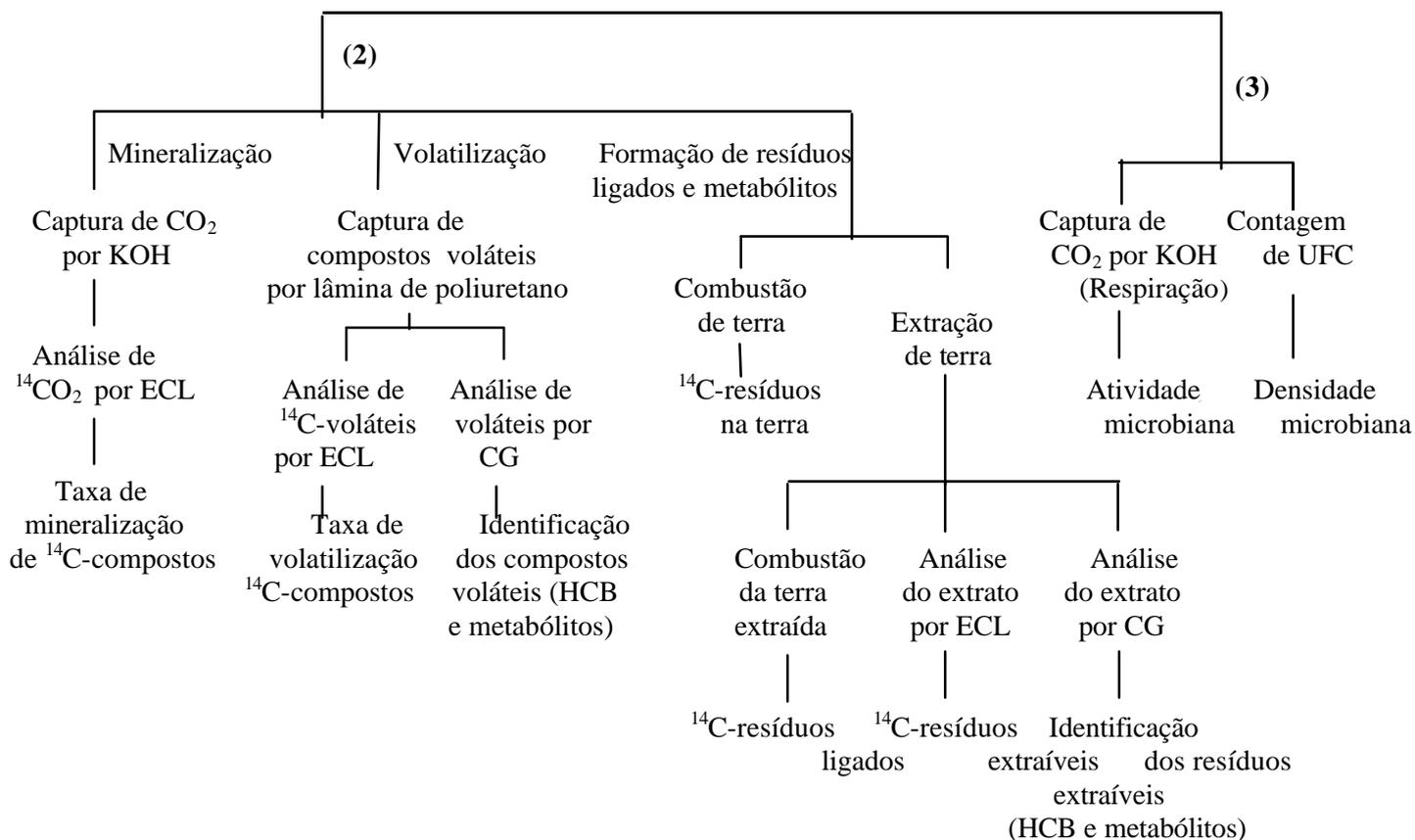


Figura 3: Diagrama esquemático de: 1) Tratamentos das amostras de terra contaminada com HCB; 2) Mineralização, volatilização, resíduos ligados e metabólitos de HCB em terra contaminada; 3) Atividade e densidade de microrganismos em terra contaminada com HCB (KOH = hidróxido de potássio; ECL = Espectrometria de Cintilação em Líquido; CG = Cromatografia Gasosa; UFC = Unidades Formadoras de Colônias).

#### 4.5. Mineralização, volatilização, resíduos ligados e metabólitos de hexaclorobenzeno em terra contaminada

Previamente, determinou-se a metodologia mais eficiente para a captura de compostos volatilizados a partir do <sup>14</sup>C-HCB. Amostras de terra não contaminada tratadas com solução de trabalho de <sup>14</sup>C-HCB (0,160 kBq e 2 mg HCB g<sup>-1</sup> terra) foram colocadas em frascos de vidro com tampa ou em frascos biométricos. No interior de cada frasco de vidro e no braço lateral de cada frasco biométrico foram colocados 10 mL de etilenoglicol monometiléter e, na boca de cada frasco de vidro, foi colocada uma lâmina de poliuretano (6,0 cm de diâmetro e 1,5 cm de espessura). As amostras foram incubadas em câmara de temperatura controlada a aproximadamente 29°C durante 42 dias. Semanalmente, o etilenoglicol monometiléter foi

coletado, substituído e alíquotas foram analisadas por ECL. Também semanalmente, as lâminas de poliuretano foram coletadas, substituídas e submetidas à extração por contato com 30 mL de hexano durante 6 horas; a seguir, alíquotas do extrato foram analisadas por ECL para quantificação dos  $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis capturados.

Para as análises da mineralização, volatilização, formação de resíduos ligados e de metabólitos de HCB das amostras de terra contaminada misturada a terra não contaminada (t, b, v, c, bc, vc, a, ba, va, Fig. 3), cada amostra contida em frasco de vidro recebeu 0,8 mL de solução de  $^{14}\text{C}$ -HCB, de modo a resultar em 0,032 kBq e 0,008  $\mu\text{g}$  de  $^{14}\text{C}$ -HCB  $\text{g}^{-1}$  de terra, além da quantidade de HCB já presente como contaminante na terra.

No interior de cada frasco colocou-se também um frasco com solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  para captura de  $^{14}\text{CO}_2$  produzido e, na boca destes frascos, colocou-se uma lâmina de poliuretano para captura de  $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis. A seguir, as amostras foram incubadas em câmara de temperatura controlada a aproximadamente  $29^\circ\text{C}$  por 270 dias.

A mineralização, ou produção de  $^{14}\text{CO}_2$ , foi acompanhada quinzenalmente através de análise de alíquotas de 1,0 mL da solução de KOH por ECL. A volatilização de  $^{14}\text{C}$ -compostos foi acompanhada mensalmente através de extração dos  $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis capturados nas lâminas de poliuretano por contato com 30 mL de hexano durante 6 horas e análise do extrato por ECL. Os valores foram calculados como porcentagem de  $^{14}\text{CO}_2$  e  $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis formados após 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 e 270 dias de incubação, em relação à quantidade de radiocarbono adicionada como  $^{14}\text{C}$ -HCB.

A análise dos  $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis para identificação dos seus componentes, através de cromatografia em camada delgada e técnicas radiométricas, não foi possível devido à volatilidade destes compostos.

Assim, realizou-se a análise dos compostos voláteis por cromatografia gasosa, conforme descrito anteriormente, das amostras controle (t), alagadas e com adição de bagaço de cana de açúcar (ba), e alagadas e com adição de vermicomposto (va), nos períodos de 0-30, 60-90, 150-180 e 240-270 dias de incubação.

A quantificação dos  $^{14}\text{C}$ -resíduos extraíveis e dos  $^{14}\text{C}$ -resíduos ligados foi realizada imediatamente após o início dos estudos e aos 90, 180 e 270 dias de incubação (T.0., T.90, T.180 e T.270, respectivamente). Para estas análises, amostras de 3,0 g de terra foram extraídas

com 10 mL de mistura hexano:acetona (75:25), por energia de microondas (80W) em 12 ciclos de 1 minuto. A análise dos  $^{14}\text{C}$ -resíduos extraíveis foi realizada através de quantificação de alíquotas de 1,0 mL do extrato por ECL, e a quantidade de resíduos que permaneceram ligados à terra após extração foi estudada através da combustão de 3 alíquotas de 0,5 g da terra extraída em “Biological Oxidizer” (Harvey OX 600) e quantificação do radiocarbono por ECL, conforme ANDRÉA e col. (1997).

Os compostos extraíveis das amostras controle (t), alagadas e com adição de bagaço de cana de açúcar (ba), e alagadas e com adição de vermicomposto (va), obtidos no início do experimento e após 90, 180 e 270 dias de incubação, foram analisados por cromatografia gasosa, conforme descrito anteriormente.

#### **4.6. Atividade e densidade de microrganismos de terra contaminada com hexaclorobenzeno**

Cada amostra de terra (t, b, v, c, bc, vc, a, ba, va, Fig. 3) foi analisada quanto à atividade e a densidade microbiana, imediatamente após a montagem do experimento e aos 90, 180 e 270 dias de incubação (T.0., T.90, T.180 e T.270, respectivamente).

A atividade microbiana das amostras de terra foi avaliada através da respiração dos microrganismos, medida pela quantidade de  $\text{CO}_2$  formada em um período de 7 dias. O  $\text{CO}_2$  produzido foi capturado por 10 mL de solução de  $\text{KOH}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e alíquotas de 5,0 mL desta solução foram analisadas por titulação com  $\text{HCl}$  ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) após adição de fenolftaleína e retrotitulação com alaranjado de metila (ANDRÉA & PETINELLI, 2000).

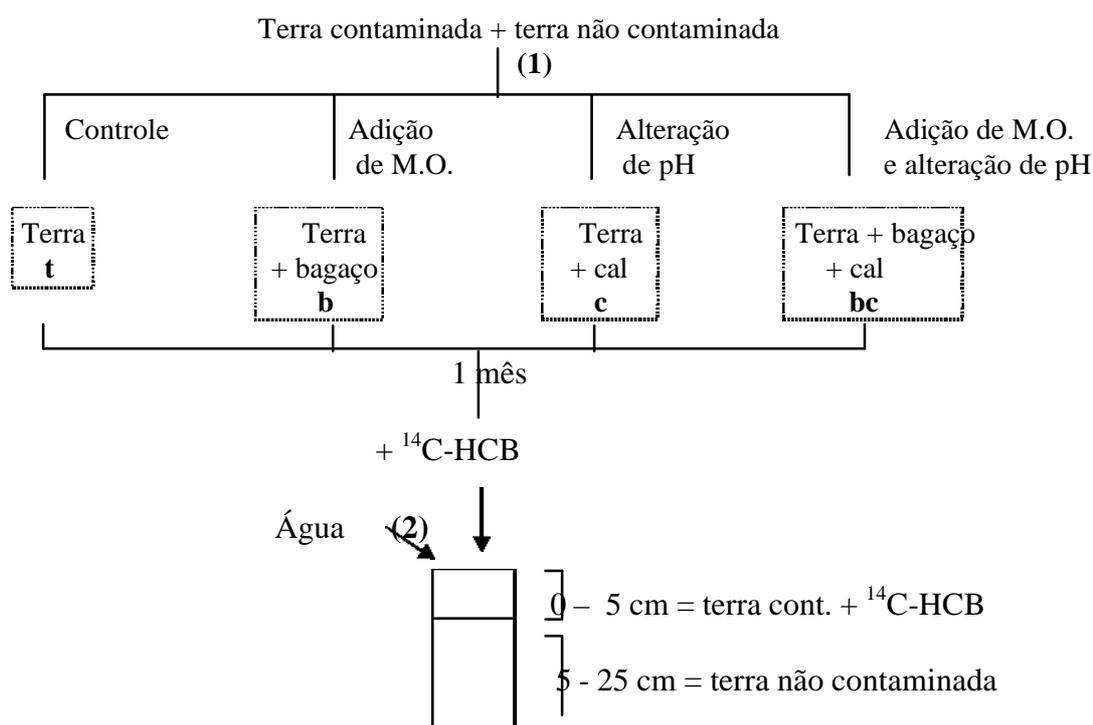
Avaliou-se a densidade microbiana da terra através da metodologia de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias e fungos (SCHINNER *et al.*, 1996). Conforme NAKAGAWA (1997), subamostras de 5,0 g de cada amostra de terra foram colocadas em Erlenmeyer contendo 45 mL de solução da salina ( $0,098 \text{ g de NaCl mL}^{-1}$  de água destilada) e agitadas mecanicamente por 20 minutos. Após 10 minutos de decantação, as suspensões de terra foram diluídas sucessivamente, com fator de diluição de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$ . A seguir, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  das suspensões diluídas foram inoculadas em placas contendo meio de cultura para bactérias composto de 3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 8 g de  $\text{NaCl}$ , 15 g de Ágar e a pH 7,2 (JOHNSON *et al.*, 1960), e para fungos composto de 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5 g de peptona, 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 g de dextrose, 0,05 g de rosa bengala,

0,05 g de Estreptomicina, 18 g de Ágar e com pH entre 5,6 e 5,8 (JOHNSON *et al.*, 1960). As placas foram mantidas em câmara de temperatura controlada a 29°C e contou-se o número de colônias formadas no período.

#### 4.7. Mobilidade de hexaclorobenzeno em terra contaminada

Este estudo foi conduzido em tubos de PVC medindo 35,0 cm de altura x 5,0 cm de diâmetro nos quais colocou-se um filme plástico contendo furos pequenos, de modo a impedir a perda de terra, mas permitir o escoamento de água. No interior de cada tubo foram colocadas amostras de terra não contaminada formando a camada inferior da coluna de terra (5 - 25 cm).

Triplicatas de 150 g de mistura de terra contaminada com não contaminada foram tratadas com bagaço de cana de açúcar a 0,025 g<sup>-1</sup> terra, ou carbonato de Cálcio (cal) a 0,6 mg g<sup>-1</sup>, ou bagaço de cana de açúcar e cal a 0,025 g<sup>-1</sup> e 0,6 mg g<sup>-1</sup> terra, respectivamente, ou não sofreram qualquer tipo de adição (Fig. 4). Todas as amostras foram umedecidas a 50% da CMRA e incubadas em câmara de temperatura controlada a aproximadamente 29°C durante um mês, para propiciar a reativação da bioatividade dos microrganismos presentes. Após este período, adicionou-se 5,0 mL de solução de <sup>14</sup>C-HCB em cada amostra, resultando em 0,135 kBq de <sup>14</sup>C-HCB g<sup>-1</sup> de terra. Estas amostras foram colocadas sobre a terra não contaminada dos tubos de PVC, formando a camada superior (0 - 5 cm) de cada coluna.



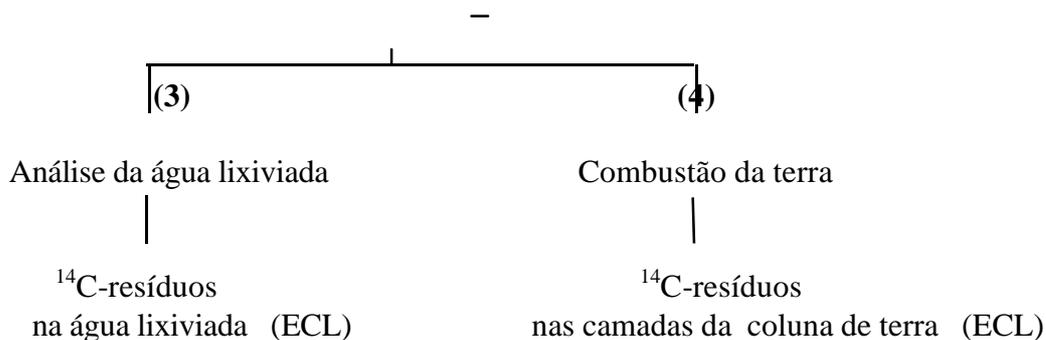


Figura 4: Diagrama esquemático de: 1) Tratamentos das amostras de terra contaminada com HCB; 2) Montagem e percolação de água através de coluna de terra; 3) Lixiviação de <sup>14</sup>C-HCB; 4) Mobilidade do <sup>14</sup>C-HCB em coluna de terra (ECL = Espectrometria de Cintilação em Líquido).

Paralelamente, registrou-se a pluviosidade semanal através de leituras em pluviômetro colocado ao ar livre e calculou-se o volume de água a ser adicionado semanalmente em cada tubo através da relação  $1\text{mm} = 1\text{L m}^{-2}$ . Após a percolação da água nos tubos, o volume de água lixiviada foi coletado também semanalmente e alíquotas de 1,0 mL foram analisadas por ECL para determinação da presença de <sup>14</sup>C-compostos (Fig. 4).

No final dos 270 dias, cada tubo foi seccionado de modo a separar a camada superior (0 – 5 cm), que representava a camada tratada adicionada, e a camada inferior (de 5 – 25 cm), que foi subdividida de 5 cm em 5 cm. As amostras foram então analisadas quanto à presença de <sup>14</sup>C-compostos, através da combustão de 3 alíquotas de 0,5 g de terra e quantificação do radiocarbono por ECL, conforme já descrito.

#### 4.8. Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística por teste F para análise de variância, e teste de Tukey para comparação entre as médias, para determinar diferenças significativas entre as amostras (VIEIRA & HOFFMAN, 1989).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Análise da contaminação inicial da terra**

Os testes para avaliação de métodos de extração do  $^{14}\text{C}$ -HCB de terra indicaram que o método mais eficiente foi a utilização de energia de microondas com mistura de hexano:acetona (75:25), em 12 ciclos de 1 minuto, que resultou em recuperação de 115% (Tab. 2).

Tabela 2: Recuperação de métodos de extração de  $^{14}\text{C}$ -HCB de terra (porcentagem em relação ao radiocarbono aplicado  $\pm$  desvio padrão).

Sistema de solventes	Soxhlet (6 horas)	Microondas	
		2 ciclos de 4 minutos	12 ciclos de 1 minuto
Hexano	85,7 ± 2,1	57,8 ± 10,9	_*
Tolueno	77,0 ± 3,0	46,6 ± 5,6	-
Hexano:Acetona (9:1)	98,3 ± 6,4	59,9 ± 8,7	97,0 ± 8,4
Hexano: Acetona (75:25)	97,1 ± 1,5	85,0 ± 12,3	114,9 ± 2,0
Tolueno:Acetona (9:1)	92,1 ± 6,9	46,9 ± 6,1	-

\* Não analisado

A determinação da **contaminação inicial** da terra (T.0) por cromatografia gasosa (Fig. 5 e Tab. 3) indicou a presença de 3427,7  $\mu\text{g}$  de HCB  $\text{g}^{-1}$  terra, além dos metabólitos 1,2,4,5 TCB a 24,0  $\mu\text{g}$   $\text{g}^{-1}$ , 1,2,3,4 TCB a 6,3  $\mu\text{g}$   $\text{g}^{-1}$  e PCB a 266,8  $\mu\text{g}$   $\text{g}^{-1}$ . A análise cromatográfica dos padrões destes compostos indicou tempos de retenção de 7,4 min., 8,9 min., 12,6 min. e 23,1 min., para 1,2,4,5 TCB, 1,2,3,4 TCB, PCB e HCB respectivamente, e as curvas de calibração para quantificação destes compostos indicaram valores de coeficiente de correlação (r) de 0,9926 para o 1,2,4,5 TCB; 0,9926 para o 1,2,3,4 TCB; 0,9975 para o PCB e 0,9693 para o HCB (Fig. 6)

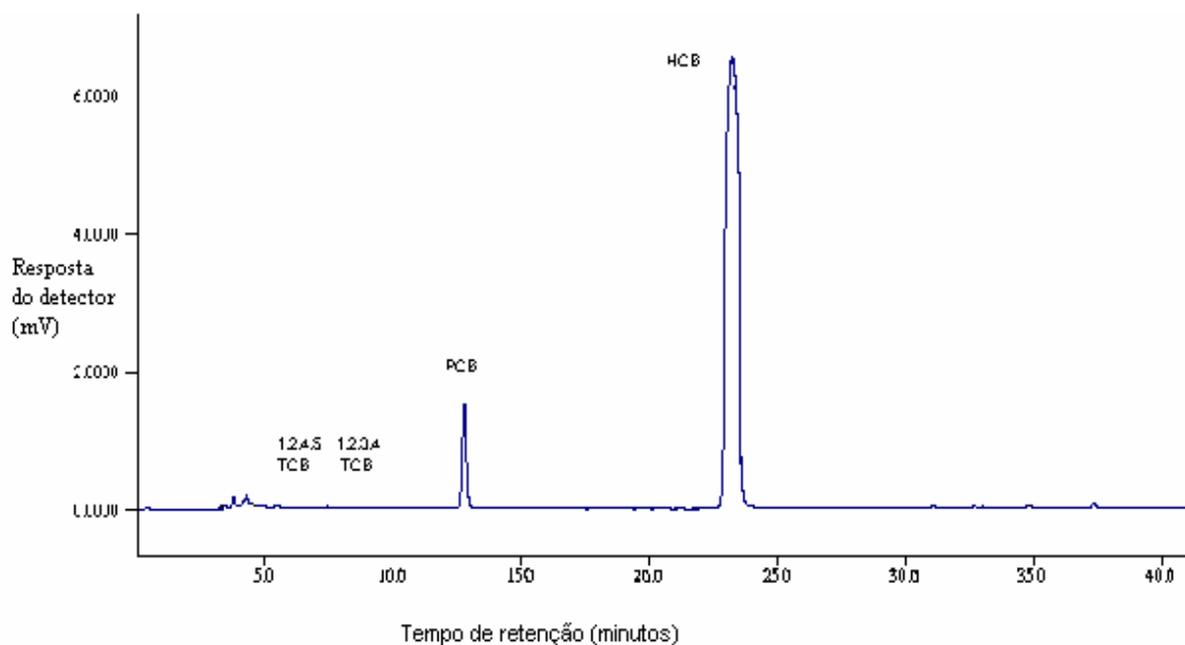
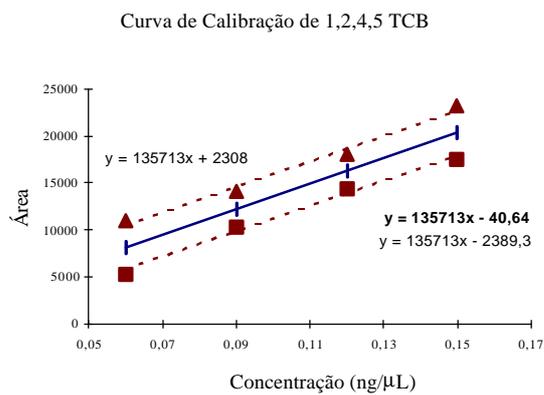


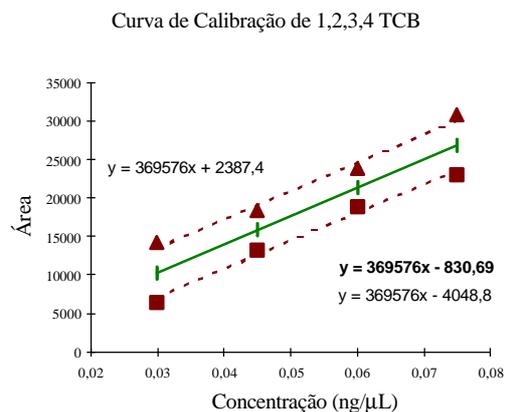
Figura 5: Cromatograma dos compostos extraíveis de terra contaminada com HCB.

Tabela 3: Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$  terra) dos compostos extraíveis da terra contaminada com HCB após diferentes tratamentos.

Tempo (dias)	Compostos	Tratamentos		
		controle (t)	bagajo e alagamento (ba)	vermicomposto e alagamento (va)
0	1,2,4,5 TCB	24,0 ± 3,3	-	-
	1,2,3,4 TCB	6,3 ± 1,3	-	-
	PCB	266,8 ± 50,0	-	-
	HCB	3427,7 ± 448,0	-	-
90	1,2,4,5 TCB	25,3 ± 1,5	14,0 ± 11,2	20,1 ± 1,1
	1,2,3,4 TCB	7,3 ± 0,5	4,2 ± 2,3	5,3 ± 0,1
	PCB	281,3 ± 9,3	196,0 ± 77,1	236,8 ± 10,2
	HCB	3287,3 ± 380,4	2259,6 ± 336,4	2516,4 ± 176,6
180	1,2,4,5 TCB	19,0 ± 7,8	14,0 ± 3,3	19,5 ± 0,1
	1,2,3,4 TCB	4,3 ± 1,5	3,3 ± 0,2	4,7 ± 0,6
	PCB	257,1 ± 45,3	162,7 ± 33,8	245,7 ± 15,2
	HCB	3410,0 ± 285,1	2627,6 ± 90,6	3000,1 ± 120,3
270	1,2,4,5 TCB	21,0 ± 3,3	23,2 ± 3,0	22,4 ± 0,6
	1,2,3,4 TCB	6,6 ± 1,4	6,7 ± 0,7	6,0 ± 0,6
	PCB	278,6 ± 19,6	199,0 ± 21,1	246,6 ± 12,2
	HCB	3942,2 ± 231,9	3192,6 ± 420,2	2902,3 ± 233,7



◆ Curva de melhor ajuste      ■ Limite inferior ( $Y_0 - LC95\%$ )  
 ▲ Limite superior ( $Y_0 + LC95\%$ )



◆ Curva de melhor ajuste ( $Y_0$ )      ■ Limite inferior ( $Y_0 - LC95\%$ )  
 ▲ Limite superior ( $Y_0 + LC95\%$ )

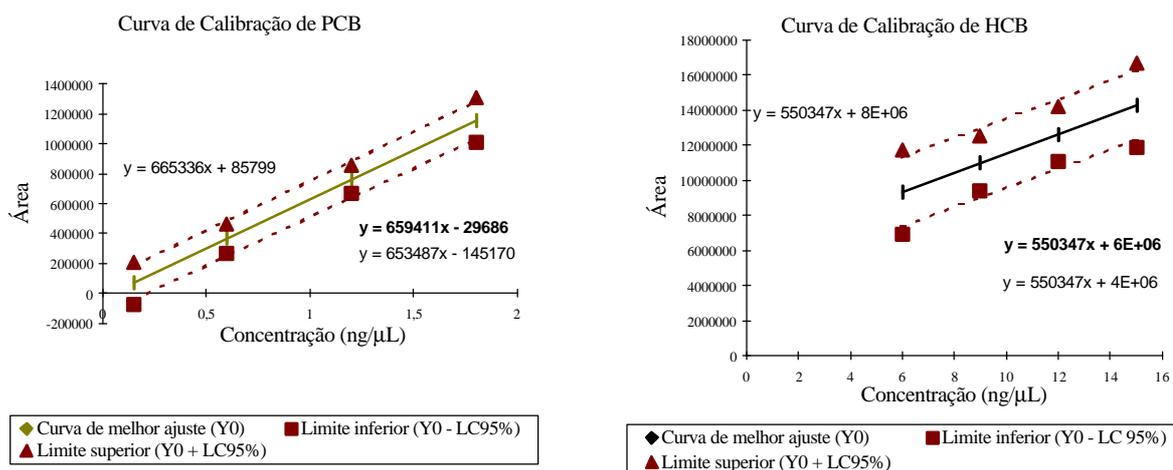


Figura 6: Curvas de calibração do HCB e dos metabólitos 1,2,4,5 TCB, 1,2,3,4 TCB e PCB.

## 5.2. Mineralização, volatilização, resíduos ligados e metabólitos de hexaclorobenzeno em terra contaminada

Os testes para avaliação de métodos para captura de compostos volatilizados a partir do  $^{14}\text{C}$ -HCB indicaram que o método mais eficiente foi a utilização de lâmina de poliuretano em frascos de vidro com tampa de rosca, que resultou em recuperação de  $93,5\% \pm 1,9$ . O etilenoglicol monometiléter capturou apenas  $6,0\% \pm 1,1$  no frasco de vidro e  $14,1\% \pm 1,8$  no frasco biométrico.

Não se observou **mineralização** química ou biológica do  $^{14}\text{C}$ -HCB em nenhum dos tratamentos da terra contaminada com HCB. Outros estudos também verificaram a quase total impossibilidade de mineralização do HCB (ISENSEE, 1976; HÄGGBLÖM, 1992). Outros ainda, utilizando vários sistemas biológicos mostraram que a mineralização biológica do HCB foi muito baixa, com taxas de produção de  $\text{CO}_2$  menores que 1% (MANSOUR *et al.*, 1986; SCHEUNERT, 1993; SCHEUNERT *et al.*, 1994; SCHEUNERT e KORTE, 1986; MATHEUS *et al.*, 2000). Segundo SCHEUNERT (1992), a presença de grande número de átomos de cloro na molécula do HCB dificulta a biodegradação deste composto, já que a maioria dos microrganismos não tem enzimas que quebrem a ligação carbono-halogênio e esta quebra é um pré-requisito para a mineralização de compostos halogenados. Neste estudo, nem a adição de

matéria orgânica, nem a alteração do pH ou o alagamento da terra foram capazes de estimular qualquer mineralização do  $^{14}\text{C}$ -HCB. A dificuldade de quebra da ligação C-Cl com produção final de  $\text{CO}_2$  foi detectada também com outros compostos organoclorados; por exemplo, NAIR e col. (1992) observaram apenas uma pequena (máximo de 3%) mineralização do DDT, que foi menor ainda (máximo de 2,7%) sob condições de alagamento.

As porcentagens de  $^{14}\text{C}$ -**compostos voláteis** detectados após 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 e 270 dias de incubação foram maiores nas amostras alagadas, com valores variando de 21% a 40 %, após 270 dias de incubação. Em todos os outros tratamentos essas porcentagens variaram de apenas 12% a 20% (Tab. 4 e Fig. 7).

A análise estatística indicou que, após 30 dias de incubação, todas as amostras alagadas (a, ba e va) apresentaram taxa de volatilização significativamente maior do que a amostra controle (t). Após 90 e 180 dias de incubação, esta diferença foi observada apenas nas amostras alagadas e com vermicomposto (va), e no T.270, nas amostras alagadas e com adição de ambas formas de matéria orgânica (ba e va). Verificou-se, portanto, que o alagamento combinado com adição de matéria orgânica foi o principal agente causador de processos que resultaram em aumento da volatilização do  $^{14}\text{C}$ -HCB da terra.

Tabela 4: Formação de  $^{14}\text{C}$ -voláteis a partir de diferentes tratamentos da terra contaminada com HCB (% em relação ao radiocarbono inicialmente aplicado como  $^{14}\text{C}$ -HCB  $\pm$  desvio padrão).

Tempo (dias)	Tratamentos*								
	t	b	v	c	bc	vc	a	ba	va
30	7,0 $\pm$ 1,3	4,5 $\pm$ 0,7	5,4 $\pm$ 0,7	5,9 $\pm$ 0,9	4,3 $\pm$ 0,8	4,4 $\pm$ 0,8	12,8 $\pm$ 1,5	14,2 $\pm$ 2,8	14,0 $\pm$ 3,2
60	9,1 $\pm$ 1,5	6,1 $\pm$ 1,0	6,8 $\pm$ 1,0	7,6 $\pm$ 0,9	5,7 $\pm$ 0,9	5,7 $\pm$ 0,9	13,6 $\pm$ 1,2	15,4 $\pm$ 3,2	17,3 $\pm$ 3,6
90	11,5 $\pm$ 1,9	8,7 $\pm$ 1,1	9,0 $\pm$ 1,3	8,6 $\pm$ 1,3	7,4 $\pm$ 0,8	6,9 $\pm$ 0,5	14,0 $\pm$ 1,4	17,1 $\pm$ 0,3	19,4 $\pm$ 5,8
120	13,9 $\pm$ 2,2	9,1 $\pm$ 1,1	10,4 $\pm$ 1,2	11,2 $\pm$ 2,1	9,3 $\pm$ 0,2	8,0 $\pm$ 1,0	15,5 $\pm$ 1,5	17,7 $\pm$ 1,5	26,1 $\pm$ 5,6
150	15,6 $\pm$ 2,2	10,3 $\pm$ 1,1	11,7 $\pm$ 1,3	12,5 $\pm$ 2,2	10,4 $\pm$ 0,7	9,0 $\pm$ 1,0	15,8 $\pm$ 1,5	20,6 $\pm$ 2,5	31,0 $\pm$ 5,4
180	18,1 $\pm$ 3,2	11,7 $\pm$ 1,6	14,7 $\pm$ 3,0	14,3 $\pm$ 2,2	11,7 $\pm$ 1,0	10,8 $\pm$ 0,3	18,0 $\pm$ 0,7	24,2 $\pm$ 1,4	33,5 $\pm$ 4,4
210	18,8 $\pm$ 3,2	13,8 $\pm$ 1,7	15,1 $\pm$ 2,9	14,7 $\pm$ 3,4	12,0 $\pm$ 1,2	11,3 $\pm$ 0,4	19,0 $\pm$ 0,4	26,2 $\pm$ 1,2	36,6 $\pm$ 5,1

240	19,5 ± 3,0	14,2 ± 1,5	15,7 ± 3,2	15,0 ± 3,5	12,6 ± 1,9	11,5 ± 0,3	20,2 ± 0,4	27,6 ± 1,2	38,5 ± 5,2
270	20,1 ± 3,1	14,6 ± 1,6	16,0 ± 3,1	15,7 ± 2,4	13,9 ± 1,8	12,0 ± 0,3	20,6 ± 0,3	28,8 ± 1,0	39,7 ± 4,9

\* t = controle; b = adição de bagaço; v = adição de vermicomposto; c = adição de cal; bc = adição de bagaço e cal; vc = adição de vermicomposto e cal; a = alagamento; ba = adição de bagaço e alagamento; va = adição de vermicomposto e alagamento.

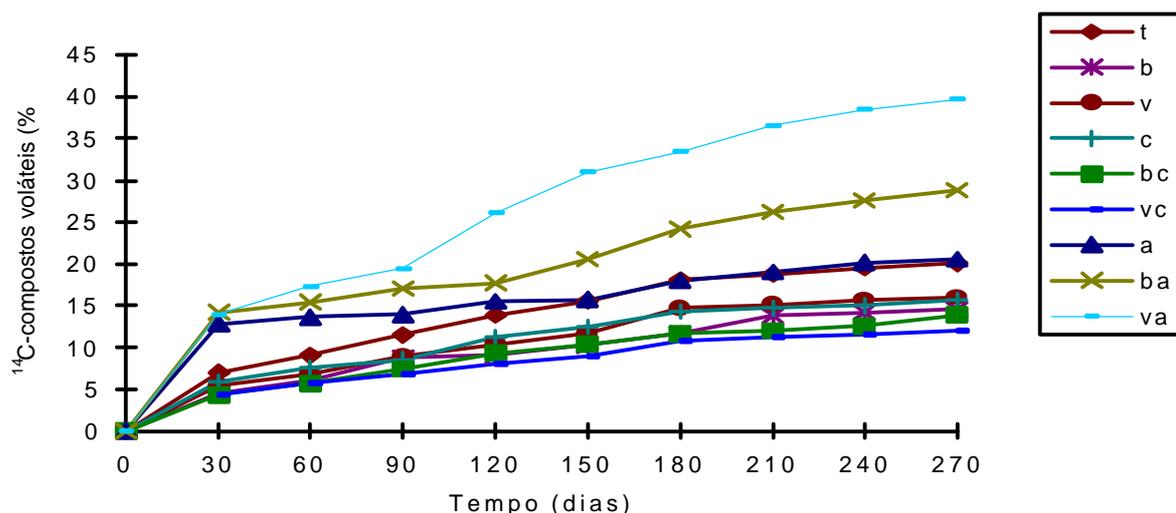


Figura 7:  $^{14}\text{C}$ -compostos volatilizados de terra contaminada com HCB em porcentagem em relação ao  $^{14}\text{C}$ -HCB aplicado, após diferentes tratamentos; t = controle; b = adição de bagaço; v = adição de vermicomposto; c = adição de cal; bc = adição de bagaço e cal; vc = adição de vermicomposto e cal; a = alagamento; ba = adição de bagaço e alagamento; va = adição de vermicomposto e alagamento.

SCHEUNERT e col. (1994) e SCHEUNERT e KORTE (1986) também observaram que, embora a maior parte do HCB tenha permanecido no solo, a principal forma de dissipação deste composto foi por volatilização, em até 6,0% da quantidade inicial.

O aumento da volatilização do  $^{14}\text{C}$ -HCB devido ao alagamento da terra pode ter ocorrido em consequência da baixa hidrossolubilidade e baixa polaridade deste composto. Segundo SPENCER e CLIATH (1974), os compostos pouco polares volatilizam mais rapidamente em solos úmidos porque são removidos dos sítios de adsorção da superfície do solo e substituídos pela água. CHIARENZELLI e col. (1997) também observaram maior volatilização do organoclorado PCB de sedimento submerso do que de sedimento seco.

Além disso, as condições de anaerobiose provocadas pelo alagamento podem propiciar a degradação do HCB através de reações de descloração redutiva, conforme verificado por vários autores. VAN HOOFF e JAFVERT (1996), por exemplo, observaram descloração de 89% de HCB em sedimento após 90 dias em contato com o surfactante “tween 80”. FATHEPURE e col. (1988) demonstraram que o HCB foi desclorado redutivamente em lodo de esgoto anaeróbico, aparentemente por duas rotas, a principal, via pentaclorobenzeno e 1,2,3,5-tetraclorobenzeno, com acúmulo de 1,3,5-triclorobenzeno, e a outra rota via desalogenação seqüencial a 1,2,4,5-tetraclorobenzeno, 1,2,4-triclorobenzeno e diclorobenzenos; estes produtos de degradação não foram posteriormente degradados. PARDUE e col. (1993) observaram descloração redutiva do HCB em pântano, com degradação de cerca de 50% a metabólitos menos clorados; nenhuma descloração redutiva foi observada em amostras esterilizadas indicando que este processo foi mediado microbiologicamente.

Conforme SPENCER e CLIATH (1974), a descloração pode resultar na formação de metabólitos com menor número de átomos de cloro que podem ser mais voláteis do que o próprio composto. SCHEUNERT e col. (1994) e SCHEUNERT e KORTE (1986) observaram que, de fato, compostos que têm menor número de átomos de cloro têm maior taxa de volatilização. Assim, de acordo com o observado neste estudo, a transformação do HCB em metabólitos com menor número de átomos de cloro pode ter facilitado a formação de <sup>14</sup>C-compostos voláteis.

Entretanto, observou-se que a anaerobiose foi fator importante somente logo após o início dos experimentos pois, após 30 dias de incubação a combinação dos tratamentos com matéria orgânica sob alagamento foi fundamental para o aumento da taxa de volatilização. Talvez tenha havido estímulo não só da bioatividade da microbiota endógena, como também proliferação dos microrganismos presentes nas fontes de matéria orgânica adicionadas. GUPTA e BAUMMER (1996), em estudo com o herbicida atrazina, observaram que a sua degradação foi muito maior em solo tratado com cama de frango do que em solo tratado com cama de frango esterilizado ou em solo sem adição de matéria orgânica, indicando que apenas a fonte de matéria orgânica não favoreceu a degradação do herbicida, tendo sido necessária também a ação dos microrganismos presentes nesta fonte de matéria orgânica. Verificou-se ainda que matéria orgânica é importante, talvez até independentemente da forma, pois DREGO e col. (1990) também observaram maior volatilização de hexaclorociclohexano em solo alagado e com adição de adubo verde, do que em solo alagado sem o adubo.

Como, segundo SCHEUNERT (1992), a descloração reductiva é um processo cometabólico, a presença de co-substratos pode ser essencial para o crescimento de microrganismos. HÄGGBLÖM (1992) por exemplo, observou a descloração de hexaclorobenzeno, pentaclorobenzeno, tetraclorobenzeno e triclorobenzeno em culturas de enriquecimento com lactato, glicose, etanol ou isopropanol. Segundo o autor, a adição de fontes de carbono auxiliares podem favorecer tanto as taxas de descloração como o crescimento da população anaeróbia, durante o processo de degradação anaeróbia de fenóis halogenados.

Entretanto, a presença de metabólitos menos clorados entre os  $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis só seria confirmada se a identificação destes compostos tivesse sido possível.

Na análise dos compostos voláteis não radiomarcados por cromatografia gasosa, detectou-se sempre a presença do HCB e dos seus metabólitos em todos os períodos e tratamentos (Fig. 8 e Tab. 5), além de outros compostos não identificados. Entretanto, embora menores porcentagens de HCB tenham sido observadas entre os compostos volatilizados nas amostras alagadas em relação à amostra controle, não houve aumento na porcentagem de metabólitos (Tab. 5). Portanto, a possível descloração reductiva que poderia ser responsável pela formação de  $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis não foi detectada na análise de compostos não radiomarcados.

Também observou-se que as porcentagens de HCB e dos seus metabólitos volatilizados analisados por CG, calculados em relação à quantidade presente inicialmente na terra foram baixas: 0,1 a 0,6% de 1,2,4,5 TCB; 0,2 a 1,3% de 1,2,3,4 TCB; 0,1 a 0,8% de PCB; 0,02 a 0,2% de HCB (Tab. 5). Assim, a porcentagem total dos compostos volatilizados (soma das porcentagens de HCB e metabólitos) formados nos períodos de 0-30, 60-90, 150-180 e 240-270 dias foi menor que a porcentagem dos  $^{14}\text{C}$ -compostos volatilizados nestes mesmos períodos (Fig. 9).

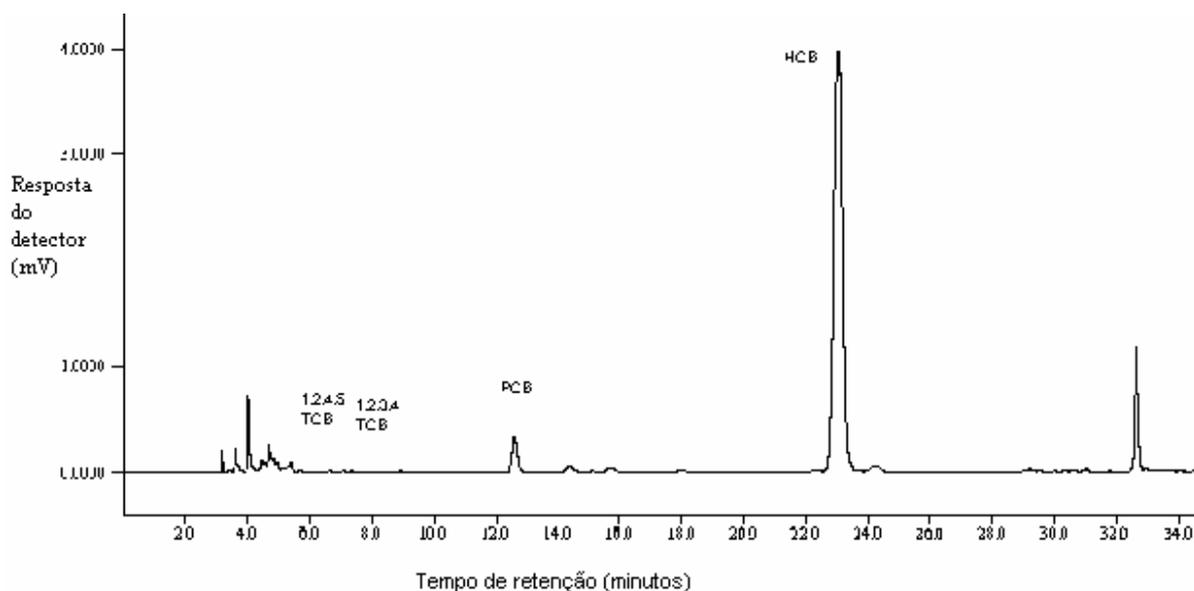


Figura 8: Cromatograma típico dos compostos volatilizados obtido por cromatografia gasosa de uma amostra de terra contaminada com HCB.

Tabela 5: Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$  terra) de compostos volatilizados de terra contaminada com HCB sob diferentes tratamentos e porcentagem em relação à concentração presente inicialmente na terra.

Tempo (dias)	Compostos	Tratamentos*		
		t	ba	va
0 - 30	1,2,4,5 TCB	$0,15 \pm 0,03$ (0,62%)	$0,07 \pm 0,03$ (0,29%)	$0,07 \pm 0,01$ (0,29%)
	1,2,3,4 TCB	$0,08 \pm 0,01$ (1,27%)	$0,03 \pm 0,01$ (0,48%)	$0,03 \pm 0,00$ (0,48%)
	PCB	$2,20 \pm 0,30$ (0,82%)	$0,90 \pm 0,30$ (0,33%)	$0,90 \pm 0,07$ (0,33%)
	HCB	$7,80 \pm 0,70$ (0,23%)	$5,60 \pm 0,10$ (0,16%)	$4,80 \pm 0,80$ (0,14%)
60 - 90	1,2,4,5 TCB	$0,10 \pm 0,05$ (0,42%)	$0,06 \pm 0,03$ (0,25%)	$0,10 \pm 0,06$ (0,42%)
	1,2,3,4 TCB	$0,04 \pm 0,01$ (0,63%)	$0,03 \pm 0,02$ (0,48%)	$0,02 \pm 0,00$ (0,32%)
	PCB	$1,30 \pm 0,20$ (0,49%)	$0,70 \pm 0,30$ (0,26%)	$0,50 \pm 0,20$ (0,19%)
	HCB	$6,80 \pm 0,70$ (0,19%)	$4,90 \pm 1,50$ (0,14%)	$4,30 \pm 0,80$ (0,12%)
150 - 180	1,2,4,5 TCB	$0,05 \pm 0,01$ (0,21%)	$0,02 \pm 0,01$ (0,08%)	$0,02 \pm 0,01$ (0,08%)
	1,2,3,4 TCB	$0,01 \pm 0,00$ (0,16%)	$0,01 \pm 0,00$ (0,16%)	$0,01 \pm 0,00$ (0,16%)
	PCB	$0,50 \pm 0,20$ (0,19%)	$0,20 \pm 0,04$ (0,07%)	$0,20 \pm 0,07$ (0,07%)
	HCB	$5,00 \pm 0,80$ (0,14%)	$1,20 \pm 0,60$ (0,04%)	$1,90 \pm 0,10$ (0,05%)
240 - 270	1,2,4,5 TCB	$0,04 \pm 0,00$ (0,17%)	$0,04 \pm 0,02$ (0,17%)	$0,02 \pm 0,01$ (0,08%)
	1,2,3,4 TCB	$0,01 \pm 0,00$ (0,16%)	$0,01 \pm 0,01$ (0,16%)	$0,01 \pm 0,00$ (0,16%)
	PCB	$0,50 \pm 0,05$ (0,19%)	$0,30 \pm 0,10$ (0,11%)	$0,26 \pm 0,01$ (0,10%)
	HCB	$5,30 \pm 0,70$ (0,15%)	$1,97 \pm 1,60$ (0,06%)	$0,65 \pm 0,30$ (0,02%)

t = controle; ba = adição de bagaço e alagamento; va = adição de vermicomposto e alagamento.

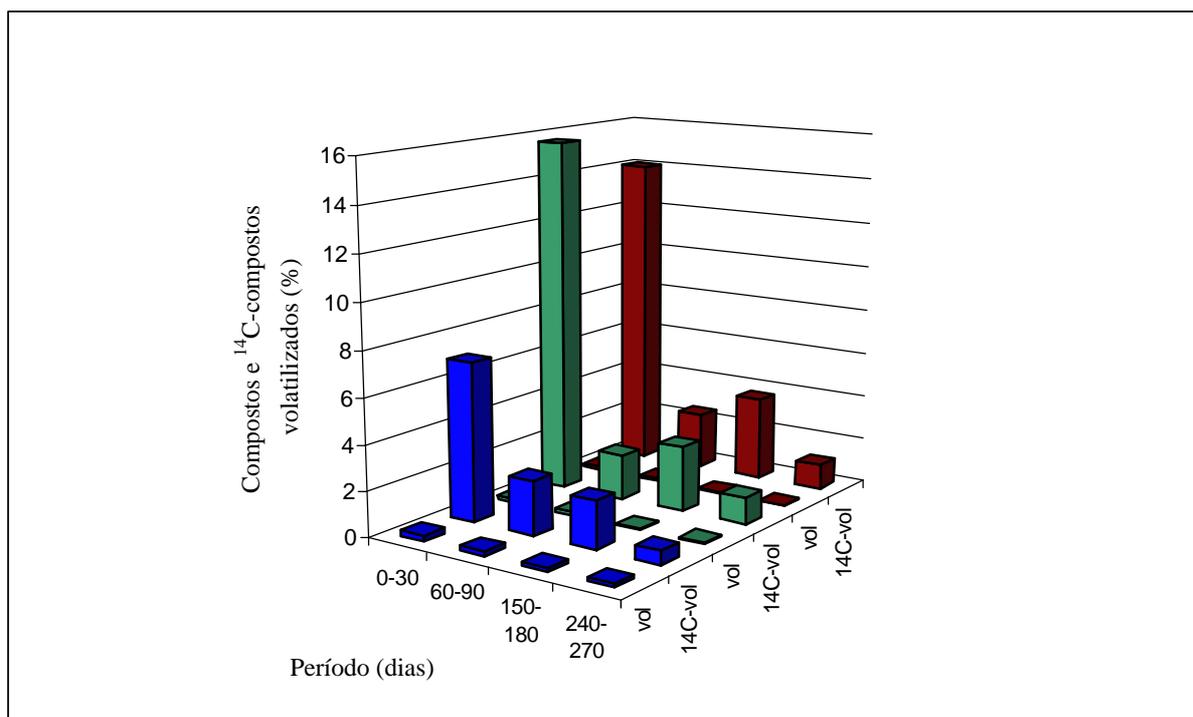


Figura 9: Compostos volatilizados e <sup>14</sup>C-compostos volatilizados de terra contaminada com HCB (porcentagem em relação à concentração presente inicialmente na terra); ■ = controle (t); ■ = adição de bagaço e alagamento (ba); ■ = adição de vermicomposto e alagamento (va).

Um fator que pode explicar esta diferença é o tempo de permanência dos compostos no solo. O <sup>14</sup>C-HCB foi adicionado à terra no momento do experimento, enquanto que os compostos que foram analisados pelo método cromatográfico já estavam presentes no solo há muitos anos. A influência do tempo de permanência no solo sobre a dissipação dos compostos está relacionada e é dependente também dos processos de adsorção/dessorção (HATZINGER & ALEXANDER, 1995). Segundo HATZINGER e ALEXANDER (1995) a adsorção de compostos ao solo e sedimentos começa frequentemente com um processo rápido e reversível seguido de um período de adsorção lenta que perdura por semanas, meses ou anos; a fração dos compostos que sofrem esta lenta adsorção são resistentes à dessorção e tornam-se persistentes no ambiente. O tamanho da fração resistente à dessorção pode aumentar dramaticamente conforme aumenta o tempo de permanência do composto no solo. DZANTOR e col. (1993) observaram maior dissipação de alaclor recentemente incorporado à terra do que de amostra previamente contaminada.

Entretanto, esta diferença na porcentagem de compostos voláteis e  $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis diminuiu com o tempo, sendo que para as amostras controle, esta diferença não foi mais estatisticamente significativa no final do estudo (período de 250-270 dias).

Outro fator que pode explicar a diferença entre a volatilização dos  $^{14}\text{C}$ -compostos e dos compostos que já estavam no solo, é a diferença na concentração destes compostos. A concentração do  $^{14}\text{C}$ -HCB aplicada à terra foi pequena, de  $0,008\mu\text{g g}^{-1}$  terra, o que favoreceu a sua volatilização; por outro lado, a concentração dos resíduos presentes na terra contaminada era de mais de  $3000\mu\text{g g}^{-1}$  terra, dificultando a volatilização. Ou seja, quanto menor a concentração do HCB maior foi a sua taxa de volatilização. SCHEUNERT e col. (1986) também observaram maior volatilização do pentaclorofenol em solo com menor concentração deste composto.

A formação de  **$^{14}\text{C}$ -resíduos ligados** não foi observada neste estudo, possivelmente devido à quantidade de átomos de cloro na molécula do HCB, já que, conforme SCHEUNERT e col. (1985) detectaram, quanto maior o número de átomos de cloro na molécula, menor a taxa de formação de resíduos ligados.

Observou-se também, uma diminuição na quantidade de  **$^{14}\text{C}$ -compostos extraíveis** no decorrer do tempo em todas as amostras, mas de modo mais acentuado nas amostras alagadas (Fig. 10). A porcentagem de  $^{14}\text{C}$ -compostos extraíveis nas amostras alagadas foi significativamente menor que nas amostras controle a partir do T.180; este fato ocorreu nas amostras alagadas e com vermicomposto (va) no T.180 e em todas as amostras alagadas no T.270. O total dos  $^{14}\text{C}$ -compostos que permaneceram no solo é extraível, já que não houve formação de  $^{14}\text{C}$ -resíduos ligados; portanto, a diminuição de  $^{14}\text{C}$ -compostos extraíveis significa que houve uma diminuição da quantidade total de  $^{14}\text{C}$ -compostos no solo. Como esta diminuição dos  $^{14}\text{C}$ -compostos do solo ocorreu concomitantemente ao aumento da quantidade de  $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis, ela pode ser explicada pela transferência dos  $^{14}\text{C}$ -compostos do solo para o ar por volatilização.

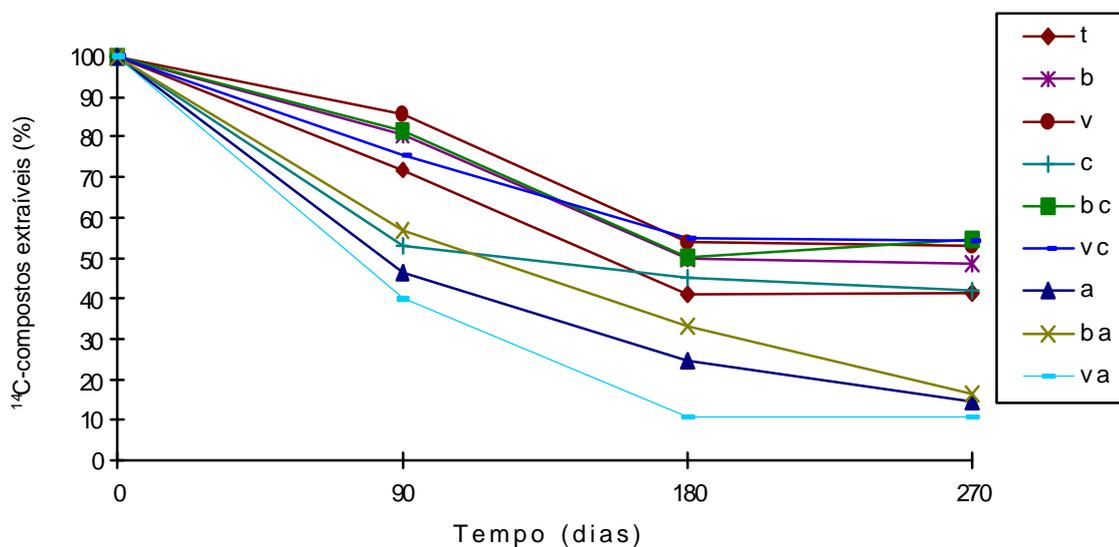


Figura 10:  $^{14}\text{C}$ -compostos extraíveis de terra contaminada com HCB após diferentes tratamentos (porcentagem relação ao  $^{14}\text{C}$ -HCB aplicado); t = controle; b = adição de bagaço; v = adição de vermicomposto; c = adição de cal; bc = adição de bagaço e cal; vc = adição de vermicomposto e cal; a = alagamento; ba = adição de bagaço e alagamento; va = adição de vermicomposto e alagamento.

A **recuperação total de  $^{14}\text{C}$ -compostos**, calculada pela soma de  $^{14}\text{C}$ -compostos extraíveis e  $^{14}\text{C}$ -voláteis variou de 35,5 a 100 % (Tab. 6 e Fig. 11). Nas amostras alagadas (a) após 270 dias de incubação, por exemplo, houve uma recuperação total de 35,3%, sendo 14,7% como  $^{14}\text{C}$ -compostos extraíveis e 20,6%, como  $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis; portanto houve perda, ou seja, não foram detectados, 64,7% do radiocarbono. Por outro lado, na amostra com vermicomposto (v), após este mesmo período de incubação, a recuperação total foi de 69,3%, sendo 53,2 % de  $^{14}\text{C}$ -compostos extraíveis e 16% de  $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis; a perda foi de 30,7%. Assim, as menores taxas de recuperação foram observadas nas amostras alagadas que, como relatado anteriormente, também apresentaram as maiores taxas de volatilização. Portanto, esta baixa recuperação pode ter sido resultado da perda de  $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis para o ar como consequência da baixa eficiência do método de captura de voláteis, que foi testado somente para o  $^{14}\text{C}$ -HCB e não para seus metabólitos. Estes metabólitos são muito mais voláteis que o HCB e por isso podem não ter sido capturados pela lâmina de poliuretano.

Tabela 6: Recuperação dos  $^{14}\text{C}$ -compostos em terra contaminada com HCB e submetida a diferentes tratamentos (porcentagem em relação ao radiocarbono aplicado como  $^{14}\text{C}$ -HCB  $\pm$  desvio padrão).

Tratamentos	tempo (dias)	Recuperação		
		extraíveis	voláteis	total
controle (t)	0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
	90	71,9 $\pm$ 6,5	11,5 $\pm$ 1,9	83,5 $\pm$ 4,7
	180	41,1 $\pm$ 8,2	18,1 $\pm$ 3,2	59,1 $\pm$ 5,3
	270	41,4 $\pm$ 0,5	20,1 $\pm$ 3,1	60,3 $\pm$ 4,0
bagaço (b)	0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
	90	80,7 $\pm$ 7,4	7,7 $\pm$ 1,1	89,5 $\pm$ 8,5
	180	49,7 $\pm$ 11,4	11,7 $\pm$ 1,6	61,4 $\pm$ 11,1
	270	48,8 $\pm$ 5,6	14,6 $\pm$ 1,6	63,4 $\pm$ 4,0
vermicomposto (v)	0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
	90	65,6 $\pm$ 1,0	9,0 $\pm$ 1,3	74,7 $\pm$ 1,8
	180	53,8 $\pm$ 8,0	14,7 $\pm$ 3,0	68,5 $\pm$ 9,3
	270	53,2 $\pm$ 2,4	16,0 $\pm$ 3,1	69,3 $\pm$ 2,6
cal (c)	0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
	90	52,2 $\pm$ 3,2	8,6 $\pm$ 1,3	60,8 $\pm$ 4,3
	180	45,4 $\pm$ 6,3	14,3 $\pm$ 2,2	59,7 $\pm$ 5,0
	270	42,1 $\pm$ 10,5	15,7 $\pm$ 2,4	57,8 $\pm$ 12,6
cal + bagaço (bc)	0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
	90	81,7 $\pm$ 16,2	7,4 $\pm$ 0,8	89,0 $\pm$ 16,2
	180	50,2 $\pm$ 6,0	11,7 $\pm$ 1,0	62,0 $\pm$ 5,1
	270	54,6 $\pm$ 0,3	13,9 $\pm$ 1,7	69,2 $\pm$ 1,5
cal + vermicomposto (vc)	0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
	90	75,5 $\pm$ 11,9	6,9 $\pm$ 0,5	82,4 $\pm$ 11,4
	180	55,1 $\pm$ 9,6	10,8 $\pm$ 0,3	65,5 $\pm$ 9,8
	270	54,4 $\pm$ 6,7	12,0 $\pm$ 0,3	66,3 $\pm$ 7,0
alagamento (a)	0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
	90	46,3 $\pm$ 12,0	14,0 $\pm$ 1,4	60,4 $\pm$ 13,4
	180	24,8 $\pm$ 9,5	18,0 $\pm$ 0,7	39,8 $\pm$ 12,4
	270	14,7 $\pm$ 4,6	20,6 $\pm$ 0,3	35,3 $\pm$ 4,4
alagamento + bagaço (ba)	0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
	90	57,1 $\pm$ 4,9	17,1 $\pm$ 0,3	74,2 $\pm$ 5,0
	180	33,5 $\pm$ 5,8	24,2 $\pm$ 1,4	57,4 $\pm$ 5,3
	270	16,5 $\pm$ 5,6	28,9 $\pm$ 1,0	45,3 $\pm$ 5,6
alagamento + vermicomposto (va)	0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
	90	40,2 $\pm$ 10,6	20,2 $\pm$ 19,4	59,6 $\pm$ 13,0
	180	10,8 $\pm$ 2,0	35,5 $\pm$ 33,5	44,3 $\pm$ 5,5
	270	10,9 $\pm$ 0,9	39,7 $\pm$ 3,4	50,6 $\pm$ 3,5

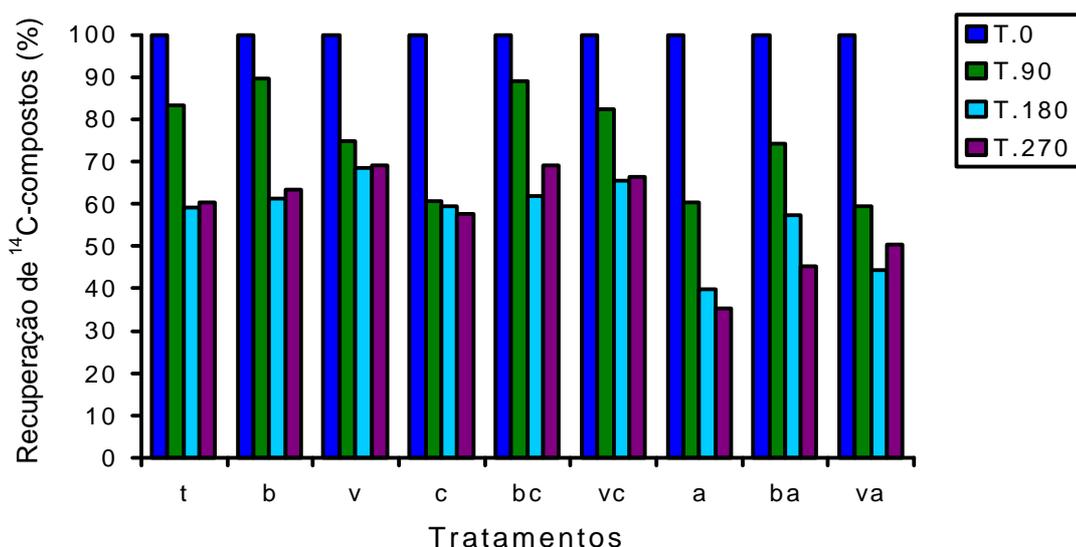


Figura 11: Recuperação total de  $^{14}\text{C}$ -compostos em terra contaminada com HCB após diferentes tratamentos (porcentagem em relação ao radiocarbono aplicado); t = controle; b = adição de bagaço; v = adição de vermicomposto; c = adição de cal; bc = adição de bagaço e cal; vc = adição de vermicomposto e cal; a = alagamento; ba = adição de bagaço e alagamento; va = adição de vermicomposto e alagamento.

A análise cromatográfica para identificação dos compostos extraíveis também foi feita nas amostras controle (t), alagadas com adição de bagaço de cana (ba) ou alagadas com adição de vermicomposto (va). Observou-se primeiramente que as porcentagens dos metabólitos em relação ao HCB foram baixas (0,2%, 0,7% e 7,7%, para o 1,2,3,4 TCB, o 1,2,4,5 TCB e o PCB, respectivamente, na amostra controle do T.0). A concentração de HCB nos resíduos extraíveis variou de 2516 a 3942  $\mu\text{g g}^{-1}$  terra e a dos metabólitos variou de 14 a 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  terra para o 1, 2, 4, 5 TCB, de 3 a 7  $\mu\text{g g}^{-1}$  terra para o 1, 3, 4, 5 TCB e de 163 a 281  $\mu\text{g g}^{-1}$  terra para o PCB (Tab. 3). Entretanto, a análise estatística destes resultados indicou que não houve diferença significativa na concentração de HCB ou de seus metabólitos, nem entre os tratamentos, nem com o decorrer do tempo.

Portanto, não se detectou nem a diminuição na concentração de HCB, nem aumento na concentração dos metabólitos entre os resíduos extraíveis, isto é, não houve degradação dos compostos não radiomarcados já presentes e extraíveis, concordando com os resultados de recuperação de compostos voláteis. Isto prova que não houve degradação dos compostos já presentes (não radiomarcados) e extraíveis.

### **5.3. Atividade e densidade de microrganismos em terra contaminada com hexaclorobenzeno**

A atividade microbiana, medida pela respiração, foi significativamente maior nas amostras com bagaço de cana (b), com bagaço de cana e cal (bc) e com bagaço de cana e alagadas (ba) do que na amostra controle (t), em praticamente todo o período do experimento, conforme indicado pela Tabela 7. Isto prova que o principal estímulo para a atividade microbiana na terra foi promovido pela adição de matéria orgânica na forma de bagaço de cana.

Quanto à densidade microbiana, o número de UFCs de bactérias em T.0 foi significativamente maior em todas amostras com bagaço (b, bc e ba) em relação às amostras controle (t); após 90 dias de incubação, foi maior nas amostras com bagaço e cal (bc) e bagaço e alagamento (ba); após 180 e 270 dias de incubação não houve diferença significativa entre as amostras (Tab. 8 e Fig. 12). O número de UFCs de fungos, também foi significativamente maior nas amostras com bagaço (b) do T.0 ao T.270 e nas amostras com cal e bagaço (bc) nos T.0, T90 e T.180, em relação às amostras controle (Tab. 8 e Fig. 13). Desta forma verificou-se que, tanto para bactérias como para fungos, o aumento do número de UFCs foi causado principalmente pela adição de bagaço de cana de açúcar.

Portanto, a adição de bagaço de cana estimulou tanto a atividade como a densidade de microrganismos na terra contaminada com HCB. Este estímulo persistiu ao longo do tempo no caso da atividade microbiana mas não para a densidade microbiana. Assim, ao final do experimento, não se observou maior densidade de bactérias e fungos nas amostras com bagaço de cana em relação ao controle, talvez devido à diminuição da quantidade de nutrientes.

Tabela 7: Respiração microbiana em terra contaminada com HCB após diferentes tratamentos (mg de CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> de terra 7 dias<sup>-1</sup>).

Tratamentos	Tempo (dias)			
	0	90	180	270
controle (t)	32,3 ± 7,1	31,3 ± 16,2	39,3 ± 15,9	23,3 ± 5,8
bagaço (b)	<b>156,0 ± 31,4*</b>	<b>226,3 ± 40,9</b>	<b>182,0 ± 27,1</b>	<b>96,7 ± 11,5</b>
vermicomposto (v)	56,7 ± 15,3	56,7 ± 5,8	73,3 ± 20,8	70,0 ± 36,1
cal (c)	33,3 ± 11,5	33,3 ± 5,8	30,0 ± 0,0	20,0 ± 10,0
cal + bagaço (bc)	<b>173,3 ± 11,5</b>	<b>186,7 ± 20,8</b>	<b>310,0 ± 62,4</b>	<b>200,0 ± 40,0</b>
cal + vermicomposto (vc)	40,0 ± 0,0	66,7 ± 5,8	46,7 ± 5,8	26,7 ± 15,3
alagamento (a)	18,3 ± 2,9	53,3 ± 15,3	33,3 ± 5,8	33,3 ± 5,8
alagamento + bagaço (ba)	<b>150,0 ± 26,5</b>	<b>116,7 ± 32,1</b>	73,3 ± 5,8	<b>103,3 ± 5,8</b>
alagamento + vermic. (va)	60,0 ± 0,0	63,3 ± 11,5	73,3 ± 5,8	73,3 ± 15,3

\* Negrito = resultados significativamente maiores que os resultados da amostra controle.

Tabela 8: Número de unidades formadoras de colônias (UFC x 10<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> terra) nas amostras de terra contaminada com HCB após diferentes tratamentos.

Microrganismo	Tratamento*	Tempo (dias)			
		0	90	180	270
Bactérias	t	16,0 ± 7,0	4,0 ± 1,0	1,9 ± 0,6	3,2 ± 0,1
	b	<b>152,0 ± 85,0**</b>	9,0 ± 7,0	3,0 ± 3,0	1,5 ± 1,4
	v	23,0 ± 6,0	3,0 ± 1,0	0,5 ± 0,4	1,3 ± 0,1
	c	9,0 ± 5,0	25,0 ± 6,0	2,3 ± 0,6	1,8 ± 0,1
	bc	<b>129,0 ± 90,0</b>	<b>108,0 ± 63,0</b>	18,0 ± 15,0	4,3 ± 2,4
	vc	10,0 ± 4,0	5,0 ± 1,0	6,0 ± 3,0	1,7 ± 0,4
	a	54,0 ± 29,0	7,0 ± 3,0	0,4 ± 0,1	2,9 ± 0,7
	ba	<b>102,0 ± 75,0</b>	<b>94,0 ± 24,0</b>	5,0 ± 1,0	5,7 ± 0,7
	va	41,0 ± 9,0	4,0 ± 0,7	8,5 ± 1,8	2,3 ± 0,4
Fungos	t	0,7 ± 0,2	1,4 ± 0,7	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0
	b	<b>17,1 ± 7,5</b>	<b>166,9 ± 43,6</b>	<b>66,2 ± 58,2</b>	<b>5,0 ± 3,8</b>
	v	2,7 ± 1,1	2,4 ± 0,5	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,1
	c	0,9 ± 0,6	1,3 ± 0,4	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,6
	bc	<b>153,5 ± 25,4</b>	<b>65,0 ± 10,4</b>	<b>88,3 ± 15,4</b>	0,1 ± 0,1
	vc	3,7 ± 1,2	1,9 ± 0,4	1,5 ± 0,6	0,2 ± 0,1
	a	0,4 ± 0,4	1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,0
	ba	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	2,3 ± 0,6	0,4 ± 0,1
	va	1,4 ± 1,4	1,3 ± 0,6	1,0 ± 0,4	0,4 ± 0,3

\* t = controle; b = adição de bagaço; v = adição de vermicomposto; c = adição de cal; bc = adição de bagaço e cal; vc = adição de vermicomposto e cal; a = alagamento; ba = adição de bagaço e alagamento; va = adição de vermicomposto e alagamento.

\*\* Negrito = resultados significativamente maiores que os resultados da amostra controle.

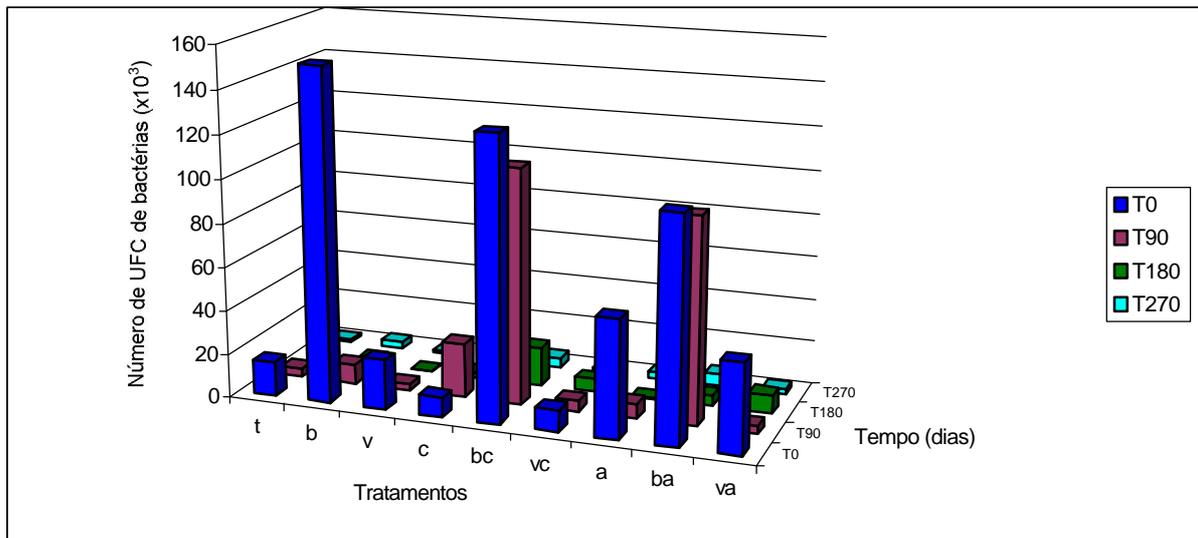


Figura 12: Número de unidades formadoras de colônias de bactérias (UFC x 10<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> de terra) em amostras de terra contaminada com HCB após diferentes tratamentos; t = controle; b = adição de bagaço; v = adição de vermicomposto; c = adição de cal; bc = adição de bagaço e cal; vc = adição de vermicomposto e cal; a = alagamento; ba = adição de bagaço e alagamento; va = adição de vermicomposto e alagamento.

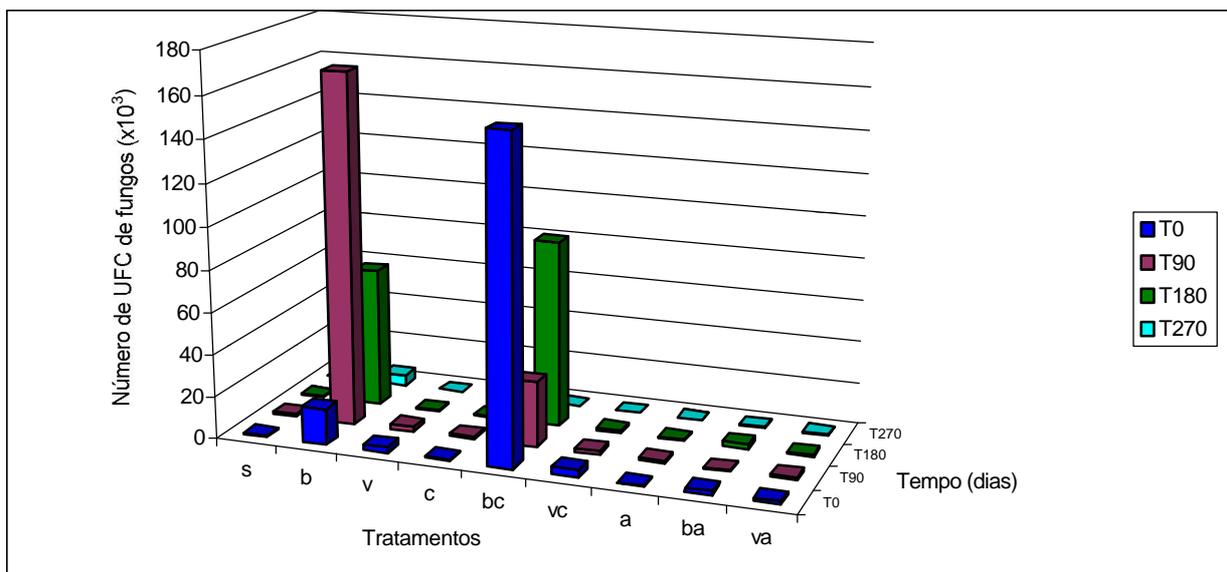


Figura 13: Número de unidades formadoras de colônias de fungos (UFC x 10<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> de terra) em amostras de terra contaminada com HCB após diferentes tratamentos; t = controle; b = adição de bagaço; v = adição de vermicomposto; c = adição de cal; bc = adição de

bagaço e cal; vc = adição de vermicomposto e cal; a = alagamento; ba = adição de bagaço e alagamento; va = adição de vermicomposto e alagamento.

#### 5.4. Relação entre atividade e densidade de microrganismos e formação de <sup>14</sup>C-compostos voláteis em terra contaminada com hexaclorobenzeno

A adição de bagaço de cana de açúcar resultou em aumentos da densidade e da atividade microbiana e, a adição de bagaço de cana ou de vermicomposto sob condições de alagamento da terra resultaram em maior formação de <sup>14</sup>C-compostos voláteis. Entretanto, esses efeitos não são coincidentes no decorrer do tempo. Em T.90 e T.180, a adição de bagaço de cana (b, bc ou ba) resultou em aumento na atividade e na densidade microbiana (bactérias e/ou fungos) mas não resultou em aumento na volatilização. Somente em T.270, tanto a taxa de volatilização como a atividade microbiana foram estimuladas pela adição de bagaço de cana e pelo alagamento da terra (Tab. 9). Entretanto, por ser um caso isolado, não é possível afirmar que, de modo geral, o efeito da adição de matéria orgânica sobre a comunidade microbiana da terra tenha se refletido sobre a volatilização do HCB. Portanto, os aumentos da atividade e da biomassa microbiana provavelmente não tiveram efeito sobre o aumento da volatilização do HCB que, por sua vez, pode ter sido consequência somente de fatores físico-químicos provocados pelo alagamento e de degradação abiótica.

Tabela 9: Efeito dos tratamentos da terra contaminada com HCB sobre a formação de <sup>14</sup>C-compostos voláteis, densidade e atividade microbiana (+ = efeito positivo\*; - = sem efeito ou efeito negativo).

Tempo		Tratamentos**			
		b	bc	ba	va
T.90	<sup>14</sup> C-compostos voláteis	-	-	-	+
	Número de bactérias	-	+	+	-
	Número de fungos	+	+	-	-
	Atividade microbiana	+	+	+	-
T.180	<sup>14</sup> C-compostos voláteis	-	-	-	+
	Número de bactérias	-	-	-	-
	Número de fungos	+	+	-	-
	Atividade microbiana	+	+	-	-
T.270	<sup>14</sup> C-compostos voláteis	-	-	+	+
	Número de bactérias	-	-	-	-
	Número de fungos	-	-	-	-
	Atividade microbiana	+	+	+	-

\* resultados significativamente maiores que os resultados das amostras controle

\*\* b = adição de bagaço; bc = adição de bagaço e cal; ba = adição de bagaço e alagamento; va = adição de vermicomposto e alagamento.

### **5.5. Mobilidade do hexaclorobenzeno em terra contaminada**

De 80% a 86% da quantidade de radioatividade inicialmente aplicada foram recuperadas na camada superior das colunas de terra. Abaixo da zona de aplicação (5 a 25 cm), nenhuma radioatividade foi detectada, provando que não houve mobilidade do  $^{14}\text{C}$ -HCB através da coluna de terra mesmo sob diferentes tratamentos. Assim, conforme esperado, já que a radioatividade foi encontrada somente na camada superior de terra, também não se detectou radiocarbono na água lixiviada das colunas de terra. Resultados semelhantes foram observados por outros autores (SOTIRIOU *et al.*, 1994; HAGENMAIER, *et al.*, 1992) e são previsíveis, devido a baixa hidrossolubilidade do HCB que não se dissolve na solução do solo e, por isso, não é carregado por ela. Além disso, neste caso, nem a adição de matéria orgânica na forma de bagaço de cana nem a elevação do pH favoreceram a solubilização do HCB e o seu carregamento na água, provavelmente porque estes tratamentos não resultaram em aumento da hidrossolubilidade do HCB.

## 6. CONCLUSÕES

I – A adição de matéria orgânica, a alteração de pH e o alagamento da terra não se mostraram eficientes para a remoção de HCB se terra contaminada. Embora a adição de matéria orgânica na forma de bagaço de cana à terra contaminada com HCB tenha provocado um aumento na atividade e na densidade de microrganismos nesta terra, não resultou em mineralização nem em formação de metabólitos do HCB.

II – A presença de resíduos de HCB no solo pode levar à contaminação do ar, pois o alagamento da terra com adição de matéria orgânica levou a um aumento na formação de  $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis em até duas vezes. Porém, não se observou volatilização dos compostos que já estavam presentes no solo contaminado.

III – A possibilidade de contaminação de água subterrânea não foi detectada pois não ocorreu mobilidade de  $^{14}\text{C}$ -compostos mesmo após adição de matéria orgânica ou alteração de pH.

## 7. RESUMO

A contaminação ambiental provocada pelo despejo de resíduos industriais e pela aplicação de agrotóxicos pode resultar no desequilíbrio dos ecossistemas, além de causar danos diretos à saúde humana. No Brasil, existem várias áreas contaminadas com resíduos industriais, tais como o hexaclorobenzeno (HCB), um composto organoclorado usado no passado como fungicida, mas que atualmente tem seu uso proibido devido a sua alta persistência no ambiente e alta capacidade de bioacumulação. Este estudo verificou a possibilidade de remoção de resíduos de HCB do solo contaminado além da possibilidade de contaminação do ar e da água por este composto. Verificou-se: a) o efeito de adição de matéria orgânica, alteração de pH e alagamento da terra sobre a comunidade microbiana e a degradação do HCB; b) a volatilização do HCB e, c) a lixiviação deste composto. A contaminação inicial da terra foi determinada através de extração das amostras de terra contaminada e análise dos extratos por cromatografia gasosa (CG). Alterações das características da terra foram promovidas pela adição de matéria orgânica (bagaço de cana de açúcar ou vermicomposto), adição de Cal ou alagamento das amostras de terra contaminada, além de combinações destes tratamentos. Cada amostra de terra, colocada em frascos de vidro, recebeu uma solução de HCB radiomarcado ( $^{14}\text{C}$ -HCB). A mineralização do  $^{14}\text{C}$ -HCB foi analisada através da captura do  $\text{CO}_2$  proveniente das amostras de terra por uma solução de hidróxido de potássio e quantificação do  $^{14}\text{CO}_2$  por Espectrometria de Cintilação Líquida (ECL). A volatilização do  $^{14}\text{C}$ -HCB foi analisada através da captura dos compostos voláteis por lâmina de poliuretano, extração desta lâmina e análise do extrato por ECL, para quantificação dos  $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis, e por CG, para quantificação dos compostos voláteis (HCB e metabólitos). A formação de  $^{14}\text{C}$ -resíduos ligados e de metabólitos do HCB nas amostras de terra foi analisada através da extração destas amostras e posterior análise da terra extraída por ECL e do extrato por CG. Cada amostra de terra também foi analisada quanto à atividade microbiana, medida através da respiração dos microrganismos, e quanto a densidade microbiana, através da metodologia de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias e fungos. A mobilidade e a lixiviação do HCB foram estudadas através de percolação de água em tubos de PVC contendo amostras de terra contaminada tratadas com bagaço de cana de açúcar e/ou cal e solução de  $^{14}\text{C}$ -HCB, dispostas sobre amostras de terra não contaminada; os tubos foram seccionados e a terra e a água lixiviada foram analisadas por ECL. O período dos estudos foi de 270 dias. A determinação da contaminação inicial da terra indicou a presença do HCB ( $3400 \mu\text{g g}^{-1}$  terra) e dos metabólitos

1,2,4,5 TCB ( $24 \mu\text{g g}^{-1}$  terra), 1,2,3,4 TCB ( $6 \mu\text{g g}^{-1}$  terra) e PCB ( $267 \mu\text{g g}^{-1}$  terra). A volatilização de  $^{14}\text{C}$ -compostos ocorreu em todas as amostras, principalmente nas amostras alagadas e com adição de matéria orgânica (29% a 40 %, após 270 dias). O alagamento favoreceu a volatilização provavelmente devido a baixa hidrossolubilidade do HCB e, a presença de matéria orgânica pode ter favorecido a formação de metabólitos mais voláteis através do estímulo à descloração redutiva, que ocorre sob condições de anaerobiose. Entretanto, a descloração redutiva não foi comprovada pois não houve formação nem aumento na concentração de metabólitos do HCB entre os compostos volatilizados. Houve uma diminuição na quantidade de  $^{14}\text{C}$ -compostos extraíveis no decorrer do tempo em todas as amostras, mas a concentração de HCB ou de seus metabólitos permaneceu constante independente do tratamento. A atividade e a densidade microbiana foram maiores nas amostras com bagaço de cana de açúcar mas não tiveram efeito sobre a volatilização ou a degradação do HCB. Não ocorreu mineralização ou mobilidade do  $^{14}\text{C}$ -HCB na terra contaminada e nem a formação de  $^{14}\text{C}$ -resíduos ligados. Portanto, a adição de matéria orgânica, a alteração de pH e o alagamento da terra não se mostraram eficientes para a remoção do HCB de terra contaminada. Além disso, a ocorrência de formação de  $^{14}\text{C}$ -compostos voláteis e a ausência de lixiviação do  $^{14}\text{C}$ -HCB indicaram que a presença de resíduos de HCB no solo pode levar à contaminação do ar mas não de água subterrânea.

## 8. ABSTRACT

The environmental contamination by industrial wastes and pesticides can cause harmful effects to ecosystem besides direct human health damages. In Brasil, there are several areas contaminated with industrial wastes like the hexachlorobenzene (HCB), a chlorinated organic compound used in the past as fungicide but that has no longer been produced due to its high persistence in the environment and bioaccumulation potential. This study verified the possibility of HCB residues removal from contaminated soil besides the air and water contamination risk. It was verified: a) the effect of organic matter addition, pH change and flooding of the contaminated soil on the microbial community and HCB degradation; b) HCB volatilization and, c) HCB leaching. The initial soil contamination was determined by extraction of contaminated soil samples and analysis of the extract by Gaseous Chromatography (GC). Soil properties changes were promoted by organic material addition (sugar cane bagasse or earthworm humus), lime addition and flooding of the soil samples besides a combination of these treatments. Each soil sample, placed in glass flasks, was treated with radiolabelled HCB solution ( $^{14}\text{C}$ -HCB). The  $^{14}\text{C}$ -HCB mineralization was analyzed by the entrapment of  $\text{CO}_2$  originated from the soil samples by potassium hydroxide solution and quantification of the  $^{14}\text{CO}_2$  by Liquid Scintillation Spectrometry (LSS). The  $^{14}\text{C}$ -HCB volatilization was analyzed by the entrapment of the volatiles compounds by a polyurethane lamina, extraction of this lamina and analysis of the extract by LSS, for  $^{14}\text{C}$ -volatile compounds quantification, and by GC, for volatile compounds (HCB and metabolites) quantification. The  $^{14}\text{C}$ -bound residues and the HCB metabolites of the soil samples were analyzed by the extraction of these samples and further analysis of the extracted soil by LSS and analysis of the extract by GC. Each soil sample was analyzed with regard to its microbial activity by microbial respiration measure and microbial density by the plate count technique. The mobility and leaching of the HCB were studied by water percolation through PVC tubes containing contaminated soil treated with sugar cane bagasse and/or lime and  $^{14}\text{C}$ -HCB placed over no contaminated soil; the tubes were cut in sections and the soil and the leached water were analyzed by LSS. All these studies lasted 270 days. The initial soil contamination determination indicated the presence of the HCB ( $3400 \mu\text{g g}^{-1}$  soil) and the metabolites 1,2,4,5 TCB ( $24 \mu\text{g g}^{-1}$  soil), 1,2,3,4 TCB ( $6 \mu\text{g g}^{-1}$  soil) and PCB

(267  $\mu\text{g g}^{-1}$  soil). The volatilization of the  $^{14}\text{C}$ -compounds occurred in all the samples, mainly in the flooded samples with organic matter addition (29% to 40% after 270 days). The flooding enhanced the volatilization due the low HCB water-solubility and, the presence of organic material can have favoured the formation of metabolites more volatile than the HCB due to reductive dechlorination that occurs under anaerobic conditions. But the reductive dechlorination occurrence was not proved as there was no formation or increase in metabolite concentration. There was a decrease in  $^{14}\text{C}$ -extractable compounds quantity through the time in all the samples but the HCB and metabolites concentrations keep constant independently of the treatment. The microbial activity and density were higher in the samples with sugar cane bagasse but it did not affected the HCB volatilization or degradation. The  $^{14}\text{C}$ -HCB mineralization and the  $^{14}\text{C}$ -bound residues formation did not occur. The mobility of the  $^{14}\text{C}$ -HCB was not observed too. Therefore, the organic material addition, the pH change and the soil flooding were not efficient to HCB removal from the contaminated soil. And, the occurrence of the volatilization of  $^{14}\text{C}$ -compounds and the absence of  $^{14}\text{C}$ -HCB leaching indicated that the presence of HCB residues in the soil can result in contamination of air but not the ground water.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCOCK, R. E.; JONES, K. C. New directions “new” organic compounds in the environment. **Atmospheric Environment**, v. 33, p. 1645 – 1646, 1999.
- ALEXANDER, M. **Introduction to Soil Microbiology**. 2. ed. New York, Santa Bárbara, London, Sydney, Toronto, John Wiley & sons, 1977. p. 16 - 72.
- ANDERSON, T.-H.; JOERGENSEN, R. G. Relationship between SIR and FE estimates of microbial biomass C in deciduous forest soils at different pH. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 1033-1042, 1997.
- ANDRÉA, M. M.; MATALLO, M. B.; TOMITA, R.Y.; LUCHINI, L. C. Effect of the temperature on dissipation of [<sup>14</sup>C]atrazine in Brazilian soil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 95-100, 1997.
- ANDRÉA, M. M.; PETINELLI JR., A. Efeito de aplicação de agrotóxicos sobre a biomassa e a respiração de microrganismos de solos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, p. 223-228, 2000.
- ANDRÉA, M. M.; PAPINI, S.; NAKAGAWA, L. E. Optimizing microwave-assisted solvent extraction (MASE) of pesticides from soil. **Journal of Environmental Science and Health, part B**. v. 36, p. 87-93, 2001.
- BAILEY, R. E. Global hexachlorobenzene emissions. **Chemosphere**, v. 43, p. 167 – 182, 2001.
- BARRIUSO, E.; HOUOT, S.; SERRA-WITTLING, C. Influence of Compost Addition to soil on the Behaviour of Herbicides. **Pesticide Science**, v. 49, p. 65 - 75, 1997.
- BEEBY, A. **Applying Ecology**. Chapman & Hall. London, 1993, p.373.

- BROCKELMANN, A. M.; NAKAYAMA, C. R.; BARBIERI, S. M. Caracterização preliminar de um solo contaminado com organoclorados. **In: Resumos da I Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente**. Instituto de Química, UNICAMP, 1996. p. 59 - 63.
- BRO-RASMUSSEN, F. Hexachlorobenzene: an ecological profile of an organochlorine compound. **In: MORRIS, C. R.; CABRAL, C. R. Hexachlorobenzene: Proceedings of an International Symposium** (IARC Scientific Publications, n. 77) Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1986.
- BRO-RASMUSSEN, F. Contamination by persistent chemicals in food chain and human health. **The Science of Total Environment**, v. 188, p. S45 – S60, 1996.
- CHAABAN, M. A. Hazardous waste source reduction in materials and processing technologies. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 119, p. 336 – 343, 2001.
- CHIARENZELLI, J. R.; SCRUDATO, R. J.; WUNDERLICH, M. L.; OENGA, G. N.; LASHKO, O. P. PCB volatile loss and the moisture content of sediment during drying. **Chemosphere**, v. 34, p. 2429 – 2436, 1997.
- DRAFT INTERNATIONAL STANDART. ISO/DIS 11274. **International Organization for Standardization**, p. 1-30, 1992.
- DREGO, J.; MURTHY, N. B. K.; RAGHU, K. [<sup>14</sup>C]- $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in a flooded soil with green manuring. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 38, p. 266 - 268, 1990.
- DZANTOR, E. K.; FELSOT, A. S.; BECK, M. J. Bioremediating herbicide-contaminated soils **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 39/40, p. 621 – 630, 1993.
- EDWARDS, R.; FERRY, D. G.; TEMPLE, W. A. P. Fungicides and related compounds. **In: HAYES Jr., W. J.; LAWS Jr., E. R. eds. Handbook of Pesticide Toxicology**, v. II.

Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1991.  
p. 1409 - 1410. .

EGELER, P.; RÖMBKE, J.; MELLER, M.; KNACKER, Th.; FRANKE, C.; STUDINGER, G.;  
NAGEL, R. Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms  
(oligochaeta) under standardized laboratory conditions. **Chemosphere**, v. 35, p. 835 – 852,  
1997.

FABRIS, C.; MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; OKINO, L. K. Levantamento de  
microrganismos de solos contaminados com organoclorados. **In: Resumos da I Reunião  
Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente**. Instituto de Química,  
UNICAMP, 1996. p. 64 - 68.

FATHEPURE, B. Z.; TIEDJE, J. M.; BOYD, S. A. Reductive dechlorination of  
hexachlorobenzene to tri- and dichlorobenzene in anaerobic sewage sludge. **Applied and  
Environmental Microbiology**, v. 54, p. 327 – 330, 1988.

FOURNIER, J. C.; HORMATALLAH, A.; COLLU, T.; FRONCEK, B. Labelling of microbial  
biomass with radioactive substrates as a means to estimate pesticide effects in soil. **The  
Science of Total Environment**, v. 123/124, p. 325 – 332, 1993.

GORING, C. A.; LASKOWSKI, D. A.; KAMAKER, J. W.; MEIKLE, R. W Principles of  
pesticide degradation in soil. **In: HAQUE, R.; FREED, C. H. Environmental Dynamics of  
Pesticides**, Plenum Press, New York, London, 1975. p. 135 – 172.

GREENHALGH, R. Definition of persistence in pesticide chemistry. **Pure and Applied  
Chemistry**, v. 52, p. 2563 – 2566, 1980.

GUPTA, G.; BAUMMER III, J. Biodegradation of atrazine in soil using poultry litter. **Journal  
of Hazardous Materials**, v. 45, p. 185 - 192, 1996.

- HAGENMAIER, H.; SHE, J.; LINDING, C. Persistence of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in contaminated soil at Maulach and Rastatt in southwest Germany. **Chemosphere**, v. 25, p. 1449 - 1456, 1992.
- HÄGGBLUM, M. M. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 29 – 72, 1992.
- HAIMI, J. Decomposer animals and bioremediation of soils. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 233 – 238, 2000.
- HATZINGER, P. B.; ALEXANDER, M. Effect of aging chemicals in soil on their biodegradability and extractability. **Environmental Science and Technology**, v. 29, p. 537 – 545, 1995.
- ISENSEE, A. R.; HOLDEN, E. R.; WOOLSON, E. A.; JONES, G. E. Soil persistence and aquatic bioaccumulation potential of hexachlorobenzene (HCB). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 24, p. 1210 - 1214, 1976.
- JOHNSON, L. F.; CURL, E. A.; BOND, J. H.; FRIBOURG, H. A. **Methods for Studying Soil Microflora-Plant Disease Relationships**. Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1960. 178p.
- KIËHL, E. J. **Manual de Edafologia. Relação solo-planta**. Editora Agronômica Ceres. São Paulo, 1979. p. 90 - 91.
- KLUTE, A. A physical and mineralogical methods. **In: KLUTE, A., ed. Methods of Soil Analysis**. American Society of Agronomy, Inc.; Soil Science Society of America, Inc. publisher, Madison, Wisconsin, USA, 1986.
- KREWSKY, D.; COLIN, D.; VILLENEUVE, D. Environmental Risk Assessment: hexachlorobenzene. **In: MORRIS, C. R.; CABRAL, C. R. Hexachlorobenzene: Proceedings of an International Symposium** (IARC Scientific Publications, n. 77) Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1986. p. 621-628.

- KUIPER-GOODMAN, T.; GRANT, D. L. Subchronic toxicity of hexachlorobenzene in the rat: clinical, biochemical, morphological and morphometric findings. **In: MORRIS, C. R.; CABRAL, C. R. *Hexachlorobenzene: Proceedings of an International Symposium*** (IARC Scientific Publications, n. 77) Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1986. p. 343 – 346.
- LEVINE, R.. Recognized and possible effects of pesticides in humans. **In: HAYES Jr., W. J.; LAWS Jr, E. R. *Handbook of Pesticide Toxicology***, v. 1. Academic Press, New York, Boston, London, Tokyo, Toronto, 1991. p. 275 – 360.
- LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. Dinâmica de agrotóxicos no ambiente. **In: Programa de Defesa Ambiental Rural – Textos Orientadores**. Ministério do Meio Ambiente, Fórum Nacional de Secretários de Agricultura, 2002. p 27 – 44.
- LUNDQUIST, E. J.; SCOW, K. M.; JACKSON, L. E.; UESUGI, S. L.; JOHNSON, C. R. Rapid response of soil microbial communities from conventional, low input and organic farming systems to a wet/dry cycle. ***Soil biology and Biochemistry***, v. 31, p. 1661 - 1675, 1999.
- MANSOUR, M.; SCHEUNERT, I.; VISWANATHAN, R.; KORTE, F. Assessment of the persistence of hexachlorobenzene in the ecosphere. **In: MORRIS, C. R.; CABRAL, C. R. *Hexachlorobenzene: Proceedings of an International Symposium*** (IARC Scientific Publications, n. 77) Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1986. p – 53 – 59.
- MATHEUS, D. R. **Biorremediação de solos contaminados compostos organoclorados e biodegradação de hexaclorobenzeno por basidiomicetos brasileiros**. Rio Claro, 1998. 166p. Tese (Mestrado). Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro: Universidade Estadual Paulista.
- MATHEUS, D. R.; Bononi, V. L. R.; Machado, K. M. G. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***, v.16, p. 415 – 421, 2000.

- MATSUMURA, F. Degradation of pesticides of the environment by microorganisms and sunlight. In: MATSUMURA, F.; MURTI, C. R. K. **Biodegradation of Pesticides**. Plenum Press, New York, London, 1982. p. 67 – 87.
- MEIER, P. C.; ZÜND, R. E. **Statistical Methods in Analytical Chemistry**. New York, N.Y., John Wiley & Sons, 1993.
- MESQUITA, T. B.; RÜEGG, E. F. Influência de agentes tenso-ativos na detecção de radiação beta. **Ciência e Cultura**, v. 36, p. 446 - 450, 1984.
- MIKESELL, M. D.; BOYD, S. A. Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 861 - 865, 1986.
- MORRIS, C. R.; CABRAL, J. R. P. **Proceedings of an International Symposium (IARC Scientific Publications, n. 77)**, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1986.
- NAIR, A.; SAMUEL, T.; PILLAI, M. K. K. Behaviour of DDT in three soils exposed to solar radiations under different conditions. **Pesticide Science**, v. 34, p. 333 - 340, 1992.
- NAKAGAWA, L. E. **Comportamento do herbicida atrazina em solo: formação e liberação de resíduos ligados**. São Paulo, 1997. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- ODUM, E. P. **Ecology: a Bridge Between Science and Society**. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, 1997, p. 149.
- PARDUE, J. H.; DE LAUNE, R. D.; ADRIAN, D. D.; PATRICK Jr., W. H. Reductive dechlorination of hexachlorobenzene in wetland soils. **In: Sorption and Degradation of Pesticides and Organic Chemicals in Soil**. SSSA Special Publication, n. 32, 1993. p. 145 – 152.

- POLPRASERT, L. R. J.; LIYANAGE, C. Hazardous waste generation and processing. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 16, p. 213 – 226, 1996.
- RICHARDSON, M. Pesticides – friend or foe? **Water Science and Technology**, v. 37, p. 19 - 25, 1998.
- ROMANTSCHUK, M.; SARAND, I.; PETÄNEN, T.; PELTOLA, R.; JONSSON-VIHANNE, M.; KOIVULA, T.; YRJÄLÄ, K.; HAAHTELA, K. Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 179 – 185, 2000.
- RUUS, A.; UGLAND, K. I.; ESPELAND, O.; SKAARE, J. U. Organochlorine contaminants in a local marine food chain from Jarfjord, Northern Norway. **Marine Environmental Research**, v. 48, p. 131 – 146, 1999.
- SATO, K.; LEE, S.-B. Effect of glycine, glutamate and glucose on proliferation of PCP (pentachlorophenol)-degrading microorganisms in soil. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 42, n. 4, p. 905 - 910, 1996.
- SCHEUNERT, I.; TOPP, E.; SCHIMITZER, J.; KLEIN, W.; KORTE, F. Formation and fate of bound residues of [<sup>14</sup>C]-benzene and [<sup>14</sup>C]- chlorobenzenes in soil and plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.9, p. 159 - 170, 1985.
- SCHEUNERT, I.; KORTE, F. Comparative laboratory and outdoor studies on the behaviour of <sup>14</sup>C-labelled chlorinated benzenes in soil. **In: ASSINK, J. W.; VAN DEN BRINK, W. J. eds. Contaminated Soil.** Martinius Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster, 1986. p.141 – 143.
- SCHEUNERT, I.; QIAO, Z.; KORTE, F. Comparative studies of the fate of atrazine-<sup>14</sup>C and pentachlorophenol-<sup>14</sup>C in various laboratory and outdoor soil-plant systems. **Journal of Environmental Science and Health**, part B, v. 21, p. 457 – 485, 1986.

- SCHEUNERT, I. Transformation and degradation of pesticides in Soil. **In:** EBING, W. ed. **Terrestrial Behaviour of Pesticides.** Springer Verlag, 1992. p. 25 - 75.
- SCHEUNERT, I.; MANSOUR, M.; ANDREAUX, F. Binding of organic pollutants to soil organic matter. **International Journal Environmental Analytical Chemistry**, London, v. 46, p. 189 - 199, 1992.
- SCHEUNERT, I. Transport and transformation of pesticides in soil. **In:** MANSOUR, M. **Fate and Prediction of Environmental Chemicals in Soil, Plants, and Aquatic Systems.** Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1993. p. 1 - 22.
- SCHEUNERT, I.; DÖRFLER, U.; SCHNEIDER, R. P.; SCHROLL, R.; ZSOLNAY, A. Ecological test procedures for organic xenobiotics in terrestrial systems. **In:** MANSOUR, M. **Fate and Prediction of Environmental Chemicals in Soil , Plants, and Aquatic Systems.** Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1993. p. 159 – 167.
- SCHEUNERT, I.; TOPP, E.; ATTAR, A.; KORTE, F. Uptake pathways of chlorobenzenes in plants and their correlation with N-octanol/water partition coefficients. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 27, p. 90 - 104, 1994.
- SCHINNER, F.; ÖBLINGER, R.; KANDELER, E.; MARGESIN, R. **Methods in Soil Biology.** Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1996. p. 20 – 26.
- SETHUNATHAN, N.; ADHYA, T. K.; RAGHU, K. Microbial degradation of pesticides in tropical soils. **In:** MATSUMURA, F; MURTI, C. R. K. **Biodegradation of Pesticides.** Plenum Press, New York, 1982. p.91 - 115.
- SOTIRIOU, N.; MOZA, P.; SCHEUNERT, I.; FEICHT, E. A. Uptake and fate of <sup>14</sup>C-hexachlorobenzene in tobacco and wheat plants. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 3, p. 175 - 180, 1994.
- SPENCER, W. F.; CLATH, M. M. Vaporization of chemicals. **In:** HAQUE, R.; FREED, V. H. **Environmental Dynamics of Pesticides**, 1974. p. 61 - 78.

- STAN, H-J. Combined gas spectrometry-mass spectrometry. **In: DAS, K. G. ed. Pesticide Analysis.** New York and Basel, 1981. p. 369 - 423.
- STRIK, J. J. T. W. A. Subacute toxicity of hexachlorobenzene. **In: MORRIS, C. R.; CABRAL, C. R. Hexachlorobenzene: Proceedings of an International Symposium** (IARC Scientific Publications, n. 77) Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1986. p. 335 – 342.
- SUFLITA, J. M.; HOROWITZ, A.; SHELTON, D. R.; TIEDJE, J. M. Dehalogenation: a novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. **Science**, v. 218, 1982.
- TOPP, E.; SCHEUNERT, I.; KORTE, F. Kinetics of the uptake of <sup>14</sup>C-labelled chlorinated benzenes from soil by plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 17, p. 157 – 166, 1989.
- VAN DER WERF, H. M. G. Assessing the impact of pesticides on the environment. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 60, p. 81 - 96, 1996.
- VAN HOOFF, P. L.; JAFVERT, C. T. Reductive dechlorination of chlorobenzenes in surfactant-amended sediments slurries. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n.11, p. 1914 - 1924, 1996.
- VERSCHUEREN, K. **Handbook of environmental data on organic chemicals**, v. 2, John Wiley and sons, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, 2001. p. 1226 - 1231.
- VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística Experimental**. São Paulo: Atlas, 1989. 179 p.
- VOOS, G.; GROFFMAN, P. M. Relationships between microbial biomass and dissipation of 2,4-D and dicamba in soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, p.106 - 110, 1997.

WILKEN, R.-D.; WIRTH, H. The adsorption of hexachlorobenzene on naturally occurring adsorbents in water. **In:** MORRIS, C. R.; CABRAL, C. R. **Hexachlorobenzene: Proceedings of an International Symposium** (IARC Scientific Publications, n. 77) Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1986. p. 75 – 81.

WILSON C.; TISDELL, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. **Ecological Economics**, v. 39, p. 449 - 462, 2001.