

RICARDO RIBEIRO DA SILVA

**Biorremediação de solos contaminados com
organoclorados por fungos basidiomicetos
em biorreatores**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração
de Plantas Avasculares e Fungos.

SÃO PAULO
2009

RICARDO RIBEIRO DA SILVA

**Biorremediação de solos contaminados com
organoclorados por fungos basidiomicetos
em biorreatores**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração
de Plantas Avasculares e Fungos.

ORIENTADOR: PROF. DR. DÁCIO ROBERTO MATHEUS

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Silva, Ricardo Ribeiro da

S586b Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em biorreatores / Ricardo Ribeiro da Silva -- São Paulo, 2009. 186 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2009

Bibliografia.

1. Hexaclorobenzeno. 2. Scale up. 3. Oxidação química. I. Título

CDU: 547.539.261

*Dedico a meu irmão,
Marco Antonio Ribeiro da Silva por
ter honrado a palavra de meu pai,
Antonio Ribeiro da Silva
perante ao grande homem que foi
Júlio Antonio Ribeiro, meu avô.*

*A todos aqueles que estudam e se
interessam em buscar alternativas
para proteção e recuperação do
meio ambiente.*

Agradeço

A Deus, pelas oportunidades que tenho em minha vida e pelas pessoas que por ela passaram, as quais sempre prezarei e, principalmente, por ter nascido na família em que nasci.

A meus pais, Antonio Ribeiro da Silva e Natalina Gertrudes Ribeiro, por todos os ensinamentos, toda dedicação e amor constantes. Amo muito vocês, meus maiores exemplos de vida.

A meus irmãos, Ivani, Ana Maria e Marco Antônio, agradeço por todo o apoio e incentivo fundamentais durante todo o meu trajeto. O amor de vocês é a pura energia para minha vida.

Ao Prof. Dr. Dácio Roberto Matheus, pela orientação, amizade, confiança e companheirismo e, principalmente, pelo incentivo na etapa final do trabalho.

À Profa. Dra. Kátia Maria Gomes Machado e Dra. Vera Maria Valle Vitali, pela amizade e todas contribuições, durante o desenvolvimento do presente trabalho.

A Sérgio Luiz Moreira Neto, por toda ajuda, toda força e incentivo. Apesar de sua baixa estatura és um grande amigo.

A Nara Ballaminut, Marina Bianchini de Salvi, Glauciane Danusa Coelho, Willian Seite Okada, Luciana Jandelli Gimenes, Ana Paula Paranhos, Alexandra Lenk Gomes e Maíra Cortellin Abrahão por toda ajuda e apoio durante o desenvolvimento da fase prática em laboratório e, principalmente, pela amizade e carinho de todos vocês.

A Cida e D. Josefa Ana Ribeiro (*in memorian*) pela organização do laboratório e pelos exemplos de carinho e humildade.

Aos pesquisadores e funcionários da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica de São Paulo, em especial a Adriana de Mello Gugliotta, Rosely Ana Piccolo Grandi, Iracema Helena S. Crusius, José Ivanildo de Souza, Carmen Lídia A.P. Zotarelli pelos incentivos e contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Às telefonistas, Amélia e Janete, pelo apoio e pelos “cafezinhos” e as rápidas conversas freqüentemente interrompidas pelo telefone do Instituto;

À Seção de Pós-Graduação, em especial a Marcinha, por toda ajuda e esclarecimentos

Aos amigos da faculdade Ana Paula de Oliveira, Claudia Marques Rosa, Flávio Martinez Nogueira, e Rosane de Oliveira, pelas constantes mensagens de apoio e incentivo, mesmo que eu sempre estivesse devendo “aquela visita”.

Aos grandes amigos Messias e João Roberto pela amizade e ajuda na manutenção do computador, que inexplicavelmente quebra nos momentos mais críticos.

Ao amigão Adalberto Pinheiro Lima, o Betão, por toda força e amizade sempre sincera.

A Rosmary De Nadai, do Centro de Pesquisas da Rhodia, em Paulínia, pelas contribuições dadas e fornecimento de materiais no decorrer do trabalho;

À FUNDEPAG, em convênio com a Rhodia do Brasil Ltda., pelo financiamento deste trabalho.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

À minha esposa Ana Paula Malatesta Lopes pelo imenso amor, pelo enorme incentivo, pelo constante carinho, pela compreensão dos dias roubados (...) Seu apoio foi fundamental para conclusão desse trabalho. Agradeço a Nossa Senhora por ter me dado o privilégio de ter você ao meu lado, enfim... agradeço por você existir.

Índice

1. Introdução geral	8
1.1. Poluentes orgânicos persistentes (POPs).....	9
1.2. Hexaclorobenzeno.....	10
1.3. Contaminação por organoclorados.....	12
1.4. Biodegradação de poluentes químicos recalcitrantes por fungos basidiomicetos.....	19
1.4.1. Biodegradação da lignina por basidiomicetos.....	20
1.4.2. Enzimas ligninolíticas extracelulares.....	21
1.5. Biorremediação de solo.....	26
1.5.1. Tratamentos físicos e químicos para desalogenação de organoclorados.....	28
1.5.2. Aumento de escala (<i>Scale-up</i>) do processo de biorremediação.....	29
2. Objetivos	31
3. Capítulo I: Biorremediação de solo contaminado com mistura de organoclorados por <i>Lentinus crinitus</i> (Berk.) Pilát e <i>Psilocybe castanella</i> Peck em biorreatores	33
Resumo.....	34
Abstract.....	35
Introdução.....	37
Material e métodos.....	39
Resultados e discussão.....	45
Conclusões.....	73
Agradecimentos.....	74
Referências bibliográficas.....	74
4. Capítulo II: Biorremediação de solo contaminado com organoclorados por associação de oxidação química e biodegradação por <i>Trametes villosa</i> em reatores	83
Resumo.....	84
Abstract.....	85
Introdução.....	87
Material e métodos.....	90
Resultados e discussão.....	95
Conclusões.....	123
Agradecimentos.....	124
Referências bibliográficas.....	124
5. Discussão geral	134
6. Conclusões gerais	153
7. Referências bibliográficas	155
8. Resumo e abstract	177
9. Anexos	181

1. Introdução geral

A produção de compostos químicos que não participam facilmente dos ciclos globais de carbono, nitrogênio e enxofre originou grave problema de poluição para o meio ambiente (Barber et al. 2005).

A partir da década de 50 a industrialização no Brasil foi intensificada e desde então, muitos resíduos industriais foram acumulados, significando forte impacto ao meio ambiente. Despejos irregulares de resíduos químicos causaram grave problema de poluição na Baixada Santista, uma das regiões mais industrializadas do Estado de São Paulo. De acordo com estudos realizados pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental - CETESB, mais de onze áreas contaminadas com resíduos organoclorados foram localizadas em diversos municípios da Baixada Santista, principalmente Cubatão, São Vicente e Itanhaém. Estas áreas foram escavadas e o solo contaminado foi armazenado para posterior tratamento. Dentre as substâncias químicas contaminantes destaca-se o hexaclorobenzeno, um poluente orgânico muito persistente no meio ambiente (Matheus 2003).

Tecnologias que visam à remoção de poluentes organoclorados do meio ambiente, utilizando processos de separação e estabilização (adsorção em carvão ativado ou lavagem de solo) não fornecem solução permanente, apenas transferem o contaminante de um sistema para outro. A incineração do material contaminado pode ser outra solução desfavorável, pois além de demandar muito custo, pode produzir outros compostos químicos tão ou mais tóxicos que os originais (Litchfield 2005). A biorremediação (utilização de organismos vivos para eliminação de compostos tóxicos) vem sendo muito estudada nos últimos anos porque, além de menos dispendiosa, pode resultar na mineralização ou na transformação dos contaminantes em produtos finais inócuos. Pela biorremediação, grandes volumes de solo, água ou sedimentos podem ser tratados pela estimulação dos microrganismos autóctones ou pela introdução de microrganismos com capacidade comprovada de degradar o poluente (Boopathy 2000, Atterby et al. 2002, Litchfield 2005).

A associação de tratamentos químicos e biológicos para descontaminação de solo contaminado com organoclorados também tem sido uma técnica estudada (Eggen & Sveum 2001). Esses estudos visam avaliar o potencial de degradação de compostos clorados em solo pela associação de tratamento químico de desalogenação com a posterior aplicação de microrganismos.

1.1 - Poluentes orgânicos persistentes (POP)

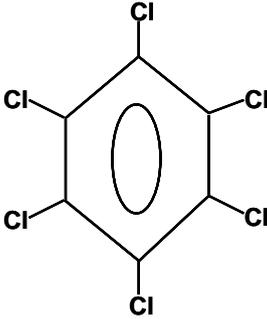
Os POP consistem num grupo de substâncias altamente persistentes no meio ambiente por serem recalcitrantes, não participando dos processos naturais de ciclagem dos nutrientes. De acordo com o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente os POP são geralmente compostos orgânicos clorados aromáticos, poliaromáticos e acíclicos clorados, os quais são originados como produtos ou subprodutos industriais, utilizados como agrotóxicos, agentes bioestáticos ou biocidas para preservação de madeira e outros materiais (Toledo 2002).

Durante a Convenção de Estocolmo, realizada em 2001, foi proposto um grupo de doze POP considerados altamente prejudiciais ao meio ambiente devido sua persistência aos processos naturais de degradação. Os doze sujos, como ficaram conhecidos, são: aldrin, endrin, dieldrin, clordano, DDT, toxafeno, mirex, heptacloro, hexaclorobenzeno, bifenilas poli-cloradas, dioxinas e furanos. Estas substâncias juntamente com outras substâncias, muitas vezes formadas a partir das transformações das doze sujas, são consideradas persistentes e tóxicas, classificadas como substâncias tóxicas persistentes (STP). Recentemente o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP), através do projeto denominado “Avaliação Regional das Substâncias Tóxicas Persistentes”, avaliou a situação de tais substâncias em todo o mundo. O projeto dividiu o globo em 12 regiões geográficas e avaliou, em cada região, os danos e ameaças causadas por estas substâncias, identificando aquelas mais importantes e preocupantes regionalmente, bem como as prioridades de ações de intervenção e de minimização dos impactos previstos pelas

características regionais. O documento da América do Sul abrangeu oito países: Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, Chile, Bolívia, Peru e Equador. As STP selecionadas para América do Sul foram separadas em três grupos: agrotóxicos, compostos industriais e subprodutos não intencionais. Dentre os compostos industriais estão as bifenilas policloradas, dioxinas e furanos, além do hexaclorobenzeno que também está incluído no grupo dos agrotóxicos. Finalmente no grupo dos agrotóxicos clorados, os compostos fontes de maior preocupação para a América do Sul são: aldrin, dieldrin, endrin, p,p,-DDT, p,p,DDE, p,p,-DDD, hexaclorociclohexanos (α -HCH, β -HCH, γ -HCH e δ -HCH), endossulfan, heptacloro de clordano. Para América Latina as substâncias de maior prioridade são DDT, lindano, pentacofenol (PCP) e endossulfan; enquanto as outras substâncias são consideradas de baixa prioridade regional (Almeida *et al.* 2007).

1.2 - Hexaclorobenzeno (HCB)

O HCB foi fabricado pela primeira vez em 1933 pela reação entre o benzeno sob excesso de cloreto, catalisada por cloreto férrico (Toledo 2002). Também pode ser originado como resíduo da fabricação de tetracloroeto de carbono e percloroetileno (Verschueren 1983), não sendo registrada sua ocorrência natural no meio ambiente (Mattheus 2003). As principais características físico-químicas do HCB estão apresentadas no quadro 1. Esse composto já foi utilizado principalmente como fungicida para preservar sementes e grãos de cereais, como constituinte de preservativos de madeira e de fogos de artifício, na fabricação do alumínio, de corantes vinil policlorados e de borracha sintética para produção de pneus (Barber *et al.* 2005).

Quadro 1: Características físico-químicas do hexaclorobenzeno	
	
Fórmula.....	C ₆ Cl ₆
Peso molecular (g mol ⁻¹).....	284,78 g mol ⁻¹
Número de registro CAS.....	118-74-1
Solubilidade em água.....	0,0079 mg L ⁻¹ , 25°C
Ponto de fusão (°C).....	226 °C
Ponto de Ebulição (°C).....	323-326 °C
Pressão de vapor (mPa).....	1,45 (mPa)
Volatilidade:.....	baixa
log Kow:.....	6,18 (pH 4,7)
Mobilidade:.....	baixa
Persistência.....	elevada
Limite aceitável em água para proteção da vida humana (EPA/USA).....	zero
Outros nomes	
Amatin; Anticarie; Bunt-cure; Bunt-no-more; Co-op Hexa; HCB; Carbono clorado de Julin; No Bunt 40; No Bunt 80; Pentaclorofenil clorado; Perclorobenzeno; Sanocide; Sniociotox; 1,2,3,4,5,6-Hexaclorobenzeno; Benzeno hexaclorado; Hexa c.b.; Hexaclorobenzol; Fenil percloril; Smut-Go; Ceku C.B.; Esaclorobenzene; Granox nm; Rcra waste number U127; Saatbeizfungizid; Sanocid; UN 2729	

Adaptado de Matheus (2003)

As principais fontes de liberação de HCB no meio ambiente são fábricas de solventes clorados, a fabricação e aplicação de pesticidas contaminados por HCB e a incineração inadequada de resíduos contendo cloro (Toledo 2002). As disposições inadequadas dos resíduos oriundos de processos que utilizam HCB são potenciais fontes de contaminação do meio ambiente por HCB (Barber *et al.* 2005). A maior produção de HCB ocorreu entre as décadas de 70 e 80, atingindo cerca de 10.000 toneladas por ano entre 1978 a 1981 (Rippen & Frank 1986).

Por apresentar grande estabilidade química e não participar dos processos naturais de reciclagem pelos microrganismos o HCB é um poluente muito persistente no meio ambiente (Toledo 2000, Barber *et al.* 2005). Além disso, o HCB é biomagnificado na cadeia alimentar,

estando presente no ar, em ambientes terrestres e aquáticos e, muito embora presente baixa solubilidade em água, é muito encontrado em organismos filtradores marinhos e de águas doces, assim como em peixes, os quais sofrem grandemente por sua toxicidade (Toledo 2002, Barber *et al.* 2005).

Em humanos o HCB pode causar lesões de pele, ulcerações, hepatomegalia, alterações glandulares, efeitos neurológicos, efeitos no metabolismo renal devido à liberação de grandes quantidades de porfirina, e alterações na formação cálcica dos ossos (Toledo 2002). Foram observadas algumas evidências de que o HCB pode se apresentar como genotóxico; no entanto, até o final da década de 80 não foi possível relacionar casos de câncer pela indução por HCB (Toledo 2002). No entanto, recentes evidências indicam que ocorreu maior mortalidade de mulheres por câncer de mama entre os anos de 1980 e 1999, na região da Baixada Santista, o que, segundo Zago *et al.* (2005), muito provavelmente pode estar relacionado com o acúmulo de poluentes nessa região, dentre esses poluentes os organoclorados presentes em solo.

Pelo fato de apresentar características de alta toxicidade e de persistência no meio ambiente, a produção e comercialização de HCB foram proibidas em muitos países (Toledo 2002). Antes de 1960 não eram observadas restrições à produção e uso desse composto, Porém, a partir desse ano até os dias atuais, muitos países aderiram ao compromisso de não produzir e comercializar HCB e nem os subprodutos de sua fabricação (Toledo 2002, Barber *et al.* 2005). No Brasil, desde 1980 seu uso e comercialização foram proibidos. A meta atual é banir do planeta sua utilização e as fontes de contaminação por HCB (Toledo 2002, Barber *et al.* 2005, Hirano *et al.* 2007).

1.3 - Contaminação por organoclorados

Devido às várias aplicações dos organoclorados como pesticidas e fungicidas, e também por serem gerados como subprodutos de processos industriais, a disseminação desse

grupo de substâncias atinge vários países do globo, o que significa grave problema ambiental e de saúde pública. Isso se deve principalmente à persistência das moléculas dessas substâncias no meio ambiente, estando presente em quase todos os níveis da cadeia alimentar (Swoboda - Coldeberg 1995, Barber et al. 2005).

A produção global excedeu a 100.000 toneladas e, provavelmente, emissões primárias na atmosfera ocorreram principalmente durante a década de 70. A partir deste período, ocorreu uma tendência de declínio de emissões no ambiente (Barber et al. 2005).

Segundo Meijer et al. (2003) grande quantidade de bifenilas policloradas e HCB foram geradas na França, Alemanha e Polônia, contaminando grande quantidade de solo desses países. Na Austrália ainda hoje são armazenados pela empresa “ICI Australian Operations” 55000 tambores com solo contaminado com cerca de 8200 kg de resíduos de HCB, representando grave ameaça ao ambiente (Scheduled Wastes Management 1995).

Em uma extensa revisão sobre as emissões, níveis e distribuição de HCB em âmbito global, Barber et al. (2005) demonstram a gravidade da contaminação ambiental por HCB. Embora o HCB esteja banido de muitos países (Quadro 2), os casos de contaminação de solo por esse poluente ainda persistem até hoje devido à persistência que o HCB apresenta e ocorrem além das regiões próximas às suas fontes de produção (Barber et al. 2005). O transporte de HCB através dos ambientes se dá pela volatilização a partir de materiais contaminados, podendo persistir até 80 dias sob incidência da fotodegradação, e, embora seja muito pouco solúvel em água pode ser conduzido pela correntes marinhas e de águas continentais principalmente quando está imobilizado em algum tipo de substrato (Toledo 2002, Barber et al. 2005). A locomoção de aves migratórias também representa uma forma potencial de distribuição de HCB (Toledo 2002, Barber et al. 2005). A presença de HCB nos pólos é uma prova clara da dinâmica da distribuição de HCB por todo o planeta (Barber et al. 2005), o que também ocorre com outros POPs, como as bifenilas poli-cloradas (Meijer et al. 2003) .

Quadro 2: Decisões entre os países quanto ao uso de hexaclorobenzeno até o ano de 2000

Década	Utilização de hexaclorobenzeno entre os países	
	Restrição	Banido
1960	Argentina (1963)	Hungria (1968)
1970	Canadá (1976), Finlândia (1977)	Nova Zelândia (1972), Austrália (1972), Reino Unido (1975), União Européia (1978), Japão (1979)
1980	República Checa (1980), Polônia (1980), Suécia (1980), Estados Unidos (1984), Brasil (1985), Singapura (1985), Tunísia (1986), Noruega (1987)	Egito (1981), Alemanha ocidental (1984), Marrocos (1984), Equador (1985), Suíça (1986), União Soviética Socialista (1986), Panamá (1987)
1990	México (1991),	Nova Guiné (1990), Vietnam (1992), Paraguai (1993), Colômbia (1993), Islândia (1996), Turquia (1997), Bósnia Herzegovina (1997), Síria (1998), Eslovênia (1998), Jamaica (1999), Peru (1999)
2000		Argentina (2000), El Salvador (2000), Tailândia (2001), Jordânia (2001), Bolívia (2002), Chile (2002), Canadá (2003)
Data não disponível	Filipinas	Dinamarca, Camboja, Indonésia, Guatemala,
Ainda em uso	China e Rússia	

Adaptado de Barber et al. (2005)

Para criação de um modelo de transporte de HCB a longas distâncias no Hemisfério Norte, um esboço do cenário de emissão foi elaborado por Bailey (2001), que descreveu valores de emissão de HCB nos Estados Unidos, Canadá e o total de emissões no Hemisfério Norte utilizando diferentes métodos de estimativas. Para partes da Europa e Rússia (somente a parte na Europa), as estimativas de emissão de HCB foram descritas por Pacyna (1999). Valores de emissão de HCB na China, Paquistão, República da Coreia, Rússia (parte Asiática da Rússia) e Japão foram estimados a partir de estudos e dados oficiais fornecidos por estes países. Os valores de emissão de HCB na Índia foram estimados a partir da diferença entre a emissão hemisférica total e a soma de emissões do continente Norte-americano, Europa e países Asiáticos (Figura 1) (Meteorological Synthesizing Centre - East 2004).

Como descrito por Herculano (2002), alguns casos de contaminação ambiental por organoclorados no Brasil ainda persistem sem solução. Conforme a autora, o despejo irregular de ácido clorídrico pela empresa Salgema no início da década de 90 foi denunciado por ambientalistas da Brigada Ecológica de Alagoas que constataram a liberação dessa substância

em níveis bem acima dos máximos permitidos. Além desse caso, Herculano (2002) também descreve a contaminação da Lagoa Mundaú por resíduos de organoclorados e metais pesados, provindos do Pólo Petroquímico, assim como a contaminação da Várzea de Marituba (Pantanal de Alagoas) por agrotóxicos.

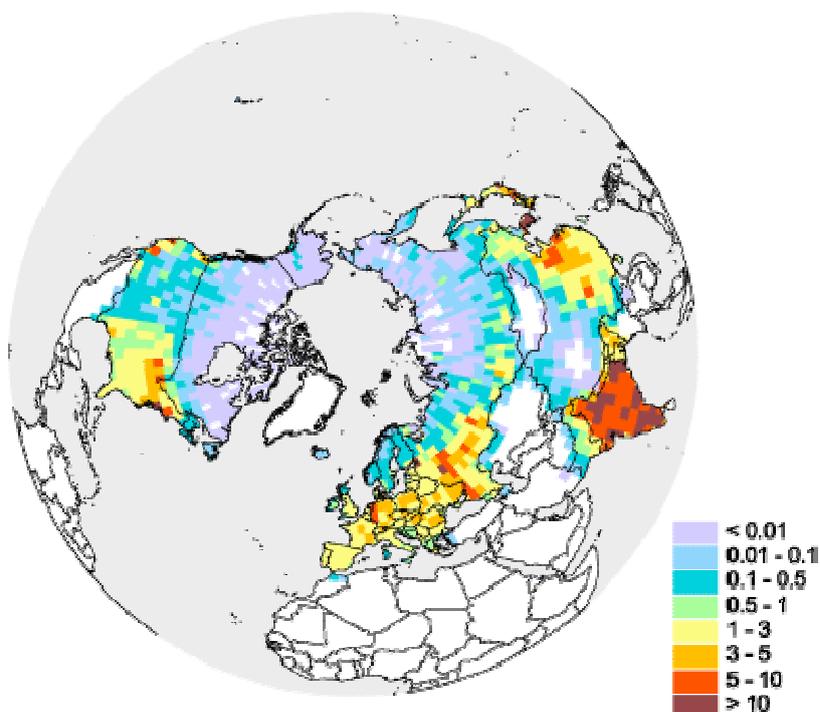


Figura 1. Distribuição espacial de emissões totais de HCB no Hemisfério Norte no ano 2000. Legenda: g HCB km² ano⁻¹ (Meteorological Synthesizing Centre – East 2004).

No estado do Rio de Janeiro houve a contaminação de solo por hexaclorociclohexano, conhecido como Pó de Broca, em uma área conhecida como Cidade dos Meninos (antigo centro profissionalizante de jovens), que a partir de 1949 passou a sediar um centro de combate da malária, quando foi armazenada grande quantidade desse composto utilizado junto com outros clorados na produção de inseticida utilizado no combate do mosquito transmissor da malária (Herculano 2002), e como descrito por esse autor, a contaminação do solo na “Cidade dos Meninos” persiste até os dias atuais sem solução adequada.

Em São Paulo, Estado mais industrializado do Brasil, a CETESB, vem monitorando 92 áreas de contaminação de solo com resíduos químicos industriais (Matheus 1998, Herculano 2002). Entre os casos de contaminação por organoclorados destacam-se: 11 casos de contaminação de solo por 44 substâncias químicas, entre elas o hexaclorobenzeno, na região industrial do Grande ABC, que compreende os municípios de Santo André, São Bernardo, São Caetano e Diadema, afetando cerca de cinco mil pessoas que residem em prédios construídos sobre o solo contaminado desses municípios; em Santo André uma área de cerca de 200 mil m² teve o solo contaminado por BHC enterrado pela Indústria Química Matarazzo; em Paulínia, no interior de São Paulo a responsabilidade da contaminação de solo e lençóis freáticos por resíduos de organoclorados foi reconhecida pela Shell Química do Brasil, mesmo depois dessa área ter sido vendida para expansão urbana (Herculano 2002). Na região estuarina da Baixada Santista foram observadas alterações morfológicas e fisiológicas de crustáceos, peixes e outros organismos aquáticos foram observadas, o que se deve a contaminação de águas por metais pesados, ascarel, bifenilas policloradas, dioxinas e furanos (Herculano 2002, Nascimento et al. 2004).

A partir do estabelecimento da Refinaria da Petrobrás “Presidente Arthur Bernardes” em 1955 outras indústrias químicas de grande porte se estabeleceram, em Cubatão, formando o Pólo Industrial de Cubatão. No entanto, a degradação do meio ambiente acompanhou o desenvolvimento industrial dessa região. A falta de planejamento para a destinação e tratamento dos resíduos gerados pelas industriais químicas foi o principal motivo para a degradação que perdurou até o final dos anos 80 e início dos 90 (Lopes 2003). A indústria Rhodia do Brasil Ltda., após comprar a indústria Clorogil, herdou passivo de contaminação de solo realizada entre final da década de 70 e início da de 80. Situada em Cubatão, a Clorogil também era responsável pela produção de pentaclorofetato de sódio, utilizado para produção de preservativos de madeira, e de tetracloreto de carbono, organoclorado utilizado como

desengraxante na indústria metalúrgica, os quais continuaram a ser produzidos pela Rhodia do Brasil (Matheus 1998).

A contaminação de solo ocorreu por meio de despejos de resíduos industriais em locais inadequados (Figura 2) constituídos principalmente por hexaclorobenzeno, hexaclorobutadieno, hexacloroetano e pentaclorofenol, em vários pontos entre os Municípios de Cubatão e Itanhaém. A maior parte desses resíduos foi despejada no Município de São Vicente, SP (Matheus 1998, Machado 1998). Por exigência da CETESB foi construído um incinerador e, durante a construção, cerca de 33 mil toneladas de solo contaminado foram contidas em uma Estação de Espera (Figura 3) situada no km 262 da Rodovia Padre Manuel da Nóbrega, em São Vicente, SP (Matheus 1998). No entanto, após a construção do incinerador, foram incinerados materiais contidos em outros locais, permanecendo fechada a Estação de Espera.



Figura 2: Área afetada por despejos irregulares de resíduos industriais com organoclorados.

Foto: Rhodia do Brasil Ltda.

Por decisão judicial o incinerador foi interditado assim como toda a Unidade Fabril de Cubatão e determinado que a indústria deveria buscar outras formas de tratamento do solo contaminado (Matheus 1998, Machado 1998, Matheus et al. 2000, Machado et al. 2005b).

Outros compostos foram formados a partir das reações de degradação do HCB, são eles: pentaclorobenzeno, tetra-, tri-, di e monoclorobenzenos, além de pentacloroanizol (Matheus 2003). Geralmente os produtos formados a partir da degradação de HCB ou outros organoclorados com semelhante complexidade, possuem menor estabilidade química, e, portanto, podem aumentar a toxicidade aguda do solo por serem mais reativos em relação aos antecessores (Ahtiainen et al. 2002, Sedarati et al. 2003, Field & Sierra-Alvarez 2008). A biorremediação vem sendo vista como boa alternativa para eliminar ou minimizar a toxicidade de tais compostos (Hofrichter 2002, Robles-Hernández et al. 2008).



Figura 2: Estação de espera. Área de contenção de cerca de 33 mil toneladas de solo contaminado por organoclorados.

Foto: Rhodia do Brasil Ltda.

Devido ao tempo que duraram os despejos dos resíduos químicos e o tempo em que permaneceram no solo até a devida contenção, a formação de lixiviados causou grande impacto quanto à contaminação de horizontes de solo mais profundos e de lençóis freáticos, o que até hoje é monitorado (Matheus 1998, Nascimento et al. 2004). Por tais razões as escavações de solo e a construção da “Estação de Espera” foram priorizadas para contenção

da contaminação do ambiente por organoclorados (Bernardes & Cleary 1987, Nascimento et al. 2004). Vários estudos têm sido conduzidos visando à descontaminação da área (Matheus et al. 2000, Matheus & Bononi 2002, Machado et al. 2005b). Projeto de pesquisa que visa à utilização de fungos basidiomicetos lignocelulolíticos para degradação de resíduos organoclorados do solo armazenado na Estação de Espera vem sendo realizado por meio de convênio entre o Instituto de Botânica, da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, a Fundação para o Desenvolvimento da Pesquisa Agropecuária e a Rhodia do Brasil Ltda.

1.4 - Biodegradação de poluentes químicos recalcitrantes por fungos basidiomicetos

A aplicação dos basidiomicetos lignocelulolíticos para biodegradação de substâncias químicas recalcitrantes vem sendo amplamente estudada (Bumpus & Aust 1987, Aust 1990, Barr & Aust 1994, Matheus *et al.* 2000, Reddy & Gold 2000, Machado *et al.* 2005b). Esse interesse baseia-se na capacidade desses organismos em degradar diversas moléculas de poluentes orgânicos persistentes e outras substâncias tóxicas persistentes, como por exemplo: DDT, dioxinas (2,3,7,8 – tetraclorodibenzo-p-dioxina), hidrocarbonetos aromáticos (benzo- α -pireno), além de bifenilas policloradas, pentaclorofenol e hexaclorobenzeno (Bumpus & Aust 1987, Barr & Aust 1994, Durán & Espósito 1997, Reddy *et al.* 1998, Matheus *et al.* 2000, Reddy & Gold 2000, Pointing *et al.* 2001, Shim & Kawamoto 2002, Tortella *et al.* 2005). Os fungos filamentosos apresentam uma série de características que os tornam interessantes para aplicação em sistemas de biorremediação. Eles são capazes de crescer sob as condições de estresse ambiental que limitam o crescimento bacteriano. E ainda, o modo de crescimento dos fungos – induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono orgânico, através do alongamento e ramificação das hifas – permite a colonização de grandes áreas. Desta forma, o contato superficial com o contaminante é amplo, aumentando sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, podendo ter sua biodegradação aumentada (Dupont *et al.* 1998).

1.4.1 - Biodegradação da lignina por basidiomicetos

O crescente conhecimento dos mecanismos de degradação da lignina é que tem permitido aprofundar o conhecimento sobre a degradação de poluentes orgânicos persistentes. Grande parte das espécies de fungos basidiomicetos são degradadoras de madeira e podem ser divididas em dois grandes grupos: os fungos causadores de podridão branca e os causadores de podridão parda. Os primeiros são dotados de complexo enzimático que os tornam capazes de converter moléculas de celulose, hemicelulose e lignina em água e CO₂, além de deixar a madeira com aspecto esponjoso, fibroso ou laminado e com cor esbranquiçada, o que caracteriza o nome do grupo (Alexopoulos *et al.* 1996, Matheus & Okino 1998, Robles-Hernández *et al.* 2008). Os fungos causadores de podridão parda, por sua vez, são responsáveis pela degradação da celulose e hemicelulose e deixam a madeira com aspecto amorfo e desintegrado ao final do processo de degradação, restando apenas moléculas de lignina modificada de coloração parda (Alexopoulos *et al.* 1996, Matheus & Okino 1998). Ao que parece, fungos basidiomicetos causadores de podridão branca são os únicos organismos capazes de converter lignina em CO₂ (Alexopoulos *et al.* 1996, Matheus & Okino 1998, Robles-Hernández *et al.* 2008).

De acordo com Kirk & Farrel (1987) a lignina é um biopolímero tridimensional com alto peso molecular, amorfo, altamente ramificado, heterogêneo, com estrutura irregular. Eles descrevem ainda que a lignina é composta por subunidades que não se repetem regularmente e, também, não possuem ligações facilmente hidrolisáveis. Devido a essa característica, a molécula de lignina não é facilmente degradada, dependendo de um conjunto de enzimas, dentre elas as peroxidases dependentes do manganês (MnP), a lignina peroxidase (Lip), as glioxidases e a lacase (Leonowicz *et al.* 1999, Robles-Hernández *et al.* 2008).

Devido à capacidade de converter lignina em CO₂ e água, os fungos basidiomicetos são muito utilizados em processos biotecnológicos. Como já mencionado, os resíduos agrícolas ou agroindustriais representam também um grave problema ambiental quanto à sua

disposição final. No entanto, podem ser utilizados pelos fungos basidiomicetos como substratos na produção de cogumelos comestíveis e polissacarídeos para aplicação na indústria alimentícia, médica ou cosmética (Matheus & Okino 1998). Produtos finais da degradação do substrato podem ser utilizados ainda como fertilizantes em plantações, suplementos para ração de animais ou ainda serem reciclados e misturados a outros materiais orgânicos, para utilização em terra de cobertura de plantações de champignon (Matheus & Okino 1998).

1.4.2 - Enzimas ligninolíticas extracelulares

As três principais enzimas ligninolíticas envolvidas na degradação de xenobióticos são lignina peroxidase (Lip), lacases (LAC) e peroxidases dependentes do manganês (MnP) (Pointing 2001).

A Lip pertence a um grupo de peroxidases inespecíficas para seus substratos, que oxidam principalmente compostos aromáticos não-fenólicos. Radicais fenoxi são os primeiros produtos de oxidação de substratos fenólicos por peroxidases, entretanto, cátions aromáticos são formado depois da oxidação pela LiP de compostos aromáticos não-fenólicos. Conseqüentemente, reações com os radicais formados são responsáveis pela variedade de 34 produtos detectados durante oxidação de compostos modelos de subestruturas de lignina por LiP (Martínez 2002). A Lip é capaz de mineralizar uma variedade de compostos aromáticos recalcitrantes. As condições ótimas para atividade de Lip são: pH entre 2 a 5 e a temperatura de 35° a 55° C. É uma enzima relacionada ao metabolismo secundário, conforme foi observado para *Phanerochaete crhysosporium*, entretanto, não é possível estabelecer estágios padrões para a liberação de enzimas entre espécies de fungos. A presença de LiP em basidiomicetos ligninolíticos tem sido considerada rara. Apesar de apresentar propriedades catalíticas parecidas, as diferenças nas propriedades físicas de isoenzimas de LiP de *Irpex lacteus* sugeriram que o alto grau de diversidade é uma característica de LiP de basidiomicetos (Camarero *et al.* 2000).

Existe grande número de isoformas de MnP, constituindo um grupo de enzimas que possuem como característica principal o grupo prostético (heme) com Fe protoporfirínico IX, serem dependentes do H₂O₂ e de manganês para sua atividade, sendo a presença destes fator crucial para oxidação da lignina e compostos xenobióticos (Asgher *et al.* 2008). Seu ciclo catalítico é semelhante ao de LiP; no entanto, o Mn²⁺ atua como doador de elétrons no seu sítio ativo (Hofrichter 2002, Moreira-Neto 2006). As condições ótimas para atividade desse grupo de enzimas variam entre as espécies fúngicas que as produzem, sendo uma faixa ótima de pH entre 4 e 7, e de temperatura entre 40° a 60° C (Hofrichter 2002, Asgher *et al.* 2008). O grupo das MnP é altamente influenciada pelas condições nutricionais do meio ou substrato de cultivo (Hofrichter 2002), Além disso, a presença de quelantes (malonato, oxalato, L-tartarato, oxaloacetado, L-malato e metilmalonato), de hidroperóxidos orgânicos (ácido peracético, ácido m-cloroperoxybenzóico, ácido nitroperoxybenzóico), e de co-oxidantes (glutathiona, ácidos insaturados, e tween 80) pode aumentar a atividade dessas enzimas (Asgher *et al.* 2008). Ao que parece, a produção de MnP é limitada a certos fungos basidiomicetos, e até agora não se evidenciou qualquer bactéria, levedura e nenhum basidiomiceto micorrízico capaz de produzir esta enzima. A capacidade de sintetizar MnP está distribuída entre grupos de basidiomicetos taxonomicamente distintos, como espécies colonizadoras de madeira, pertencente às famílias *Meruliaceae*, *Coriolaceae* e *Polyporaceae*, assim como basidiomicetos decompositores de serrapilheira, das famílias *Strophariaceae* e *Tricholomataceae* expressam atividade de MnP (Moreira-Neto 2006).

Lacases são enzimas fenoloxidasas (p-difenol:dioxigênio óxido redutase) e fazem parte de um grande grupo de enzimas oxidasas que complexam cobre (Higuchi 2004, Duran & Espósito 1997, Mayer & Staples 2002). Anteriormente considerava-se que as lacases eram produzidas somente por eucariotos (plantas e fungos), no entanto, sabe-se hoje que procariotos também secretam lacases (Moreira-Neto 2006). A capacidade dessas enzimas em degradar compostos aromáticos recalcitrantes, desde que na presença de mediadores

específicos, dá a essas enzimas grande interesse para aplicações biotecnológicas, como no processamento industrial do papel e polpas e, recentemente, a aplicação em sistemas de biorremediação de solos e efluentes têxteis (Pazarlioglu *et al.* 2005, Moreira-Neto 2006). Entretanto, durante o desenvolvimento fúngico a produção de lacase é afetada por muitos fatores, como a composição do meio de cultura (relação carbono e nitrogênio), pH, temperatura e taxa de aeração. A faixa de pH ótimo é bem ampla, variando de 2 a 10 e a temperatura ótima varia de 40° a 65° C (Asgher *et al.* 2008). Essa variação existe devido a grande variedade de lacases entre as espécies fúngicas (Pazarlioglu *et al.* 2005). A presença de metais e as fontes de carbono influenciam grandemente a produção e atividade de lacases. Embora o cobre esteja presente no sítio ativo das lacases, o excesso desse metal no meio de cultivo inibiu a atividade de lacases secretadas por *Trametes villosa*, assim como diferentes fontes de carbono podem interferir na atividade de lacase desse fungo (Yamanaka *et al.* 2008). Os fungos ligninolíticos são capazes de gerar grandes quantidades de radicais livres, muito atuantes durante a degradação de xenobióticos (Rabinovich *et al.* 2004).

As condições nutricionais influenciam grandemente a atividade enzimática dos fungos. O tipo de fonte de carbono e sua concentração, assim como a concentração de nitrogênio no meio de cultivo influencia diretamente a produção e a atividade enzimática de fungos ligninolíticos (Hofrichter 2002, Novotny *et al.* 2004, McErlean *et al.* 2006, Jaccques *et al.* 2007, Yamanaka *et al.* 2008). Além disso, a presença de organoclorados no solo pode estimular dessas enzimas, como observado por Machado *et al.* (2005b) quando cultivaram *Trametes villosa* CCB 176 na presença de pentaclorofenol no solo, o qual apresentou atividade ligninolítica maior em relação ao cultivo em solo sem contaminação.

Além do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de enzimas ligninolíticas outros agentes de baixo peso molecular são secretados no substrato pelos fungos, a fim de desestabilizar as moléculas constituintes da madeira. Evidências indicam que espécies reativas de oxigênio são formadas os quais são capazes de desestabilizar partes da molécula de lignina (Hammel *et al.*

2002). Outro mecanismo de degradação é a “Reação de Fenton” ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} + \text{H} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Fe}^{3+} + \bullet\text{OH}$) originada a partir da combinação do peróxido de hidrogênio secretado por fungos, na presença de íons ferro do substrato, formando radicais hidroxilas extremamente importantes para o início do processo de degradação da madeira (Rabinovich *et al.* 2004). Além disso, vem sendo elucidada a participação de compostos quelantes com baixa massa molecular, os quais têm grande importância nas reações de desestabilização das moléculas de lignina (Hammel *et al.* 2002, Moreira-Neto 2006, Arantes & Milagres 2007).

A principal razão que torna os fungos de podridão branca bons degradadores de poluentes recalcitrantes é a inespecificidade do complexo enzimático que secretam (Pointing 2001, Hofrichter 2002, Torres *et al.* 2003, Rabinovich *et al.* 2004, Asgher *et al.* 2008) conferindo aos basidiomicetos as seguintes vantagens em processos de biodegradação: 1) o sistema enzimático, sendo extracelular, pode atuar em substratos insolúveis ou complexados aos solos 2) o sistema enzimático, sendo inespecífico, pode ser usado para uma ampla variedade de poluentes orgânicos ou mesmo para misturas deles; 3) o sistema enzimático, sendo produzido em resposta às condições de limitação de nutrientes, não necessita ser induzido pela exposição prévia ou pela presença da lignina ou do composto poluente; 4) este grupo de fungos possui vantagens competitivas, com relação aos outros microrganismos, quando materiais lignocelulósicos são utilizados como fontes de carbono e 5) a degradação da lignina ocorre até que a sua concentração seja reduzida a níveis não detectáveis e o produto final é o CO_2 . Este é o tipo de processo desejável na degradação de xenobióticos (Aust 1990).

Dentre as espécies de fungos estudadas para biodegradação de poluentes orgânicos encontramos: *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Inonotus dryophilus*, *Lentinula edodes*, *Phanerochaete sórdida*, *Phellinus badius*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus pinsitus*, *Stereum hirsutum*, *Trametes hirsuta*, *T. versicolor*, *T. villosa*, *Peniophora cinerea*, *Psilocybe castanella*, *Lentinus crinitus*, capazes de degradar antraceno, pentaclorofenol, 3,4-dicloro anilina, dieldrin, fenantreno, creosoto, dibenzo-a-dioxina, dibenzofuranos

policlorados, pireno, fluoreno, hexaclorobenzeno (Matheus & Okino 1998, Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005b), além de muitas outras espécies capazes de degradar inúmeros compostos xenobióticos.

Machado *et al.* (2005b), bem como Matheus *et al.* (2000) selecionaram basidiomicetos capazes de degradar e mineralizar pentaclorofenol e hexaclorobenzeno em condições laboratoriais, baseando-se na velocidade do crescimento fúngico, capacidade de descoloração do corante Azul de Remazol Brilhante R e na tolerância à altas concentrações de HCB e pentaclorofenol, são eles: *Peniophora cinerea*, *Psilocybe castanella*, duas linhagens de *Trametes villosa* (CCB 176 e 213) e *Agrocybe perfecta*, depositadas na Coleção de Cultura de Basidiomicetos do Instituto de Botânica, São Paulo, que foram capazes de reduzir pentaclorofenol presente no solo em até 78%, 64%, 58%, 36% e 43 %, respectivamente, após 90 dias de incubação. Todos os fungos mineralizaram [¹⁴C]-pentaclorofenol, principalmente *P. cinerea* e *T. villosa* (CCB 176) com a produção de 7,11% e 8,15% de ¹⁴CO₂ (Machado *et al.* 2005). Outras dezenove linhagens foram tolerantes à altas concentrações de hexaclorobenzeno, mas apenas *Psilocybe castanella* (CCB 444) e *Lentinus crinitus* (CCB 274) foram capazes de remover cerca de 3150 e 1400 mg de HCB Kg⁻¹ de solo (Matheus *et al.* 2000).

A adição de óleos vegetais e os surfactantes pode aumentar a atividade ligninolítica até sua completa mineralização, através da geração de radicais livres, além de alterar a composição fosfolipídica e a permeabilidade das membranas celulares, facilitando as trocas entre a célula e o meio externo e, conseqüentemente, a ação das enzimas produzidas (Asther *et al.* 1988, Leštan *et al.* 1990). Matheus & Bononi (2002) observaram que *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella* foram capazes de mineralizar até 15% de HCB na presença de ácidos graxos insaturados adicionados ao solo. *P. castanella* aumentou significativamente a mineralização do HCB quando o inóculo fúngico era produzido em substrato com C/N ajustado para 90. Diante dos resultados obtidos por Matheus *et al.* (2000), Matheus & Bononi

(2002) e Machado *et al.* (2005), as espécies *Lentinus crinitus* (CCB 274), *Psilocybe castanella* (CCB 444) e *Trametes villosa* (CCB 176) têm sido recomendadas para estudos de biorremediação de solo contaminado por organoclorados em grande escala.

1.5 - Biorremediação de solo

A biorremediação consiste na aplicação de organismos vivos em tratamento de ambiente contaminado a fim de reduzir a concentração dos poluentes em níveis não detectáveis, não tóxicos ou aceitáveis pelas agências de controle ambiental (Litchfield 2005). Pode ser classificada como *ex situ*, quando há a necessidade de remoção do material contaminado para a realização do processo de tratamento fora do local poluído, ou *in situ*, quando o tratamento do material é realizado no próprio ambiente onde ocorreu a contaminação, não sendo recomendada a remoção do solo a fim evitar maior impacto (Boopathy 2000).

A caracterização física, química e microbiológica da área contaminada e do tipo de contaminante é fundamental para a escolha do método de biorremediação de solo (Dupont *et al.* 1998). Nos tratamentos *in situ* geralmente pode ser realizada a bioestimulação dos microrganismos autóctones pela introdução de nutrientes, ou pela bioventilação da pluma contaminante que, além de melhorar as reações de degradação também estimula o crescimento microbiano. Quando a remoção do solo se faz necessária a fim de conter a contaminação da área são realizados tratamentos *ex situ*, devendo o solo ser tratado preferencialmente na própria área (tratamento *on-site*). Quando as condições operacionais do tratamento devido ao relevo, acesso, disponibilidade de energia, segurança, etc. são inviáveis no local, o tratamento deve ser realizado em outro local (tratamento *off-site*). Em tratamentos *ex situ* a biorremediação do solo também pode ser realizada pela bioaumentação, desde que sejam realizados estudos prévios visando selecionar os microrganismos que mostrem

capacidade de tolerar e degradar os poluentes químicos presentes no solo. (Jong & Field 1997, Dupont *et al.* 1998, Alexander 1999, Boopathy 2000).

É grande o número de estudos de biodegradabilidade de organoclorados em solo (Matheus *et al.* 2000, Matheus & Bononi 2002, Sedarati *et al.* 2003, Schroll *et al.* 2004, Kao *et al.* 2004, Machado *et al.* 2005b, Dannibale *et al.* 2005, Dannibale *et al.* 2006, Di Toro *et al.* 2006, Rein *et al.* 2007, Marsolek *et al.* 2007, Li *et al.* 2008), entretanto, pouco são os trabalhos que avaliam a degradação desses poluentes em tratamentos em maior escala (Jong & Field 1997, Lamar & White 2001, Boopathy 2000).

A biorremediação *in situ* de solo contaminado por resíduos de combustíveis utilizando microrganismos autóctones foi bem sucedida conforme descrito por Namkoong *et al.* (2002). Os autores observaram significativas taxas de redução de diesel em solo, assim como dos subprodutos da degradação desse combustível. A biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos foi descrita por Jørgensen *et al.* (2000) que observaram reduções significativas da concentração de resíduos desses contaminantes pela compostagem do solo em biopilhas, bioestimulando a microbiota autóctone. A utilização de consórcio entre bactérias e leveduras foi bem avaliada por Gallego *et al.* (2007) que observaram total remoção de resíduos de hidrocarbonetos de fundo de tanques de armazenamento de produtos da destilação de petróleo.

Por outro lado, moléculas organohalogenadas possuem maior estabilidade química, e conseqüentemente, são mais persistentes do que resíduos de hidrocarbonetos (Jong & Field 1997). A biorremediação de solo contaminado com organoclorados vem sendo mais estudada em consequência dos bons resultados de biodegradabilidade desses compostos em laboratório. De acordo com Guerin (2008) a concentração de clorobenzenos diminuiu significativamente pela bioestimulação de microrganismos autóctones no solo.

Quanto maior o tempo em que poluentes químicos permanecem no solo, mais difícil pode ser a remediação desse solo (D'Annibale *et al.* 2005, D'Annibale *et al.* 2006). Fungos

apresentam algumas vantagens sobre as bactérias em tratamentos de biorremediação de solo contaminado por organoclorados, pois são capazes de adsorver metais pesados sem sofrer ação tóxica por eles e também por secretarem enzimas ligninolíticas capazes de desestabilizar moléculas de poluentes químicos na presença de certos mediadores enzimáticos (D'Annibale *et al.* 2006). Davis *et al.* (1993) observaram reduções significativas da concentração de creosoto em solo após tratamento com *Phanerochaete sórdida* e indicaram a necessidade de se monitorar o desenvolvimento do fungo durante o tratamento do solo. No entanto, Lamar *et al.* (1994) aplicaram a mesma espécie para tratamento *in-situ* de solo contaminado por creosoto e pentaclorofenol, e, embora tenham observado reduções na concentração dos poluentes, os autores alertam para a necessidade de mais estudos para formulação do inóculo e de métodos para aplicação desse inóculo no solo evitando diminuir sua viabilidade no solo. No entanto, compostos clorados são muito tóxicos e na maior parte dos casos é necessário conter a contaminação removendo o solo do ambiente. Por essa razão, a biorremediação do solo contaminado é realizada *ex-situ*. Estudos de biorremediação de solo contaminado por pentaclorofenol em biorreatores, utilizando a linhagem *Trametes versicolor* foram muito bem conduzidos por Walter *et al.* (2005), que observaram bom desenvolvimento dessa espécie em biorreatores os quais permitiram monitorar de forma precisa o processo de biorremediação.

1.5.1 – Tratamentos físicos e químicos para desalogenação de organoclorados

Uma alternativa que vem sendo estudada para descontaminação de solo contaminado por organoclorados é a utilização de tratamentos físicos ou químicos ou associação desses métodos (Miller *et al.* 1996, Zeng *et al.* 2000, Chu *et al.* 2002, Miyoshi *et al.* 2004, Shih *et al.* 2009). No entanto, são raros os estudos de associação de tratamentos químicos e biológicos em maiores quantidades de solo (Eggen & Sveum 2001).

Trametes villosa mostrou-se resistente a ação tóxica do pentaclorofenol em solo e foi capaz de promover significativa redução da concentração deste composto, o qual inibe as

reações de fosforilação oxidativa (Machado et al. 2005b). Salvi (2008) observou redução significativa da concentração de ¹⁴C-HCB pela associação do tratamento químico do solo (NaOH + PEG400 + etanol) e posterior aplicação de *Trametes villosa*, evidenciando que essa espécie foi capaz de tolerar a toxicidade dos compostos clorados originados do tratamento de oxidação química do solo.

1.5.2 – Aumento da escala (“Scale-up”) do processo biorremediação de solo

Existem muitas evidências da eficiência de fungos de podridão branca em microcosmos para biodegradação de poluentes orgânicos persistentes. Entretanto, Lamar & White (2001) demonstram que para aplicação desses fungos em tratamentos de biorremediação de grandes quantidades de solo são necessários estudos para adequar as condições de cultivo. Entre os principais aspectos que necessitam ser estudados, destaca-se a produção de inóculo, estudo aprofundado da fisiologia dos microrganismos e suplementação de nutrientes durante o tratamento, além das adaptações do crescimento dos fungos na biorremediação de solo em larga escala. Entretanto, para realização de tais estudos são necessários investimentos para mão de obra do processo e de tempo prolongado de estudo. Tais necessidades muitas vezes vão ao encontro aos interesses de indústrias envolvidas com casos de contaminação ambiental, as quais buscam por resultados em curto espaço de tempo, e também de órgãos públicos de fomento à pesquisa, que não possuem instrumentos que permitem financiamento de mão de obra e infra-estrutura do tratamento. Por tais razões, são muitos os estudos de biodegradação de poluentes em solo, mas poucos estudos de biorremediação de grandes quantidades de solo, pelos quais se poderiam observar os efeitos físicos da quantidade de solo sobre o processo de biorremediação.

A imobilização da biomassa fúngica vem sendo bastante estudada para aplicação em biorremediação de solo (Lamar & Scholze 1992, Leštan & Lamar 1996, Loomis *et al.* 1997, Ballaminut & Matheus 2007). A utilização de substrato lignocelulósico para imobilização de

biomassa de fungos basidiomicetos é interessante, pois diminui as possibilidades de competição com outros microrganismos (Lamar & Scholze 1992, D'Anniballe *et al.* 2006). Bagaço de cana-de-açúcar é uma boa alternativa para aplicação em tratamentos de grande quantidade de solo, uma vez que favorece os microrganismos lignocelulolíticos além de ser produzido em grandes quantidades pelas usinas sulcro-alcooleiras, apresentando baixo valor comercial (Mohammadia & Nasernejad 2009).

Estudo em células de tratamento (biorreatores) possibilita avaliar os parâmetros necessários para serem ajustados em estudos de biorremediação de grandes quantidades de solo (Walter *et al.* 2005). Além disso, a volatilização de substâncias tóxicas pode ocorrer durante o tratamento do solo (Nakagawa & Andrea 2005), o que pode ser evitado pelo uso de biorreatores (Walter *et al.* 2005). Segundo Walter *et al.* (2005) o preparo do inóculo é fundamental para a adaptação do fungo em solo contaminado, concordando com as observações feitas por Lamar & White (2001).

A aplicação da micorremediação foi bem avaliada por Holroyd & Caunt (1995) que observaram o bom desempenho de *Phanerochaete chrysosporium* em larga escala de solo contaminado por clorofenóis. Segundo os autores esse fungo foi avaliado em laboratório e depois aplicado em escala de campo (6000 m³ de solo contaminado) e mostrou capacidade em remover mais de 80 % de clorofenóis em solo, embora relatem que foi necessário adequar as condições de crescimento do fungo para grandes quantidades de solo contaminado. Lamar & Dietrich (1990) também constataram cerca de 80 % de degradação de pentaclorofenol em larga escala de solo por linhagens de *Phanerochaete* spp.

A utilização dos basidiomicetos *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella* para biorremediação de grande quantidade de solo foi recomendada por Matheus & Bononi (2002) diante das excelentes taxas de biodegradação e mineralização de ¹⁴C-HCB que essas espécies apresentaram em microcosmos. Matheus *et al.* (2003) observaram bom desenvolvimento dessas linhagens, utilizando o mesmo sistema de cultivo utilizado por Matheus & Bononi

(2002), porém, em solo não contaminado contido em biorreatores (Figura 3) para tratamento de 400 kg de solo, dotados de sistema de aeração forçada e coleta de lixiviado dos solo.



Figura 3: Biorreatores com sistema de aeração forçada para tratamento de 400 Kg de solo por unidade
Foto: Ricardo R. da Silva.

2. Objetivos

Os objetivos principais desse trabalho foram:

- avaliar a biorremediação de solo contaminado por organoclorados pelos fungos *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella*, em biorreatores, bem como,
- avaliar a biorremediação do solo pela associação de tratamento químico para desalogenação de HCB com posterior aplicação de *Trametes villosa* em biorreatores.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- avaliar o desenvolvimento dos fungos no solo dos biorreatores, pelos seguintes parâmetros:
 - Estimativa do crescimento fúngico;
 - Isolamento dos basidiomicetos durante o tratamento
 - Quantificação inicial e final das UFCs de bactérias e fungos oportunistas;
 - Variação inicial e final da concentração de C-N-P;
 - Variações da temperatura, umidade e pH do solo durante o tratamento;
- Avaliar a atividade enzimática presente no solo;
- Avaliar a concentração de HCB, pentaclorobenzeno, 1,2,4,5 tetraclorobenzeno, 1,2,3,4 tetraclorobenzeno, pentacloroanizol, pentaclorofenol, hexaclorobutadieno, além da concentração de íons cloretos;
- Avaliar a toxicidade aguda do lixiviado do solo;

3. Capítulo I

Biorremediação de solo contaminado com mistura de organoclorados por *Lentinus crinitus* (Berk.) Pilát e *Psilocybe castanella* Peck em biorreatores

Ricardo Ribeiro da Silva¹, Dácio Roberto Matheus^{2,3}

¹Pós-graduando em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo;

²Pesquisador visitante da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica de São Paulo;

³ Professor Adjunto da Universidade Federal do ABC.

Resumo

Casos de contaminação por organoclorados têm sido uma preocupação mundial. No Brasil, existem muitos casos de contaminação de solos por organoclorados, dentre eles o hexaclorobenzeno (HCB) cuja biodegradação é extremamente difícil por ser muito estável quimicamente. Por sua vez, fungos basidiomicetos vêm sendo estudados para a biodegradação de organoclorados, incluindo HCB, e descontaminação de solo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a biorremediação de solo contaminado com HCB por *Lentinus crinitus* CCB274 e *Psilocybe castanella* CCB 444 em biorreatores com capacidade para tratamento de 400 kg de solo. Para isto, lotes de 400 kg de solo contaminado com organoclorados (25000 mg de HCB kg⁻¹ de solo) foram transferidos para biorreatores dotados de sistema de injeção de ar e esterilizados com brometo de metila por 72 h. Os fungos foram crescidos em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farinha de soja (C:N 90) e incubados por 21 dias a 28°C. Porções de 40 kg (base seca) de inóculos de *L. crinitus* e *P. castanella* foram inoculadas nos solos em duplicata. Como controle, utilizou-se o mesmo substrato sem fungo. Aos 0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias foram determinadas as concentração de hexaclorobenzeno, pentaclorobenzeno, tetraclorobenzenos, pentaclorofenol, hexaclorobutadieno, pentacloroanizol e hexacloroetano, além de íons cloretos, quantidade de ergosterol, reisolamento dos basidiomicetos, atividades de lacase e fenoxidase, e ainda, a umidade e o pH do solo. A toxicidade aguda do lixiviado do solo determinada pelo teste com *Daphnia similis* foi determinada aos 0, 56 e 224 dias de incubação, enquanto as quantificações de microrganismos e de carbono orgânico total-COT, nitrogênio-N e fósforo-P foram feitas aos 0 e 224 dias. A temperatura do solo foi medida diariamente. Observou-se completa remoção de pentaclorofenol por ambos os fungos e de hexaclorobutadieno por *L. crinitus*, sendo que *P. castanella* removeu cerca de 98% deste último composto. A partir dos 84 dias houve formação de compostos intermediários clorados não identificados, indicando a degradação dos outros organoclorados nos biorreatores com *L. crinitus*, que foram degradados até o final

do período de incubação. *P. castanella* também promoveu redução altamente significativa na concentração desses compostos. A concentração de íons cloreto no solo aumentou nos biorreatores com basidiomicetos. Por outro lado, não se observou remoção significativa de HCB, diferente do obtido em laboratório com até 70% de remoção. Observou-se que o preparo e processo de incorporação do inóculo fúngico no solo e algumas condições de cultivo podem ter diminuído a eficiência da biodegradação dos organoclorados se comparado com dados obtidos em laboratório. Alterações no processo de produção do inóculo e adequação das condições de cultivo, principalmente aeração do solo parecem ser os principais fatores a serem avaliados para melhoria da eficiência da biorremediação em escala industrial dos solos contaminados utilizando basidiomicetos.

Palavras chaves: hexaclorobenzeno, “scale-up”, basidiomicetos, biorreator

Apoio Financeiro: FUNDEPAG/Rhodia do Brasil/CAPES

Abstract

Cases of contamination by organochlorates have been a world-wide concern. Many situations of soil contamination by organochlorates occur in Brazil. This includes hexachlorobenzene (HCB), which is chemically very stable and thus has an extremely difficult biodegradation. The application of basidiomycetous fungi has been experimented for the biodegradation of organochlorates, including HCB, and soil decontamination. The objective of the present study was to evaluate the bioremediation of contaminated soil through the use of *Lentinus crinitus* CCB274 and *Psilocybe castanella* CCB 444 in bioreactors with 400 kg of soil treatment capacity. 400 kg portions of soil contaminated with organochlorates (25000 mg of HCB kg⁻¹ of soil) were transferred to bioreactors equipped with a system of air injection and sterilised with methyl bromete for 72 h. The fungi were grown in sugar-cane bagasse supplemented with soybean flour (C:N 90), being incubated during 21 days at 28°C. 40 kg portions (dry base) of *L. crinitus* and *P. castanella* strains were inoculated in the soils in

duplicate. The same substrate without the fungus was used as control. The concentration of hexachlorobenzene, tetrachlorobenzenes, pentachlorophenol, hexachlorobutadiene, pentachloroanisole and hexachloroethane, as well as chlorte ions, the quantity of ergosterol, the re-isolating of the basidiomycetes, activities of laccase and phenoloxidase and also the soil humidity and pH were determined at 0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 and 224 days. The acute toxicity of the soil lixivium was determined at 0, 56 and 224 days of incubation, whilst the quantification of micro-organisms and of COT, N and P was done at 0 and 224 days. The soil temperature was measured daily. A complete removal of pentachlorophenol by both fungal species and of hexachlorobutadiene by *L. crinitus* was observed, whereby *P. castanella* removed 98% of the second compound. The constitution of intermediary chlorated non-identified compounds occurred from 84 days, indicating the degradation of other organochlorates in the bioreactors with *L. crinitus*. They were degraded until the end of the incubation period. *Psilocybe castanella* also promoted a highly significant reduction in the concentration of these compounds. The concentration of chlorte ions in the soil increased in the bioreactors with basidiomycetes. On the other hand, a significant degradation of HCB was not observed, this differing strongly from the laboratory result, where up to 70% was removed. The preparation and process of incorporation of the fungal inoculum in the soil and some culture conditions may have diminished the efficiency of the organochlorates' biodegradation when compared with data obtained in the laboratory. Changes in the production process of the inoculum and adaptation of the culture conditions, particularly the soil aeration, seem to be the main factors to be evaluated in order to improve the efficiency of bioremediation of contaminated soil by basidiomycetes on the industrial scale.

Key words: hexachlorobenzene, scale-up, organochlorines, basidiomycetes, bioreactor

Financial support: FUNDEPAG/Rhodia do Brasil/CAPES

Introdução

Desde 1985, quando Bumpus e colaboradores demonstraram a capacidade de *Phanerochaete chrysosporium* degradar inúmeros poluentes orgânicos persistentes, dentre eles DDT, bifenilas policloradas, dioxinas, lindano e benzo- α -pireno, os fungos basidiomicetos têm sido estudados como bons degradadores de poluentes recalcitrantes até dióxido de carbono. Tal capacidade está intimamente relacionada ao sistema enzimático ligninolítico produzido pelos basidiomicetos, que é o único grupo de microrganismos que se conhece com capacidade de degradar lignina até CO₂ e água (Kirk & Farrell 1987).

A natureza extracelular e inespecífica das enzimas e de um conjunto de compostos de baixa massa molecular produzidos por esses fungos é responsável pela sua capacidade de oxidar inúmeros compostos orgânicos ou mistura deles, muitas vezes insolúveis em água (Aust 1990).

Na década de 90 muitas espécies de basidiomicetos foram estudadas evidenciando a capacidade de degradação de inúmeras moléculas orgânicas xenobióticas, como antraceno, pentaclorofenol, 3,4-dicloro anilina, dieldrin, fenantreno, creosoto, dibenzo-a-dioxina, dibenzofuranos policlorados, pireno, fluoreno, hexaclorobenzeno, entre outras, na grande maioria, altamente tóxica e recalcitrante à biodegradação nos ambientes onde elas eram descartadas (Matheus & Okino 1998, Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005b).

Grande parte das substâncias degradadas pelos basidiomicetos é considerada substância tóxica persistente a ser eliminada do planeta. O primeiro tratado global para a eliminação das substâncias tóxicas persistentes foi resultado da Convenção de Estocolmo, realizada em 2001, que selecionou doze substâncias (conhecidas como as doze sujas): aldrin, endrin, dieldrin, clordano, DDT, toxafeno, mirex, heptacloro, hexaclorobenzeno, PCB, dioxinas e furanos. Estas substâncias compõem uma classe conhecida como Poluentes Orgânicos Persistentes (POP), que juntamente com outras substâncias consideradas persistentes e tóxicas, compõem o grupo mais abrangente das substâncias tóxicas persistentes

(STP). Recentemente o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP), através do projeto denominado “Avaliação Regional das Substâncias Tóxicas Persistentes”, identificou as substâncias mais importantes e preocupantes regionalmente, bem como as prioridades de ações de intervenção e de minimização dos impactos previstos pelas características regionais. Na América do Sul o estudo abrangeu Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, Chile, Bolívia, Peru e Equador identificando dentre os compostos industriais de importância as bifenilas policloradas, dioxinas e furanos, além do hexaclorobenzeno. Dentre os agrotóxicos clorados os compostos fontes de maior preocupação para a América do Sul são: aldrin, dieldrin, endrin, p,p,-DDT, p,p,DDE, p,p,-DDD, hexaclorociclohexanos (α -HCH, β -HCH, γ -HCH e δ -HCH), endossulfan, heptacloro de clordano, sendo que DDT, lindano, pentaclofenol (PCP) são consideradas de alta prioridade regional (Almeida *et al.* 2007).

Apesar da grande relevância dos estudos de degradação dessas substâncias, a maioria das áreas contaminadas na América Latina continua à espera de soluções tecnológicas para sua remediação. No Brasil algumas áreas contaminadas estão sendo avaliadas quanto à possibilidade de biorremediação. Em São Paulo, estado mais industrializado do país um grande levantamento de áreas contaminadas foi realizado, indicando várias áreas críticas, principalmente nos pólos industriais do estado. Na Baixada Santista fungos estão sendo avaliados na biodegradação de organoclorados em solos. A partir de uma Coleção de Cultura de Basidiomicetos depositada no Instituto de Botânica - SP, cinco linhagens foram selecionadas como tolerantes a altas concentrações de organoclorados no solo (principalmente pentaclofenol e hexaclorobenzeno) e capazes de degradar e mineralizar estes compostos em condições laboratoriais (Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005b). Dentre os fungos estudados, *Psilocybe castanella* (CCB444) e *Lentinus crinitus* (CCB274) foram capazes de remover cerca de 3150 e 1400 mg de HCB em solos com 5.000 e 50.000 mg de HCB kg⁻¹, respectivamente, durante 56 dias de incubação (Matheus *et al.* 2000). Matheus & Bononi (2002) demonstraram a capacidade destas espécies de mineralizar até 15% de HCB na

presença de ácidos graxos insaturados adicionados ao solo associado ao ajuste da relação C/N do substrato do inóculo fúngico para 90.

Com vistas a melhorar a eficiência dos processos de biorremediação dos solos contaminados por HCB e PCF, Salvi (2008) avaliou associação do tratamento químico do solo com NaOH e polietilenoglicol seguido do tratamento biológico com aplicação de *Trametes villosa* em processo de biorremediação, e obteve resultados favoráveis na degradação de HCB por esta linhagem de fungo.

Apesar do elevado potencial de aplicação de basidiomicetos em biorremediação de solos contaminados por organoclorados, esta técnica ainda carece de muitos estudos para se viabilizar. Trabalhos para melhoria da produção do inóculo, para o entendimento dos mecanismos mais importantes na colonização do solo e na manutenção das atividades enzimáticas responsáveis pela degradação dos poluentes estão em curso. O presente trabalho avaliou a biorremediação de solo contaminado por mistura de organoclorados pelos fungos *Lentinus crinitus* (CCB274) e *Psilocybe castanella* (CCB444) em biorreatores com 400 kg de solo e os principais parâmetros de monitoramento importantes no processo.

Material e métodos

Fungos estudados

Lentinus crinitus (Berk.) Pilát e *Psilocybe castanella* Peck estão depositados na Coleção de Cultura de Basidiomicetos (CCB 274 e CCB 444, respectivamente) do Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil. São conservadas em culturas inclinadas em batata dextrose ágar a 5° C.

Biorreatores

Foram construídos em concreto impermeabilizado, com 1,20 m de diâmetro e 0,90 m de altura, com fundo inclinado para sistema de coleta de lixiviado. Possuem ainda sistema de injeção de ar forçada e saída do ar direcionada para colunas de carvão ativado. As tampas foram construídas em fibra de vidro e vedadas por junta de borracha (Figura 1 A e B). Foram utilizados dois biorreatores para incubação dos fungos estudados e dois como controles sem fungos.

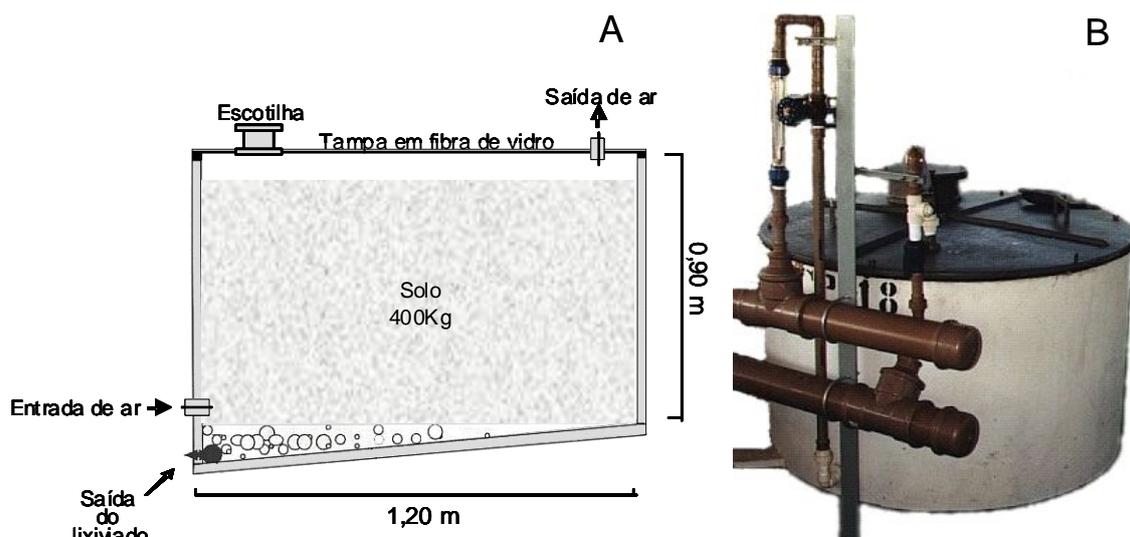


Figura 1: Biorreator para remediação de solo contaminado por organoclorados. A) Esquema simplificado do biorreator; B) Foto ilustrativa (Foto: Ricardo R. da Silva)

Solo

O solo foi coletado em área de contenção de cerca de 33.000 toneladas de solo contaminado com organoclorados originados de despejos irregulares de resíduos industriais ocorridos há mais de 20 anos, em São Vicente, SP. O principal contaminante é o hexaclorobenzeno e as características físico-químicas do solo são: 98% de areia, pH 5,05, capacidade de troca catiônica de 5,5 mEq 100 g⁻¹ de solo, 2,3% de material orgânico, 0,06% de nitrogênio e 0,01 mEq 100mL⁻¹ de potássio.

Preparo do solo

Foi construído um galpão com sistema de contenção de sólidos e líquidos, próximo ao depósito de solo contaminado (Anexo 1), onde foram instalados os biorreatores e realizados todos os procedimentos de manipulação do solo.

O preparo do solo consistiu na remoção de galhos e pedras em porções de 100 kg, com auxílio de peneira mecânica. Os torrões de solo e organoclorados foram triturados em moinho de bolas e devolvidos às suas porções de solo de origem, as quais foram homogeneizadas mecanicamente com outras porções até que fosse obtida concentração de HCB (principal contaminante) próxima a 25.000 mg kg⁻¹ de solo. Esta concentração foi confirmada pela análise cromatográfica de extratos de cinco amostras simples de solo de cada porção de 100 kg de solo homogeneizada.

Após confirmação da concentração de HCB, em cada lote de 100 kg de solo foi incorporado 2,5 % de gesso comercial e novamente homogeneizado.

Foram preparados seis lotes de 400 kg de solo, acondicionados nos biorreatores até o início do experimento.

Após o ajuste da umidade a 50% da capacidade máxima de retenção de água, foi realizada a esterilização do solo com a injeção de 193 cm³ de gás brometo de metila na linha de aeração, que permaneceu por 72 horas. Antes da incorporação do inóculo ao solo, o mesmo foi aerado com 1,5 cm³ de ar por hora, durante 30 min. para a remoção do excesso de brometo de metila.

Inóculo fúngico

Para produção dos inóculos ambas as espécies foram cultivadas em placas de Petri contendo extrato de malte (2%) ágar e incubadas a 28° C.

Porções de 1 kg de bagaço de cana-de-açúcar suplementadas com farinha de soja (C:N 90) e umidade ajustada para 70% foram acondicionadas em sacos de plásticos e esterilizados em autoclave a 121°C por 90 min. (Matheus 2003). Micélio ativo de *Lentinus crinitus* e de

Psilocybe castanella (½ placa de Petri kg⁻¹ de substrato) foi inoculado no substrato e incubados a 28° ± 2° C por 21 dias. Após colonização do substrato os inóculos foram fragmentados manualmente 24 horas antes da sua inoculação, a fim de facilitar sua homogeneização no solo. A mesma formulação do substrato esterilizado e sem crescimento fúngico foi utilizada nos biorreatores controles.

Condições de cultivo

O sistema de cultivo consistiu de 400 kg de solo seco nas condições descritas acima acrescidos de 5% de uma emulsão de óleo de soja comercial e tween 20 (LabSynt) na proporção de 9:1. A umidade foi ajustada para 50% da capacidade de retenção de água do solo. A homogeneização do sistema de cultivo com o inóculo (10% da quantidade de solo, em base seca) foi realizada manualmente com auxílio de um garfo de jardinagem, em quatro etapas de 100 kg de solo cada, durante 5 min. Com o biorreator cheio de solo, foi instalado um sensor de temperatura na região central da coluna de solo, a tampa foi fechada e vedada e o fluxo de ar foi estabelecido em 1,5 m³h⁻¹.

Devido a limitações na infra-estrutura para produção do inóculo de *P. castanella*, sua incubação nos biorreatores foi iniciada 85 dias após o início da incubação de *L. crinitus* e dos biorreatores controles,

Amostragem e análises do solo

Três amostras simples de solo de cada reator foram retiradas imediatamente após a inoculação dos fungos e posteriormente aos 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação, com o auxílio de um trado esterilizado a cada coleta. As amostras foram acondicionadas em vidro esterilizado e refrigeradas até o momento das seguintes análises:

- Crescimento fúngico: foi determinado pela quantificação de ergosterol, extraído a partir de amostra de 10g de solo por saponificação alcoólica e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito por Silva (2004).
- Isolamento dos basidiomicetos: foram retirados três fragmentos de inóculo fúngico do solo, os quais foram inoculados em extrato malte (2%) ágar, contendo o corante Azul de Remazol Brilhante R. Após cinco dias de incubação a 28° C foi avaliada a capacidade de crescimento e descoloração do corante e confirmação de crescimento dos basidiomicetos pela observação em microscópio ótico da presença de ansas na hifa fúngica, conforme descrito por Machado et al. (2005a).
- Umidade: avaliada por gravimetria das amostras liofilizadas para quantificação de ergosterol.
- pH: suspensão de 10g solo em 90 mL de água deionizada (em triplicata), foi agitada por 30 min. e repousada por 60 min. A medida do pH foi feita em pHmetro digital, equipado com eletrodo combinado.
- Atividades enzimáticas extracelulares: foram determinadas a partir de extratos obtidos pela adição de tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0, a 10g de solo colonizado (1:3, p/v). Os extratos foram filtrados (vácuo - papel filtro faixa preta) após agitação manual (3 min.) e posteriormente a 120 rpm por 60 min, As atividades de fenoloxidasas e lacases foram determinadas pela oxidação de 0,5 mM de ABTS à 420 nm durante 5 min., em reação tamponada com citrato-fosfato, 50mM, pH 4,0, na presença ou ausência de 100 µM de H₂O₂, respectivamente. 1 U/L correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de ABTS por minuto (Bourbonnais & Paice 1990). A atividade de peroxidase dependente de manganês foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol à 610 nm (Kuwahara *et al.* 1984).
- Determinação da concentração de organoclorados: Os compostos clorados foram extraídos e analisados pelo de Centro de Pesquisa de Paulínia da Rhodia do Brasil.

Porções de 10g de amostras suspensas em 100 mL de tolueno por Soxhlet por 4 h. Os extratos foram submetidos à análise por cromatografia a gás (Cromatógrafo Varian 3400, equipado com detector FID e injetor split/splitless). Foi usada coluna capilar megabore (LM 5 50m / 0,25mm / 0,5 µm – Fenil 5%, dimetilsiloxano 95%). Foi utilizado nitrogênio como gás de arraste (1,5 mL min.⁻¹). A temperatura do injetor foi mantida em 220° C e a do detector em 270° C. O volume de injeção foi de 1 µL e a temperatura da coluna variou entre 100° e 230° C (taxa de 4° C/ min.) durante 15 min.

Imediatamente após a inoculação dos fungos no solo e ao final do período de incubação (224 dias), foram avaliados os parâmetros abaixo relacionados:

- Contagem de unidades formadoras de colônias de fungos e bactérias: foi determinada pelo método de “pour-plate” a partir da inoculação de 1 mL da suspensão de solo (10g de solo em 90 mL de solução salina a 0,85%) em meio de cultura nutriente ágar para isolamento de bactérias (24 e 48 h de incubação) e em meio de Martin (1950) (até 7 dias de incubação) para fungos.
- Toxicidade aguda do lixiviado do solo: foi avaliada pelo método de ensaio com *Daphnia similis* de acordo com a NBR 12713 - ABNT 2004, pelo Laboratório de Análise de Impacto Ambiental, do Centro de Pesquisa de Paulínia – Rhodia do Brasil Ltda. Os resultados foram convertidos em unidade tóxica aguda (Uta = 100/CE50), conforme descrito por Rodrigues (2005).
- Concentração de carbono orgânico total (COT), nitrogênio (N) e fósforo (P): Análises realizadas pelo Laboratório T&E analítica. COT foi determinado segundo EPA NCEA-C-1282, descrito por Schumacher (2002), N pelo método clássico de Kjeldahl (Kiehl 1985), como descrito em e P como descrito em Standard Methods Procedimento 4500-P B (1999) e leitura do fósforo total por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Induzido (ICP-OES) com calibração com curva de resposta.

Diariamente a temperatura do solo foi monitorada em quatro leituras (0:00, 8:00, 14:00, 20:00 h), acoplando-se um termômetro de solo (mod. SalvTerm 700 - Gulton) à sonda instalada na região central da pilha de solo no biorreator.

Análise estatística

Os dados de todos os parâmetros de monitoramento do desenvolvimento fúngico (exceto o crescimento, isolamento dos fungos estudados e da quantificação da microbiota) e das concentrações dos organoclorados, íons cloretos e dos dados de toxicidade foram submetidos à análise de variância ($\alpha=0,10$) utilizando ANOVA do programa gráfico-estatístico Origin 8.0. Quando foi observado efeito significativo os dados foram analisados pelo Teste Tukey com 10% de nível de segurança usando mesmo programa.

Resultados e discussão

O crescimento de *L. crinitus* foi semelhante nos dois biorreatores, mantendo-se estável até 112 dias e diminuindo a partir de então até os 224 dias de incubação, período em que as quantidades de ergosterol não diferiram daquelas encontradas nos controles sem fungo (Figura 2A). O crescimento de *Psilocybe castanella* foi significativo ($P=0,00001$ e $0,0004$, respectivamente aos biorreatores 1 e 2) durante os sete primeiros dias de incubação, quando foram determinadas as maiores quantidades de ergosterol. A partir dos 14 dias foi observada diminuição significativa da concentração de ergosterol nos dois biorreatores com o fungo até 28 dias que se manteve estável e maior que o controle até 56 dias de incubação. A partir de então, a quantidade de biomassa viável de *P. castanella* diminuiu até os 112 dias não diferindo dos biorreatores controles até os 224 dias (Figura 2B), indicando diminuição da atividade metabólica de *Psilocybe castanella* no solo.

A idade fisiológica e as características do meio de cultivo podem influenciar o metabolismo do ergosterol nas células de algumas espécies fúngicas (Davis & Lamar 1992,

Srinivasan & Glaser 1999, Barajas-Aceves *et al.* 2002, Silva 2004). Silva (2004) não observou influências da idade fisiológica e de cultivo no metabolismo de ergosterol de *L. crinitus*. No entanto, tanto a idade fisiológica a partir dos 35 dias de cultivo, quanto a presença de HCB acima de 15 g L^{-1} de meio de cultivo influenciam o metabolismo de ergosterol de *P. castanella*, diminuindo a taxa deste esterol na biomassa, levando a subestimação do cálculo de biomassa (Silva 2004), o que pode explicar, em parte, a forte queda da concentração de ergosterol observada entre os 14 e 28 dias de incubação (Figura 2).

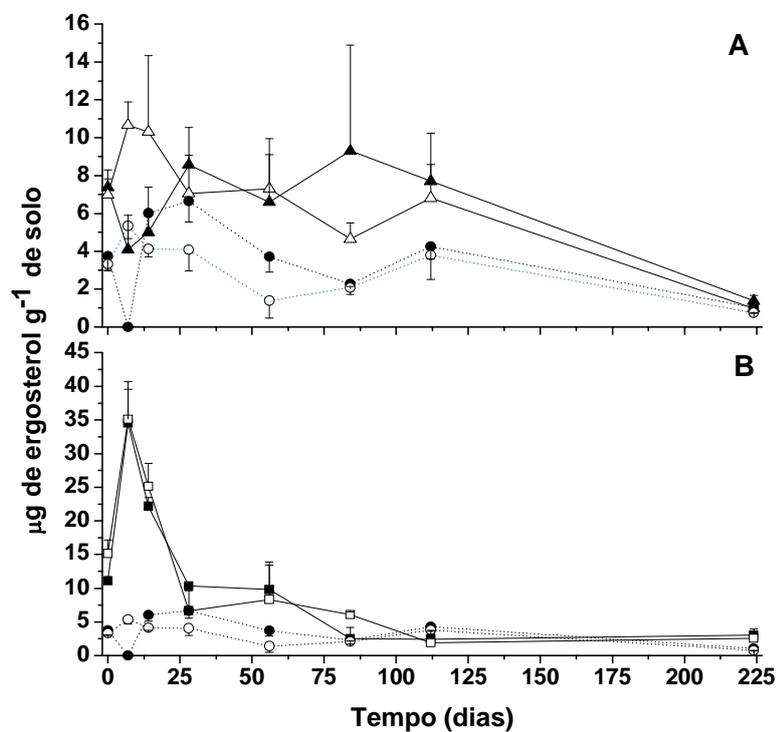


Figura 2: Crescimento fúngico no solo estimado por ergosterol. (A) *Lentinus crinitus* (▲/△), (B) *Psilocybe castanella* (■/□) e controles (●/○). Símbolos fechados biorreator 1 e abertos biorreator 2

Embora o crescimento de *L. crinitus* tenha se mantido relativamente estável até 112 dias, foi possível isolá-lo do solo em todas as amostras dos dois biorreatores apenas até os 56 dias, quando também se mostrou metabolicamente ativo (Tabela 1). Aos 112 dias foi possível isolar esse fungo somente em uma das amostras do biorreator 1. A diminuição na quantidade

de ergosterol a partir dos 112 dias está de acordo com as observações realizadas durante as amostragens.

Foi possível isolar *P. castanella* metabolicamente ativo nos dois biorreatores até 112 dias de incubação (Tabela 1). Esse dado contribuiu para a hipótese de que a idade fisiológica influenciou no metabolismo de ergosterol, uma vez que no período em que as concentrações de ergosterol foram menores nos dois biorreatores com *P. castanella* (112 dias), esse fungo ainda apresentava capacidade em descolorir RBBR. Nos controles não foram isoladas colônias fúngicas de basidiomicetos capazes de descolorir o RBBR.

Tabela 1: Isolamento dos basidiomicetos nas amostras simples de coluna de 50 cm de solo, em triplicata

Biorreatores	Tempo de incubação (dias)							
	0	7	14	28	56	84	112	224
<i>Lentinus crinitus</i> 1	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	---
<i>Lentinus crinitus</i> 2	+++	+++	---	+++	+++	---	---	---
<i>Psilocybe casanella</i> 1	+++	+++	+++	+++	---	---	---	---
<i>Psilocybe casanella</i> 2	+++	+++	+++	+++	---	---	+++	---
Controle 1	---	---	---	---	---	---	---	---
Controle 2	---	---	---	---	---	---	---	---

+ indica crescimento de *L. crinitus* e *P. castanella* confirmado pela descoloração de RBBR e observação microscópica, em cada amostra.

- indica ausência de crescimento de *L. crinitus* ou *P. castanella*.

As quantidades de ergosterol extraídas nos controles provêm de outros fungos que cresceram no solo, o que também ocorreu nos biorreatores com *L. crinitus* e *P. castanella*, conforme se pode observar na contagem de microrganismos após 224 dias de incubação, apresentada na tabela 2. No entanto, as quantidades de ergosterol nos biorreatores controles foram inferiores às encontradas nos biorreatores com as espécies estudadas aqui.

Tabela 2: Contagem de UFCs bacterianas e fúngicas no solo aos 224 dias de incubação em biorreatores

Biorreatores	Bactérias (UFC mL ⁻¹)x10 ³	Fungos (UFC mL ⁻¹)x10 ³
<i>Lentinus crinitus</i> 1	0,24 (±0,16)	2,23 (±0,45)
<i>Lentinus crinitus</i> 2	1,15 (±0,24)	2,58 (±0,00)
<i>Psilocybe castanella</i> 1	1,82 ± 0,08	2,75 ± 0,11
<i>Psilocybe castanella</i> 2	1,97 ± 0,89	1,68 ± 0,31
Controle 1	0,78 (±0,15)	1,93 (±0,86)
Controle 2	0,09 (±0,06)	0,89 (±0,13)

UFC = unidades formadoras de colônia

Na primeira amostragem não foram isoladas colônias bacterianas nem fúngicas em nenhum dos biorreatores, evidenciando assim eficiência da esterilização do solo pelo gás brometo de metila. A injeção de ar não esterilizado nos biorreatores permitiu a entrada de outros microrganismos durante o período de incubação (Tabela 2), o que é de se esperar em tratamentos em larga escala de solo, uma vez que seja inviável do ponto de vista operacional e financeiro o procedimento de esterilização de grandes volumes de solo (Holroyd & Caunt 1995, Dupont *et al.* 1998, Alexander 1999). A competição com outros microrganismos pode interferir na colonização inicial de basidiomicetos (Holroyd & Caunt 1995), por outro lado, o crescimento de microrganismos oportunistas pode ser eficiente para a degradação de clorofenóis, como foi observado por Field & Sierra-Alvarez (2008). A utilização de bagaço de cana de açúcar pode ter favorecido o crescimento de bactérias e fungos no solo, como observado por Nakagawa & Andrea (2006), a utilização de bagaço de cana-de-açúcar favoreceu a proliferação de fungos e bactérias autóctones de solo contaminado por HCB.

Matheus *et al.* (2003) observaram crescimento estável *L. crinitus* por 36 dias em solo sem organoclorados, nas mesmas condições de cultivo aqui estudadas; este crescimento se manteve estável por até 73 dias de incubação. No entanto, na mesma condição de cultivo, esses autores observaram que com *P. castanella* a quantidade de biomassa diminuiu nos primeiros dias de incubação, estabilizando-se a partir dos 14 dias até 73 dias de incubação.

Os dados de crescimento micelial (Figura 1) sugerem que os organoclorados presentes no solo podem ter limitado o desenvolvimento de *L. crinitus*, uma vez que Matheus *et al.* (2003) não observaram diminuição do crescimento de *L. crinitus* nas mesmas condições experimentais com solos não contaminados. Embora Matheus *et al.* (2000) tenham selecionado *L. crinitus* e *P. castanella* como tolerantes a concentrações de HCB superiores aos 25.000 mg kg⁻¹, presentes no solo aqui estudado, a ação tóxica dos outros organoclorados misturados ao solo muito provavelmente pode ter contribuído para o menor desenvolvimento de *L. crinitus* e *P. castanella* observado.

Testes preliminares mostraram que pode haver uma diminuição de até 70% na viabilidade do inóculo fúngico determinado pela perda de ergosterol nas mesmas condições utilizadas no presente trabalho, provavelmente em virtude da ação abrasiva do solo no momento da sua incorporação nos biorreatores (*dados não publicados*). Compart *et al.* (2007) observaram este mesmo efeito além da perda de 88% da atividade de peroxidases extracelulares de *Psilocybe castanella*, perda esta minimizada para 5% com a imobilização do fungo em cápsulas de ardósia. Tal aspecto parece ser muito determinante no desenvolvimento do fungo quando associado à presença de organoclorados.

A figura 3A mostra o aumento da umidade do solo nos biorreatores com *L. crinitus* a partir da umidade determinada inicialmente (18,95±3,13% e 16,62±1,47% respectivamente) até os 28 dias de incubação (23,53±3,36% e 21,10±5,53% respectivamente), mantendo-se estável até os 112 dias (20,34±4,72 e 20,80±2,15%) e aumentando novamente até os 224 dias de incubação (32,24±4,97% e 31,29±13,42% respectivamente). Também foi observado aumento da umidade do solo nos biorreatores com *P. castanella*. Após a inoculação desse fungo, a umidade inicial do solo (19,44±0,83 %) no biorreator 1 aumentou até os 112 dias de incubação (27,08±2,14 %), e depois diminuiu lentamente até os 224 dias (21,68±2,04 %), mas não diferiu da umidade inicial. No solo do segundo biorreator com *P. castanella* houve maior variação da umidade que aumentou até 28 dias de incubação (29,77±2,02 %) em relação à

umidade inicial ($23,78 \pm 1,68\%$). Aos 84 dias a umidade do solo foi de $15,33 \pm 0,69\%$, menor que a umidade inicial. Aos 112 dias a umidade foi corrigida para 20% com adição de água de torneira, não diferindo estatisticamente da umidade aos 224 dias, que foi de $21,89 \pm 5,28\%$ (Figura 3 B). Nos biorreatores controles a umidade do solo diminuiu a partir dos 28 dias até 224 dias, quando foi significativamente menor daquela determinada inicialmente (Figura 3 B).

O aumento da umidade do solo é esperado quando ocorre degradação de matéria orgânica (Kiehl 1985, Dupont *et al.* 1998, Alexander 1999), o que foi observado nos biorreatores com *L. crinitus* até os 28 dias. No entanto, o aumento da umidade do solo a partir dos 112 dias de incubação não se relaciona com a curva de crescimento dessa espécie, além do que nesse período esse fungo não foi isolado no solo em condições viáveis. Embora tal efeito não tenha sido observado no solo dos biorreatores controles, muito provavelmente outros fungos e bactérias tenham contribuído para degradação do material orgânico dos biorreatores com *L. crinitus* a partir dos 112 dias, uma vez que esse fungo não apresentou boa atividade metabólica no solo aos 224 dias esse fungo. O longo período decorrido entre a amostragem de 112 dias e a última aos 224 dias não permitiu observar o exato momento em que a umidade do solo começou a aumentar. Entretanto, ele poderá ser correlacionado com dados de degradação de compostos organoclorados e produção de compostos intermediários da degradação dos organoclorados neste período, conforme será discutido adiante.

O aumento da umidade do solo nos biorreatores com *P. castanella* indica atividade biológica intensa nesses biorreatores, uma vez que essa espécie se mostrou viável até 112 dias de incubação nesse biorreator, condizendo com as observações realizadas durante as amostragens.

Durante o período de incubação o pH do solo diminuiu nos biorreatores avaliados. Nos biorreatores com *L. crinitus* o pH variou de 4,1 para 3,2. O pH do solo nos biorreatores com *P. castanella* diminuiu de 3,9 para 3,6 e nos biorreatores controles de 4,5 para 3,2, aos 224

dias de incubação (Figura 4A). O pH dos biorreatores com *L. crinitus* foi menor do que o observado nos outros biorreatores, sugerindo maior atividade metabólica por esse fungo (Figura 4B).

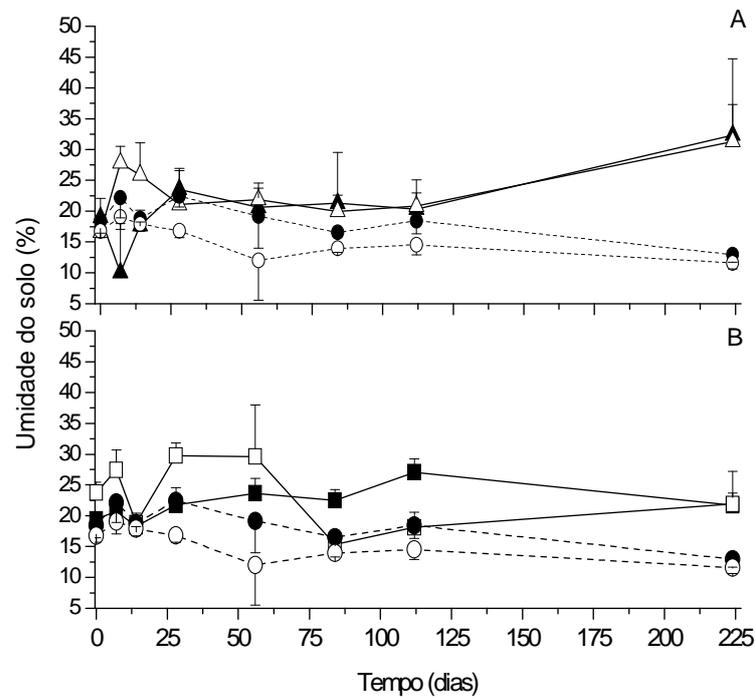


Figura 3: Umidade do solo. A) Biorreatores com *Lentinus crinitus* (▲ / △), B) Biorreatores com *P. castanella* (■ / □). Biorreatores controles (● / ○). Linhas sólidas biorreatores 1 e linhas pontilhadas biorreatores 2.

Redução do pH do solo durante processos de crescimento de fungos são comumente relatadas na literatura (Okeke *et al.* 1996, Itoh *et al.* 2000) e também foi observada por Matheus *et al.* (2003) após 56 dias de cultivo de *L. crinitus* CCB 274 e de *P. castanella* CCB 444 nas mesmas condições experimentais aqui descritas, com solos não contaminados. A redução do pH está associada com a liberação de ácidos orgânicos pelos microrganismos (Robles-Hernández *et al.* 2008), e dependendo de sua natureza química, esses ácidos podem interferir na atividade de enzimas ligninolíticas (Itoh *et al.* 2000).

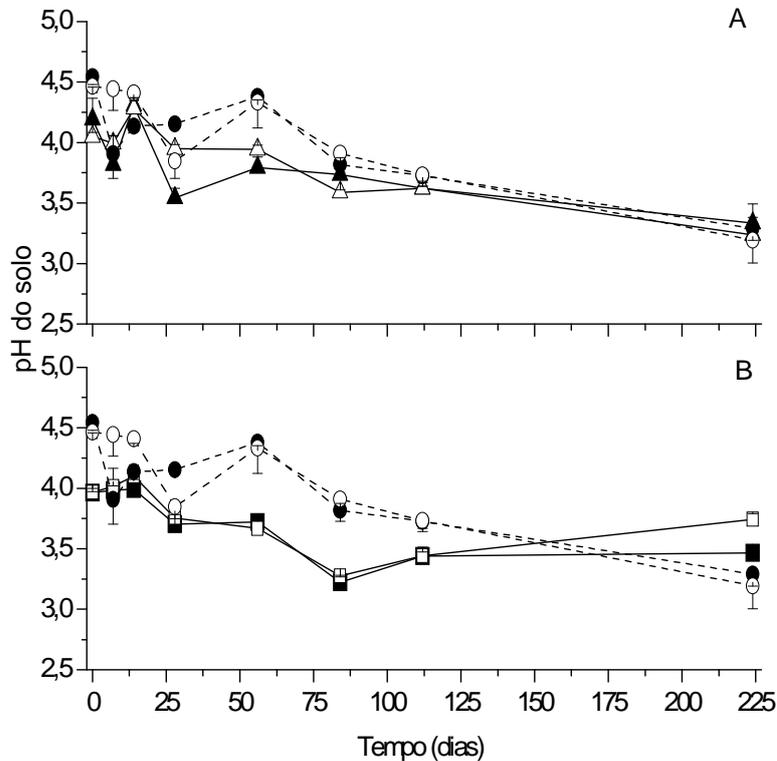


Figura 4: pH do solo. A) Biorreatores com *Lentinus crinitus* (▲ / △), B) Biorreatores com *P. castanella* (■ / □). Biorreatores controles (● / ○). Linhas sólidas biorreatores 1 e linhas pontilhadas biorreator 2.

A temperatura do solo em biorreatores pode ser influenciada tanto pelo metabolismo dos fungos quanto pela temperatura do ar injetado (Dupont *et al.* 1998, Alexander 1999). Nos biorreatores com *L. crinitus* a temperatura do solo foi superior à observada nos biorreatores controles até 68 dias de incubação, concordando com os dados de crescimento dessa espécie e o período em que foi possível seu isolamento no solo (Figura 5A). Já nos biorreatores com *P. castanella* a temperatura do solo foi superior àquelas medidas nos biorreatores controles entre os 14 e 45 dias de incubação (Figura 5 B). As maiores temperaturas do solo observadas nos biorreatores controles entre 52 e 125 dias de incubação possivelmente estejam relacionadas ao menor fluxo de ar ajustado nesses biorreatores ($1,5 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$), em relação ao que foi ajustado para os biorreatores com *P. castanella* ($7,5 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$). O fluxo de ar ajustado nos biorreatores controles foi o mesmo daqueles ajustados nos biorreatores com *L. crinitus*.

Além de promover a oxigenação necessária para o desenvolvimento dos fungos e para as reações de oxidação dos compostos organoclorados, a injeção de ar no solo dos

biorreatores também permite a manutenção da temperatura do solo para a faixa ótima de crescimento dos fungos (Lamar & Scholze 1992, Dupont *et al.* 1998, Heerenklage *et al.* 1998), sendo de 31°C para *L. crinitus* e 25° C para *P. castanella* (Matheus 2003).

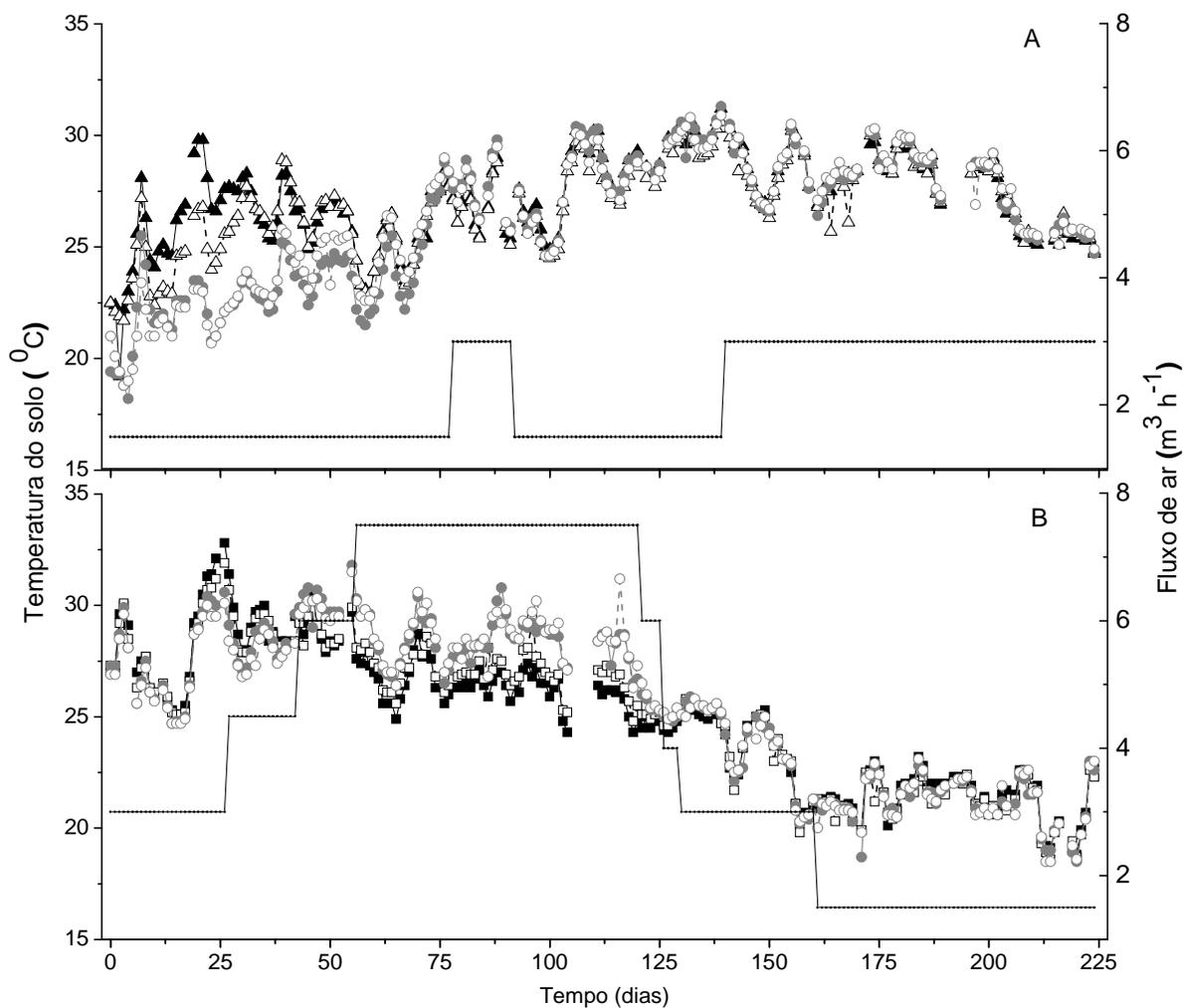


Figura 5: Monitoramento diário da temperatura do solo A) *Lentinus crinitus* (▲ / △) controles (● / ○). B) *Psilocybe castanella* (■ / □) e controles (● / ○). Biorreator (símbolos fechados) e biorreator 2 (símbolos abertos). Controle do fluxo de ar (-----).

A menor vazão de ar ($1,5 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) ajustada nos biorreatores foi calculada de modo a garantir completa oxigenação da massa de solo utilizada nos biorreatores, como sugerido por Dupont *et al.* (1998). No entanto, a oxigenação de toda a massa de solo em sistemas de biorremediação poder ser comprometida pela formação de caminhos preferenciais do fluxo de

ar através do solo, originando setores com menor oxigenação (Dupont *et al.* 1998, Heerenklage *et al.* 1998). A retirada de amostras de solo dos biorreatores pode ter originado setores com menor densidade, podendo também formar caminhos preferenciais do fluxo de ar. A formação de pressão nos sistemas de biorremediação de solo pode impedir a formação de caminhos preferências no solo (Heerenklage *et al.* 1998). No entanto, a vedação das tampas dos biorreatores foi planejada para garantir que não ocorresse liberação de possíveis voláteis não sendo suficiente para garantir aumento de pressão do sistema.

As concentrações de alguns macronutrientes no solo dos biorreatores, determinadas inicialmente e após 224 dias de incubação estão expressos na tabela 3. As concentrações iniciais de carbono orgânico total (COT), nitrogênio (N) e fósforo (P) entre os biorreatores com *L. crinitus* e controles não diferiram significativamente ($P>0,05$). Após 224 dias também não houve diferença significativa na concentração desses nutrientes entre esses biorreatores, tendo sido observada diminuição de cerca de 60% na concentração de COT e de 88% na concentração de N, e aumento de cerca de 10 vezes nas concentrações de P.

Entre as réplicas dos biorreatores com *P. castanella* também não foram observadas variações significativas nas concentrações iniciais de COT, N e P, as quais diferiram das concentrações iniciais dos biorreatores controles. Após 224 dias de incubação, a concentração de COT foi reduzida em cerca de 20 e 40% respectivamente nos biorreatores 1 e 2 com *P. castanella*. Não foram observadas reduções significativas nas concentrações de N e P após 224 dias de incubação de *P. castanella* nos dois biorreatores. Também não foram observadas variações significativas entre as concentrações de COT, N e P determinadas aos 224 dias, entre os biorreatores com *P. castanella* e controles.

Redução na concentração de COT e N evidenciam atividade biológica de microrganismos (Kiehl 1985), o que pode ser observado nos biorreatores com *P. castanella* e mais intensamente naqueles com *L. crinitus* e nos biorreatores controles. No entanto, foi possível avaliar somente as modificações cumulativas desses compostos entre o período

inicial e aos 224 dias de incubação, não sendo possível observar a cinética de degradação de *COT* e *N* no solo dos biorreatores no decorrer do período experimental. De acordo com descrito por Matheus & Bononi (2002) o solo utilizado aqui possuía baixa disponibilidade de matéria orgânica por ser típico de região de restinga e também, todo seu histórico de contaminação.

Tabela 3: Concentração dos macronutrientes no solo (mg kg⁻¹)

Nutrientes	Tempo de incubação	Biorreatores					
		<i>L. crinitus</i> 1	<i>L. crinitus</i> 2	<i>P. castanella</i> 1	<i>P. castanella</i> 2	Controle 1	Controle 2
COT (mg Kg ⁻¹)	Inicial	51666,7 A	76000,0 A	42100,0 A	40566,6 A	78333,3 A	72333,3 A
	224 dias	17100 B	28033,3 B	33600,0 B	22566,6 B	30033,3 B	23900,0 B
N (mg Kg ⁻¹)	Inicial	2433,3 A	422,2 A	546,6 A	362,0 A	2633,3 A	2966,7 A
	224 dias	417,0 B	152,2 B	320,3 A	365,0 A	412,5 B	276,7 B
P (mg Kg ⁻¹)	Inicial	6,0 A	10,6 A	59,9 A	68,3 A	11,6 A	6,5 A
	224 dias	79,7 B	77,8 B	80,9 A	60,3 A	96,5 A	64,6 B
C: N	Inicial	22,8 A	27,2 A	81,3 A	125,7 A	30,3 A	25,8 A
	224 dias	41,0 A	95,0 A	135,7 A	61,3 A	78,8 B	104,3 A

COT - carbono orgânico total; *N* - nitrogênio; *P* - fósforo; *C:N* – relação carbono:nitrogênio;

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, em cada categoria, não diferiram estatisticamente entre si de acordo com Teste Tukey (0,05%).

Sabe-se que os fungos exercem importante papel na ciclagem de fósforos no meio ambiente, disponibilizando muitas vezes esse macronutriente às plantas (Wells *et al.* 1998, Cerezine *et al.* 1988, Caesar-TonThat & Cochran 2001, Sawyer *et al.* 2003). O aumento na concentração de fósforo aos 224 dias indicou a mobilização desse macronutriente no solo exercida pelos microrganismo presentes, inclusive *L. crinitus* e *P. castanella*. Lima *et al.* (2003) descreve que a disponibilidade de fosfatos no solo está associada ao consumo das fontes de carbono e liberação de ácidos orgânicos pelos fungos, sendo importante lançar mão de métodos de extração que indiquem a possível origem dos compostos fosfatados presentes no solo. No presente trabalho, o método utilizado determinou a concentração de P totais.

A relação Carbono:Nitrogênio (C:N) do substrato do inóculo tem um efeito significativo na degradação de poluentes entre espécies de fungos de podridão branca (Lamar & White 2001), assim como é conhecida a influência da relação C:N nas taxas de degradação de organoclorados por basidiomicetos (Matheus & Bononi 2002). O aumento da C:N do substrato de cultivo aumentou a degradação de pentaclorofenol por *Phanerochaete chrysosporium*, não ocorrendo o mesmo para *Trametes versicolor* (Lamar & White 2001). Matheus & Bononi (2002) observaram que a relação C:N do substrato de cultivo não interferiu nas taxas de degradação de ^{14}C -HCB por *Lentinus cf. zeyheri* CCB 274 (posteriormente confirmado como *Lentinus crinitus* CCB 274), a qual foi maior, quando o substrato foi suplementado com 8% de óleo vegetal. Mas, esses autores observaram que as melhores taxas de mineralização desse composto por *Psilocybe castanella* CCB 444 foram obtidas, quando esse fungo foi crescido em substrato à base de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farinha de soja para ajuste da C:N para 90, além da suplementação do solo com 5% de óleo vegetal.

As diminuições da C:N observadas no experimento deve-se, muito provavelmente ao consumo acelerado do N na maioria dos reatores e isso pode ter influenciado as taxas de degradação dos organoclorados como será discutido mais adiante.

A atividade das enzimas secretadas por fungos lignocelulolíticos é fundamental na degradação de poluentes químicos em solo (Robles-Hernández *et al.* 2008). Mesmo perfil enzimático foi observado entre os biorreatores com *L. crinitus*, e entre os biorreatores com *P. castanella*. A maior atividade de fenoloxidasas e lacases ocorreu aos 14 dias de cultivo de *L. crinitus* nos biorreatores, quando foram detectadas $236,13 \pm 66,67$ U de fenoloxidasas kg^{-1} de solo e $137,04 \pm 91,36$ U de lacases kg^{-1} de solo no biorreator 1, e no biorreator 2 foram detectadas $176,40 \pm 29,16$ U de fenoloxidasas kg^{-1} de solo e $103,71 \pm 69,14$ U de lacases kg^{-1} de solo do biorreator 2. Aos 28 dias a atividade dessas enzimas diminuiu consideravelmente nos dois biorreatores, não tendo sido mais detectadas a partir dos 56 dias (Figura 6 A). Já nos

biorreatores com *P. castanella* os picos de atividade de fenoloxidasas ($76,39 \pm 0,00$ e $75,00 \pm 2,16$ U kg⁻¹ de solo) e lacases ($70,84 \pm 3,70$ e $72,22 \pm 6,48$ U Kg⁻¹ de solo) foram detectados na amostragem inicial. A partir dos sete dias de incubação as atividades dessas enzimas diminuíram até os 28 dias, voltando a ser detectadas novamente somente aos 56 dias de incubação (Figura 6 B). Não foram detectadas atividades de peroxidases dependentes do manganês em nenhum dos biorreatores com os basidiomicetos estudados. Nos biorreatores controles não foram detectadas qualquer atividade dessas enzimas em nenhuma das amostras, evidenciando tratar-se de um excelente indicador da atividade dos basidiomicetos no solo.

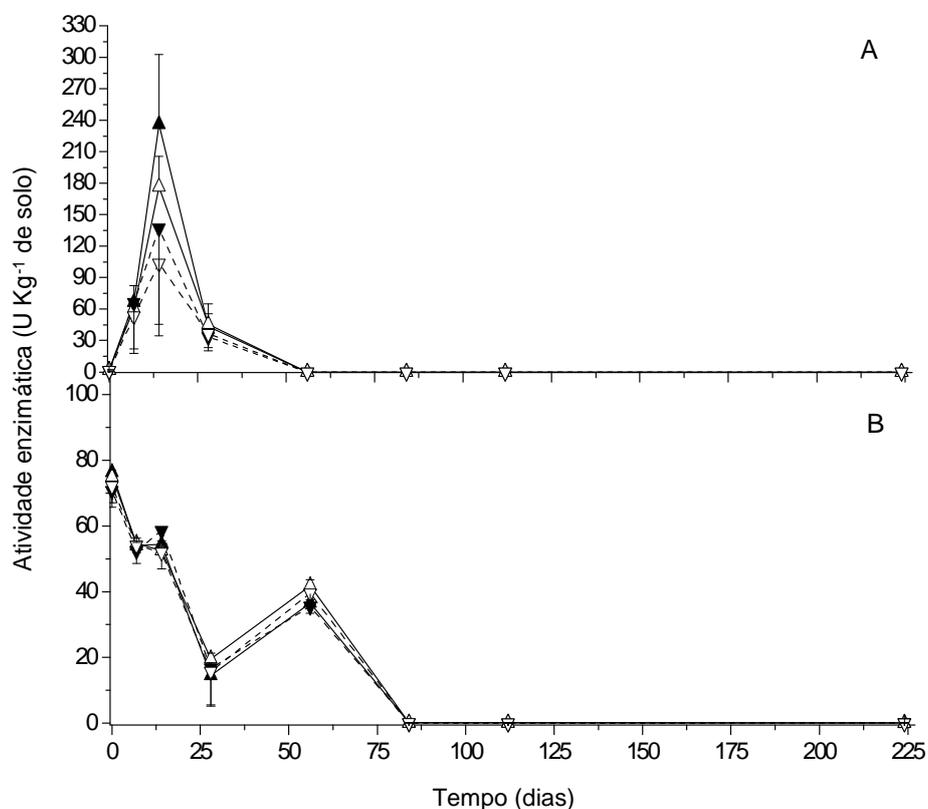


Figura 6: Atividade enzimática no solo. A) *Lentinus crinitus* e B) *Psilocybe castanella*. Atividade de fenoloxidasas (▲/△) e de lacases (▼/▽). Símbolos fechados biorreator 1 e abertos biorreator 2

Os picos de atividade de fenoloxidasas e lacases de *L. crinitus* ocorreram no período em que esse fungo apresentou bom crescimento no solo (entre 14 e 28 dias), efeito também observado por Okeke *et al.* (1997) que detectaram pico da atividade de fenoloxidasas (195,46

$\pm 7,10 \text{ U g}^{-1}$ de solo) de *Lentinula edodes* aos 14 dias de cultivo em solo contaminado por pentaclorofenol.

Ácidos orgânicos secretados pelos fungos podem influenciar a atividade ligninolítica, uma vez que eles podem atuar como mediadores nas reações de degradação de substratos lignocelulósicos (Hofrichter 2002) e de descoloração de corantes como o azul brilhante de remazol R (Moreira Neto *et al.* 2009 *in press*). Como observado por esses autores, maior atividade de lacases de *L. crinitus* e *P. castanella* ocorreu aos 14 dias, quando o pH do meio de cultivo foi de 3,5 e 4,5, respectivamente. A diminuição da atividade de fenoloxidasas e lacases nos biorreatores com *P. castanella* pode estar relacionada com o pH inicial do solo (3,9), que diminuiu ainda mais com o tempo de incubação.

Moreira-Neto (2006) relata que a presença de organoclorados no solo pode antecipar para 14 dias os picos das atividades de peroxidases e lacases secretadas por *P. castanella*, quando comparados com perfil enzimático deste fungo crescendo em solos não contaminados. No entanto, tal efeito só foi observado nos biorreatores com *L. crinitus* e não naqueles em que *P. castanella* foi incubado.

Matheus *et al.* (2003) observaram perfil da atividade de fenoloxidasas de *P. castanella* crescendo em solos não contaminados semelhante ao observado neste estudo. Por outro lado o perfil de fenoloxidasas secretadas por *L. crinitus* observadas por eles foi muito diferente ao observado no presente trabalho. No entanto, as atividades de fenoloxidasas das duas espécies observadas por esses autores foram muito superiores (aproximadamente 700 U kg^{-1} de solo) às observadas aqui, corroborando para a hipótese de que os organoclorados, além de influenciarem o desenvolvimento das duas espécies, também influenciaram as atividades das enzimas secretadas por eles.

Condições limitantes de nitrogênio favoreceram sistema ligninolítico de *Phanerochaete chrysosporium* (Rabinovich *et al.* 2004). Por outro lado, Machado (2003) já havia demonstrado que *Trametes villosa* (também estudada para degradação de

organoclorados) apresentou maior atividade ligninolítica quando foi cultivado em meio de cultivo com alta concentração de nitrogênio. Não é possível afirmar a partir de qual período a concentração desse macronutriente diminuiu significativamente no solo dos biorreatores. No entanto, a menor concentração de N também pode ter contribuído para a diminuição da atividade enzimática dos fungos estudados aqui.

A produção e atividade de peroxidases dependente de manganês (MnP) está intimamente relacionada com o bom desenvolvimento dos fungos, mas também com a presença de mediadores bioquímicos no sistema de cultivo, embora muitos desses mediadores possam ser produzidas pelo metabolismo do próprio fungo (Hofrichter 2002, Moreira-Neto 2006, Jarosz-Wilkolazka & Graz 2006, Asgher *et al.* 2008). Mohammadi & Nasernejad (2009) observaram que a imobilização de células de *Phanerochaete chrysosporium* em bagaço de cana-de-açúcar favoreceu a produção e atividade de MnP (76 U l⁻¹) em comparação com células sem imobilização (aproximadamente 50 U l⁻¹), em 7 dias de incubação. Embora tenha sido usado bagaço de cana como substrato para inóculo dos fungos estudados aqui, é possível que o procedimento de fragmentação do inóculo 24 horas antes de sua utilização nos biorreatores tenha contribuído para baixas atividades enzimáticas, principalmente de MnP.

No entanto, Moreira-Neto (2006) também não detectou atividade de MnP de *Psilocybe castanella* cultivado em microcosmos com solo contaminado por hexaclorobenzeno (Grau técnico), sugerindo que as condições de cultivo tenham provocado essa inibição. O sistema de cultivo utilizado aqui foi muito parecido com o utilizado por ele, exceto a concentração de HCB que aqui foi muito superior, além das maiores concentrações de outros organoclorados, que pode ter contribuído para inibição da atividade de MnP.

Hexaclorobenzeno, sendo o composto em maior concentração no solo, foi utilizado como indicador de homogeneidade do solo, com cerca de 25,00 g kg⁻¹ de solo. Não houve diferenças significativas da concentração de HCB no solo utilizado nos diferentes biorreatores com *L. crinitus* (P = 0,060), entre aqueles utilizados com *P. castanella* (P = 0,999) e nem

entre aqueles utilizados como controles ($P = 0,966$). Não foi observada variação entre a concentração de HCB antes e após inoculação dos fungos no solo dos seis biorreatores estudados ($P > 0,05$). Nas amostragens iniciais foram detectados hexaclorobenzeno ($22,66 \pm 2,35 \text{ g kg}^{-1}$), pentaclorobenzeno ($2,73 \pm 0,24 \text{ g kg}^{-1}$), 1,2,4,5 tetraclorobenzeno - TCB 1 ($2,4 \pm 0,12 \text{ g kg}^{-1}$), 1,2,3,4 tetraclorobenzeno - TCB 2 ($0,069 \pm 0,018 \text{ g kg}^{-1}$), hexaclorobutadieno ($0,33 \pm 0,18 \text{ g kg}^{-1}$) e pentaclorofenol ($0,012 \pm 0,002 \text{ g kg}^{-1}$).

Embora em estudos em microcosmo, com as mesmas condições experimentais aqui adotadas, Matheus (2003) tenha observado que *L. crinitus* foi capaz de remover cerca de 68 % de dos $41,10 \text{ g de HCB kg}^{-1}$ de solo e mineralizar cerca de 25% de $^{14}\text{C-HCB}$ em 56 dias de incubação quando 8% de óleo vegetal foi adicionado ao solo, e *P. castanella* degradou 71 % de HCB e mineralizou 12% de $^{14}\text{C-HCB}$ no mesmo período de incubação, as concentrações de HCB aos 224 dias não diferiram das concentrações iniciais nos solos dos biorreatores com *L. crinitus* ($P = 0,844$ e $0,999$, respectivamente), nos solos dos biorreatores com *P. castanella* ($P = 0,899$ e $0,101$) e nem nos solos dos biorreatores controles ($P = 0,417$ e $0,999$).

Vitali (2004) também observou a redução de 42,82% HCB por *P. castanella* e *Eupenicillium baarnense* em solo com cerca de 3770 mg kg^{-1} de solo e Moreira-Neto (2006) observou 32,40% degradação de HCB após 70 dias de incubação de *P. castanella* em solo com 1104 mg kg^{-1} de solo. Nakagawa & Andrea (2006) observaram que a suplementação do mesmo solo com bagaço de cana-de-açúcar aumentou o número de bactérias e fungos presentes no solo, mas também não observaram degradação ou mineralização de HCB por estes microrganismos. A grande massa de HCB no solo, associada à grande variância dos dados podem ser dois fatores que dificultaram a detecção de transformação do HCB nessa escala de biorreatores.

As taxas de degradação do PeCB não se reproduziram entre os biorreatores. Enquanto em um biorreator com *L. crinitus* a concentração de PeCB aos 224 dias de incubação não se diferenciou da concentração inicial ($P=0,167$), no segundo biorreator constatou-se degradação

de cerca de de 30% de PeCB no mesmo período ($P = 0,090$). Nos biorreatores com *P. castanella* as concentrações de PeCB aos 224 dias também não diferiram das determinadas inicialmente ($P = 0,214$ e $P = 0,207$). Assim como nos biorreatores com *L. crinitus*, nos biorreatores controle houve diferença nas taxas de degradação entre as réplicas. Enquanto em um biorreator não houve degradação significativa do PeCB, no segundo biorreator observou degradação de 19,35% de PeCB ($P=0,028$), indicando alta atividade microbiana também nestes biorreatores sem presença de basidiomicetos (Figura 7).

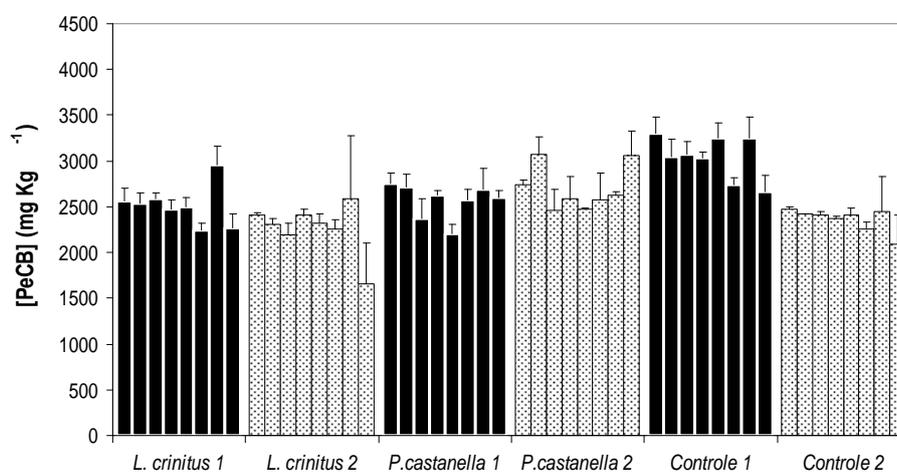


Figura 7: Concentração de pentaclorobenzeno (PeCB) no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação).

O PeCB é o primeiro composto originado a partir da degradação física e biológica de HCB (Field & Sierra-Alvarez 2008, Shih *et al.* 2009) e por essa razão, sua determinação torna-se importante para detecção da formação ou degradação biológica deste composto durante a biorremediação de solo. Matheus (2003) observou que *P. castanella* reduziu cerca de 50% de PeCB em ensaios em microcosmos com 30 g de solo e 2,5% de óleo vegetal, enquanto que Vitali (2004) observou a redução de cerca de 60% na concentração de PeCB em cultivo de duas linhagens de *Eupenicillium baarnense* e *E. cf. crustaceum* e em sucessão com *P. castanella*. No entanto, esses autores demonstraram a degradação de PeCB cumulativa

durante 56 dias de incubação, não sendo possível observar se houve aumento da sua concentração durante o período amostral avaliado por eles.

Por sua vez as concentrações de 1,2,4,5 tetraclorobenzeno (TCB 1) determinadas aos 224 dias nos solos dos biorreatores 1 e 2 com *L. crinitus* se reduziram em 23,68 e 38,24% se comparadas às concentrações iniciais ($P = 0,073$ e $P=0,014$, respectivamente). No bioreator 1 com *P. castanella* a concentração de TCB-1 aos 224 decaiu em 14% ($P=0,013$), sendo que no bioreator 2 não se detectou degradação desta molécula ($P = 0,398$). A concentração desse composto após o período de incubação foi 37,29 e 32,46% menor que a concentração inicial detectada nos biorreatores controles ($P = 0,010$ e $0,032$, respectivamente) (Figura 8).

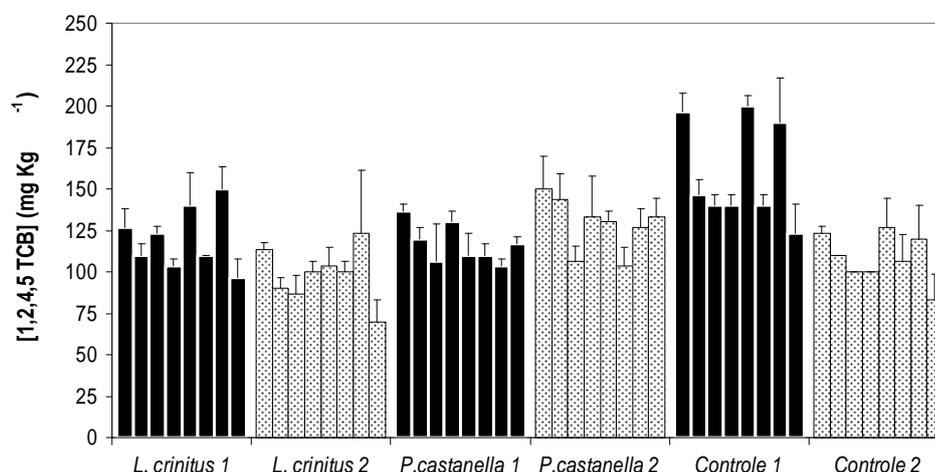


Figura 8: Concentração de 1,2,4,5 tetraclorobenzeno (TCB-1) no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem, após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)

As concentrações de 1,2,3,4 tetraclorobenzeno (TCB-2) no solo dos biorreatores mostrou perfil muito semelhante ao observado para TCB 1 (Figura 9), embora este último esteve presente em maior concentração em todas as amostras. As concentrações de TCB-2 após a incubação de *L. crinitus* foram reduzidas em 21,43 e 28,57% em ambos biorreatores ($P = 0,10$ e $P = 0,047$ respectivamente). Já nos biorreatores com *P. castanella* observou-se 20% de redução no bioreator 1 e não se observou redução no segundo bioreator ($P>0,001$ e

P=0,51 respectivamente). Nos solos dos dois biorreatores controles as concentrações de TCB-2 aos 224 dias reduziram 30,00 e 26,67% (P = 0,013 e 0,016, respectivamente).

As taxas de degradação de TCB1 e TCB2 observadas nos biorreatores controles indicam que a microbiota autóctone também foi capaz de degradar as moléculas nas condições de bioestimulação estabelecidas. O fato das taxas de degradação de TCB1 e TCB2 nos biorreatores com basidiomicetos serem relativamente menores que nos biorreatores controles não significa necessariamente que estes têm desempenho inferior, uma vez que estas moléculas são sub-produtos da degradação de HCB e PeCB e podem estar sendo geradas a partir da degradação destes últimos pelos basidiomicetos.

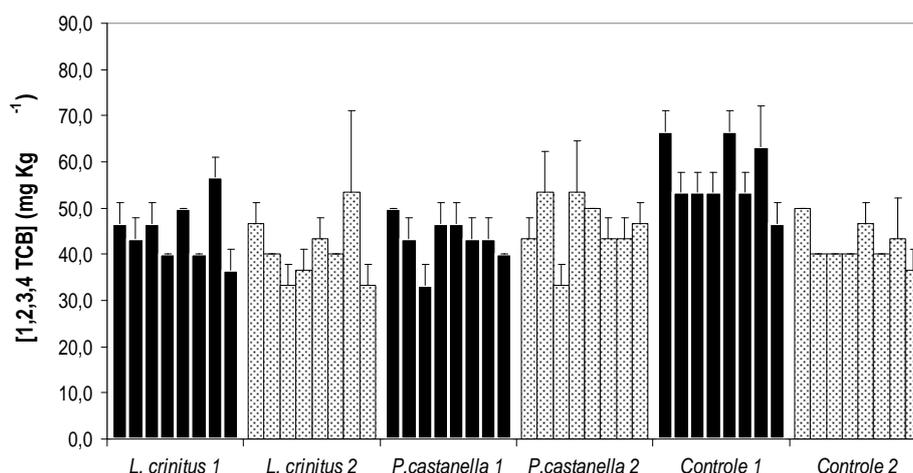


Figura 9: Concentração de 1,2,3,4 tetraclorobenzeno (TCB-2) no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)

Embora TCB-1 e TCB-2 tenham menor estabilidade química em relação à HCB, a degradação desses compostos requer adaptações dos microrganismos para que eles possam produzir substâncias capazes de desestabilizar o anel benzênico (Field & Sierra-Alvarez 2008), pois a remoção de íons cloreto ocorre com maior intensidade após o rompimento do anel benzênico (Shih *et al.* 2009). Quando ocorre a formação de isômeros de TCB originado da cadeia de reações de desalogenação de HCB, existe maior acúmulo de 1,2,3,4

tetraclorobenzeno (TCB-2), como observado, uma vez que a posição dos átomos de cloro em sua molécula confere maior estabilidade química a este composto (Fathepure & Vogel 1991).

D'Annibale *et al.* (2005), Matheus (2003), Vitali (2004) e Vitali *et al.* (2006) demonstraram remoção de TCB 2 por fungos. Mas, nesse trabalho as concentrações iniciais de TCB-1 e TCB-2 (58,52 e 17,48 mg Kg⁻¹, respectivamente) observadas por Matheus (2003) e aquelas (26,89 e 6,84 mg Kg⁻¹, respectivamente) observadas por Vitali (2004) foram muito inferiores às concentrações iniciais desses compostos observadas nos solos dos biorreatores estudados aqui.

As taxas de degradação de HCBU variaram muito entre os tratamentos. Enquanto observaram-se acréscimos nas concentrações até os 28 dias de incubação, seguidos da total degradação de HCBU em *L. crinitus* e nos biorreatores controles, nos biorreatores com *P. castanella* observaram-se taxas de degradação de 98,2 e 96,7 % (P<0,01) a partir das altas concentrações iniciais detectadas naqueles solos (Figura 10).

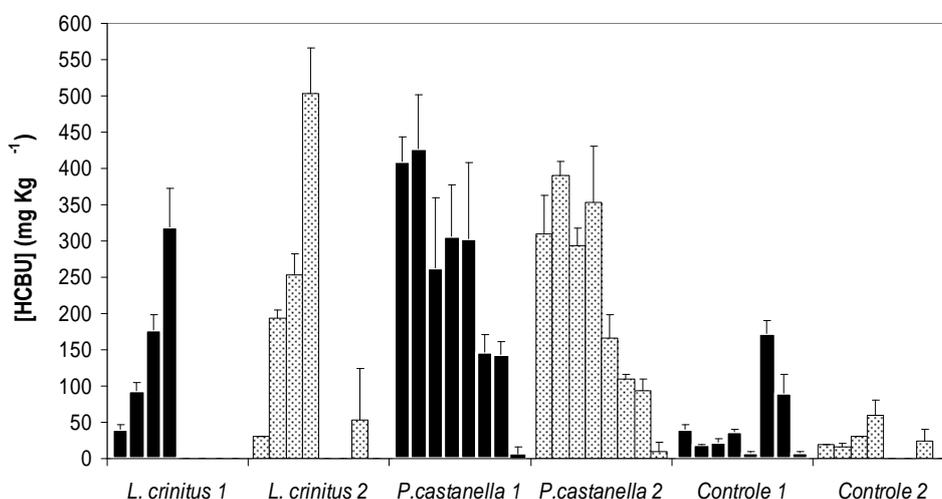


Figura 10: Concentração de hexaclorobutadieno (HCBU) no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)

Apenas recentemente, Li *et al.* (2008) observou degradação de HCBU em solo (50 mg L⁻¹) pela ativação da microbiota presente, e puderam constatar a total remoção desse

composto em solo pela bactéria gram-negativa *Serratia marcescens* em 7 dias de incubação à 30° C e pH do solo entre 7,5 e 8,0. Como foi possível observar neste trabalho, *L. crinitus* promoveu a total remoção de HCBU na concentração de cerca de 500 mg kg⁻¹, muito maior do que a descrita por Li *et al.* (2008), em praticamente 56 dias de incubação.

No entanto, o aumento de HCBU aos 28 dias de cultivo de *L. crinitus* no solo dos biorreatores parece ser um efeito biótico decorrente da degradação de outros clorados pelo basidiomiceto, se compararmos com os controles, uma vez que o aumento da concentração desse composto nos controles se deu mais tarde e em concentração bem inferior do que nos biorreatores com *L. crinitus*.

A grande redução de HCBU observada no solo dos biorreatores com *P. castanella* é um dado novo, pois são raros dados de degradação desse composto por fungos, indicando uma vertente para estudos dos caminhos de degradação de HCBU por fungos basidiomicetos. Por outro lado, se observou aumento significativo na concentração de íons cloreto a partir dos 56 dias de incubação dos basidiomicetos, principalmente onde *P. castanella* foi incubado. Tal efeito também deve estar associado à degradação de outros compostos clorados. Outro aspecto que deve ser levado em conta é a presença de outros microrganismos no solo dos biorreatores, o que pode também ter contribuído para alterações na concentração de HCBU e dos outros clorados no solo, embora se tenha observado diferença muito expressiva entre os biorreatores com os fungos estudados e os controles (Figura 10).

Da mesma forma que para HCBU, observou-se aumento e posterior degradação de pentacloroefenol - PCF nos biorreatores com *L. crinitus* e nos controles sem basidiomicetos, sendo que *P. castanella* não promoveu a formação de PCF, apenas degradou completamente as quantidades do composto já presentes no solo (Figura 11).

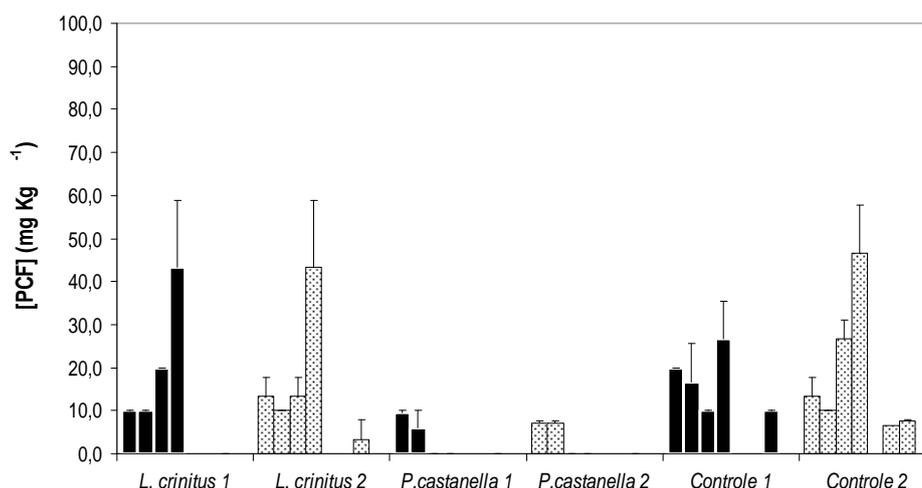


Figura 11: Concentração de pentaclorofenol (PCF) no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação).

Como perfil da concentração de PCF observada no solo dos biorreatores controles foi, de certa forma, parecido com o observado nos biorreatores com *L. crinitus*, pode-se supor que o desaparecimento de PCF pode ter sido promovido pelos outros microrganismos bioestimulados pela aeração, acréscimo de óleo vegetal e bagaço de cana-de-açúcar no solo. Barbeau *et al.* (1997) observaram redução em cerca de 80% de PCF após tempo de aclimatação do solo para ativação da microbiota autóctone, chamando atenção para que o desprendimento de PCF da matéria orgânica é influenciado pelas características físico-químicas do solo. Além disso, esses autores observaram uma diminuição significativa do pH do solo na medida em que PCF foi degradado como ocorreu neste trabalho. Okeke *et al.* (1997) observaram degradação de 99% de PCF em solo (inicial de 130 mg kg⁻¹) por *Lentinula edodes* em 10 semanas, tendo relacionado com o período de maiores atividades enzimáticas.

É bem descrita a formação de pentacloroanizol pela degradação de PCF (Chung & Aust 1990, Machado *et al.* 2005b). Entretanto, pentacloroanizol não foi detectado no solo de nenhum dos biorreatores estudados. No entanto, Walter *et al.* (2005) observou completa remoção de pentaclorofenol por *Trametes versicolor* em biorreator, não observando a formação de pentacloroanizol ao final do tratamento avaliado por eles.

Durante as análises cromatográficas foi detectado o aparecimento de compostos que não puderam ser identificados, sendo considerados aqui como “Totais de Picos Não Identificados” ou TPNI. De acordo com a figura 12, ficou evidente a formação de tais compostos a partir dos 84 dias de incubação de *L. crinitus* e nos biorreatores controles. Nos biorreatores 1 e 2 com *L. crinitus* a concentração de TPNI diminuiu significativamente ($P = 0,004$) dos 84 até 224 dias de incubação, embora no biorreator 2 este efeito não tenha sido significativo ($P = 0,171$). Nos dois biorreatores com *P. castanella* as concentrações iniciais de TPNI foram muito superiores (cerca de 3400 mg kg^{-1}) em relação aos biorreatores com *L. crinitus* e os controles. Nos biorreatores com *P. castanella* as concentrações de TPNI diminuíram 85,09% e 79,50%, respectivamente, aos 224 dias de incubação (ambos os valores de $P > 0,001$), degradação esta muito superior à observada nos biorreatores com *L. crinitus*.

No solo do biorreator controle 1 observou-se diminuição significativa ($P = 0,032$) da concentração de TPNI aos 224 dias de incubação, enquanto que no segundo biorreator observou-se que as concentrações de TPNI continuavam aumentando. Isto pode ter ocorrido porque entre os compostos não identificados muito provavelmente estão presentes os subprodutos da degradação de outros clorobenzenos, como descrito por Field & Sierra-Alvarez (2008), mas também compostos clorofenóis como triclorofenóis, diclorofenóis ou monoclorofenóis (Marsolek *et al.* 2007) oriundos da degradação de PCF ou mesmo de alguma reação com os clorobenzenos.

O aumento da concentração de TPNI muito provavelmente esteja também relacionado à degradação de HCBU. Entretanto, não é fácil obter informações sobre caminhos de degradação de HCBU por via biológica (Corden *et al.* 2006).

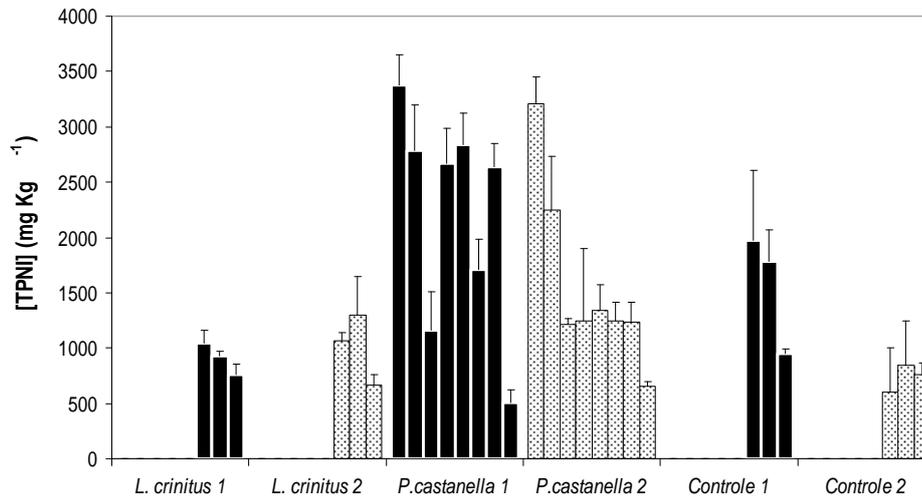


Figura 12: Concentração de Totais de Picos Não Identificáveis (TPNI) no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem, após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)

O aumento da concentração de íons cloreto no solo é proveniente da desalogenação dos organoclorados, e pôde ser observado nos biorreatores com os basidiomicetos estudados (Figura 13). Foram observados aumentos significativos ($P = 0,017$) nas concentrações de íons cloreto em ambos os biorreatores com *L. crinitus*, a partir dos 56 e 112 dias de incubação, assim como nos biorreatores com *P. castanella* a partir 84 e 56 dias de incubação respectivamente ($P = 0,003$ e $P = 0,038$). No entanto, não foram observadas variações significativas nas concentrações de íons cloreto nos solos dos biorreatores controles durante todo período de incubação.

O aumento da concentração de íons cloreto é indicador direto das reações de degradação de compostos clorados tanto em estudos *in vitro* como em escala de campo (Aiken & Logan 1996).

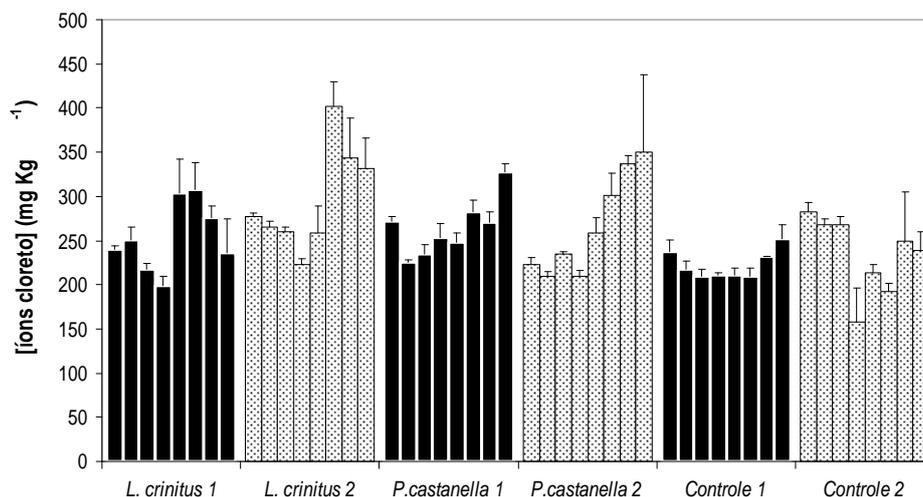


Figura 13: Concentração de íons cloreto no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem, após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)

Segundo Matheus *et al.* (2000) *P. castanella* CCB 444 proporcionou menor concentração de íons cloreto em relação a outro basidiomiceto, durante a avaliação de degradação de HCB, atribuindo a *P. castanella* maior efeito sobre as transformações de HCB e outros clorados. Embora não se tenha observado reduções na concentração de HCB, o aumento da concentração de íons cloreto no solo dos biorreatores onde *P. castanella* foi incubado, indica degradação dos outros clorobenzenos e clorofenóis, presente no solo. Machado *et al.* (2005b) observaram que na medida em que a degradação de PCF foi maior, a concentração de íons cloreto aumentou no solo onde *P. castanella* CCB 444 foi incubado. A concentração de íons cloreto aumentou em 53,34 % na medida em que *P. castanella* CCB 444 promoveu degradação de 32,40 % de HCB *in vitro*, conforme descrito por Moreira-Neto (2006). De acordo com Li *et al.* (2008), a concentração de íons cloreto aumentou com a degradação bacteriana de hexaclorobutadieno (HCBU) pela linhagem HL1 de *Serratia marcescens*, cultivada em meio de cultura.

Aos 56 dias de incubação foi observada a completa remoção de HCBU no solo dos biorreatores com *L. crinitus*, mesmo período em que foi observado aumento expressivo na concentração de íons cloreto no solo do biorreator 1 com esse fungo. Observando as figuras

10 e 13 é possível inferir correspondência entre a diminuição da concentração de HCBU e o aumento na concentração de íons cloreto no solo dos biorreatores com *P. castanella*, indicando a degradação desse organoclorado resultando em íons cloretos por *P. castanella*.

Produtos da degradação de organoclorados podem aumentar a toxicidade do solo (Sander *et al.* 1991, Barbeau *et al.* 1997, Machado *et al.* 2005b). A toxicidade aguda do lixiviado do solo foi influenciada pelo aparecimento de compostos clorados originados a partir da degradação de TCB 1 e 2, HCBU, PCF e os TPNI. O perfil da toxicidade aguda do lixiviado do solo sobre *Daphnia similis* exibido nos biorreatores com *L. crinitus* e controles foram diferentes daqueles observados nos biorreatores com *P. castanella* (Figura 14). A toxicidade do solo nos biorreatores com *L. crinitus* foi maior aos 56 dias (26,96 Unidade tóxica aguda (Uta) e 24,15 Uta, respectivamente) em relação à TAS determinada inicialmente (4,33 Uta e 3,40 Uta, respectivamente), entretanto, diminuiu significativamente aos 224 dias (1,38 Uta e 1,50 Uta, respectivamente). Mesmo perfil foi observado nos controles, onde a TAS foi maior aos 56 dias de incubação (34,20 Uta e 23,55 Uta, respectivamente) em relação à TAS determinada inicialmente (3,86 Uta e 3,53 Uta, respectivamente), diminuindo aos 224 dias (1,36 Uta e 0,36 Uta, respectivamente). A TAS inicial nos biorreatores com *P. castanella* (15,10 Uta e 11,31 Uta, respectivamente) foi bem maior em relação à toxicidade inicial dos outros biorreatores, sendo observada diminuição significativa até 224 dias de incubação (1,78 Uta e 0,21 Uta, respectivamente).

A maior TAS para *Daphnia similis* observada aos 56 dias nos biorreatores com *L. crinitus* e biorreatores controles seguida de significativa diminuição aos 224 dias de incubação, seguiu os perfis de aparecimento e de degradação de TCB1 e 2, e mais evidentemente de HCBU, PCF e TPNI nos solos. Diferente do observado nos biorreatores acima descritos, as TAS dos dois biorreatores com *P. castanella* diminuíram até 224 dias ($P=0,003$ e $0,00003$ respectivamente), também acompanhando os perfis de degradação de TCB1, TCB2, PCF, HCBU e TPNI.

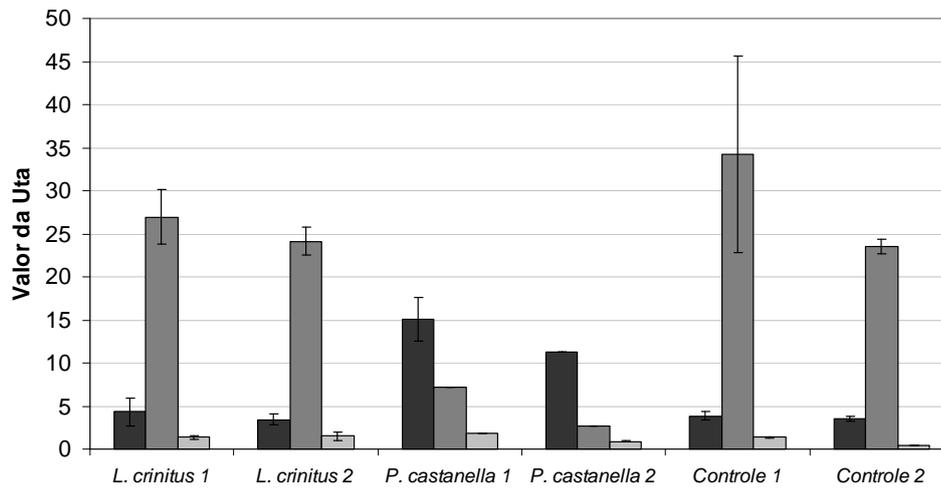


Figura 14: Toxicidade aguda do solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem de solo após inoculação do fungo no solo, aos 56 e 224 dias de incubação. Unidade tóxica aguda (Uta) equivale a razão entre 100 / CE50.

Dependendo das alterações nas características físicas do solo moléculas de organoclorados, como HCB, podem ser solubilizadas, influenciando assim a toxicidade do solo.

Matheus (2003) relata a possibilidade de diluição de HCB pelo bagaço de cana-de-açúcar, tornando-o mais disponível ou favorecendo sua ligação à matriz sólida do solo em 28 dias de incubação, o que muito provavelmente tenha ocorrido com outros organoclorados no solo dos biorreatores estudados aqui, e portanto, ter causado aumento da TAS aos 56 dias de incubação de *L. crinitus* e nos controles. No entanto, não se descarte a ação biótica desse fungo na redução de HCBU e PCF no mesmo período em que foi observado aumento de TPNI e íons clorados.

A maior TAS inicial observada no solo dos biorreatores com *P. castanella* (15,10 Uta e 11,31 Uta, respectivamente aos biorreatores 1 e 2) muito provavelmente esteve relacionada ao tempo em que o solo ficou depositado nos biorreatores, aguardando início do tratamento. No entanto, foi muito evidente a ação biótica desse fungo na diminuição da TAS. Por outro lado, a TAS inicial pode ter contribuído para diminuir o desenvolvimento inicial de *P.*

castanella, pois, como já foi discutido, o perfil enzimático do solo se mostrou atípico de experiências anteriormente realizadas.

As condições de cultivo nos biorreatores não foram amplamente favoráveis para o desenvolvimento de *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella*, não sendo possível por esse motivo reproduzir as taxas de degradação de HCB obtidas por Matheus (2003).

A suplementação de nutrientes no sistema de cultivo, ajuste da relação C:N e a produção do inóculo fúngico com qualidade são os aspectos que mais devem ser considerados nas pesquisas de biorremediação de poluentes em escalas maiores de tratamento.

A produção de inóculo de *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella* aplicados nos biorreatores seguiu o mesmo padrão descrito por Matheus *et al.* (2003), quando observaram bom desenvolvimento dessas espécies no solo sem contaminação química.

O baixo desenvolvimento dos fungos estudados aqui no solo dos biorreatores, muito provavelmente se deve à baixa viabilidade do inóculo, que deve ter se agravado pela fragmentação antes da sua incorporação junto ao sistema de cultivo. Além disso, a idade do inóculo fúngico a ser utilizado em processos de biorremediação deve levar em conta o estágio de maior produção e maior atividade das enzimas envolvidas nas reações de biodegradação. Ballaminut & Matheus (2007) observaram que a melhor idade dos inóculos de *Psilocybe castanella* CCB 444 e *Lentinus crinitus* CCB 274, para aplicação em processos de biorremediação de organoclorados, é de 10 e 15 dias, respectivamente, em bagaço de cana-de-açúcar nas mesmas condições descritas por Matheus & Bononi (2002). Segundo eles, nesse período ainda estão disponíveis substrato e nutrientes suficientes para garantir a colonização vigorosa com boa atividade enzimática dessas espécies.

A imobilização do inóculo fúngico em peletes vem sendo uma alternativa estudada para minimizar a perda de viabilidade do inóculo fúngico (Loomis *et al.* 1997, Compart *et al.* 2007).

Conclusões

- As condições de cultivo de *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella* não foram satisfatórias para seus desenvolvimentos. O emprego de óleo vegetal no solo pode ter favorecido a maior solubilização dos compostos clorados e alterado a permeabilidade da membrana plasmática dos fungos, tornando-os mais suscetíveis à ação tóxica do solo.
- A presença de fungos e bactérias oportunistas pode contribuir para a biodegradação de organoclorados desde que não sejam competitivos durante o período de aclimação e colonização inicial dos basidiomicetos aplicados à biorremediação de solo;
- Apesar de *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella* não terem sido capazes de promover reduções significativas na concentração de hexaclorobenzeno nos solos, pôde-se constatar efeitos bióticos na transformação e remoção de pentaclorobenzeno, tetraclorobenzenos, hexaclorobutadieno e pentaclorofenol, além da formação de compostos não identificados, nos biorreatores com *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella*;
- O aumento na concentração de compostos clorados não identificados e íons cloreto esteve relacionado com a diminuição da concentração de hexaclorobutadieno e pentaclorofenol;
- A formação de compostos clorados aumentou a toxicidade aguda do solo. No entanto, as duas espécies estudadas foram capazes de reduzir a toxicidade do solo após 224 dias de incubação. Existem evidências de que a bioestimulação dos solos pode contribuir para a degradação de compostos organoclorados nos solos estudados, bem como a toxicidade aguda do lixiviado dos solos;
- A formação de caminhos preferenciais do fluxo de ar através do solo pode ser um dos fatores que devem ser controlados no solo dos biorreatores.

- Contudo, são necessários estudos para melhorar as condições de cultivo de *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella* para aplicação desses basidiomicetos no solo contaminado por organoclorados contido nos biorreatores.

Agradecimentos

Deixamos expressos nossos agradecimentos ao Instituto de Botânica de São Paulo e ao Programa de Pós-graduação desse instituto pelo apoio institucional desse projeto, à Fundação para o desenvolvimento da pesquisa agropecuária e à Rhodia do Brasil, pelo apoio financeiro e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - CAPES.

Referências bibliográficas

- Aiken, B.S. & Logan, B.E.** 1996. Degradation of pentachloophenol by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown in ammonium lignosulphonate media. *Biodegradation*. 7: 175-182.
- Alexander, M.** 1999. *Biodegradation and Bioremediation*. New York: Ed. Academic Press, 453p.
- Almeida, F.V., Caetano, A.J., Bisinoti, M.C., Jardim, W.F.** 2007. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. *Química Nova*, 30 (8): 1976-1985.
- Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M., Legge, R.L.** 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white-rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas - NBR 12713.** 2004. *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com Daphnia spp (Cladocera, Crustácea)*.
- Aust, S.D.** 1990. Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbial Ecology* 20 (1): 197-209.

- Ballaminut, N. & Matheus, D. R.** 2007. Characterization of fungal inoculum used in soil remediation. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 248-252.
- Barajas-Aceves, M., Hassan, M., Yinoco, R., Vazquez-Duhalt, R.** 2002. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. *Journal of Microbiological Methods* 50: 227-236.
- Barbeau, C., Deschenes, L., Karamanev, D., Comeau, Y., Samson, R.** 1997. Bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 745-752.
- Bourbonnais, R. & Paice, M.G.** 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*. 267: 99-102.
- Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D., Aust, S.D.** 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by white rot fungus. *Science* 228 (4706): 1434-1436.
- Caesar-TonThat, T.C., Cochran, V.L.** 2001. Role of a saprophytic basidiomycete soil fungus in aggregate stabilization. *In: Stott, D.E., Mahtar, R.H., Steinhardt, G.C.* 1999. *Suitaining the Global Farm*. 10th International Soil Conservation Organization Meeting held. France, Purdue University and the USDA-ARS National Soil Erosion Research Laboratory.
- Cerezine, P.C., Nahas, E., Banzatto, D.A.** 1988. Soluble phosphate accumulation by *Aspergillus niger* from fluorapatite. *Applied Microbiology Biotechnology* 29: 501-505.
- Chung, N. & Aust, S.D.** 1995. Degradation of pentachlorophenol in soil by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials* 41: 177-183.
- Compart, L. C. A., Machado, K. M. G., Matheus, D. R. & Cardoso, A. V.** 2007. Immobilization of *Psilocybe castanella* on ceramic (slate) supports and its potential for soil bioremediation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23 (10): 1479-1483.

- Corden, C, Kakareka, S, Weem,** 2006. A.P. Track B Review for the UNECE LRTAP Task Force on Persistent Organic Pollutants.
- D'Annibale, A., Ricci, M., Leonardi, V., Quaratino, D., Mincione, E., Petruccioli, M.** 2005. Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. *Biotechnology and Bioengineering* 90: 6 723-731.
- Davis, M.W. & Lamar, R.T.** 1992. Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass. *Soil Biology & Biochemistry* 24 (3): 189-198.
- Dupont, R. R., Bruell, C. J., Marley, M. C., Downey, D. C., Norris, R. D., Hulling, S. G. & Pivets, B.** 1998. *Bioremediation*. Annapolis: American Academy of Environmental Engineers and USEPA. 596p.
- Fathepure, B.Z., Vogel, T.M.** 1991. Complete degradation of polychlorinated hydrocarbons by two-stage biofilm reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (12): 3418-3422.
- Field, J.A., Sierra-Alvarez, R.** 2008. Microbial degradation of chlorinated benzenes. *Biodegradation* 19: 463-480.
- Heerenklage, H.,K., Woyczehowski, H., Bollow, S., Stegmann, R.** 1998. Influence of oxygen on the degradation of Diesel Fuel in Soil Bioreactors. *Acta Biotechnology* 2: 109-122.
- Hofrichter M.** 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 454-466.
- Holroyd, M.L. & Caunt, P.** 1995. Large-Scale Soil Bioremediation Using White-Rot Fungi. *In: Bioaugmentation for Site Remediation*. Hinchee, R., Fredrickson, J., Alleman, B.C. (eds.). Columbus: Battelle Press 181-187.

- Itoh, K., Fujita, M., Kumano, K., Suyama, K., Yamamoto, H.** 2000. Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 85-91.
- Jarosz-Wilkoazka, A. & Graz, M.** 2006. Organic acids production by white rot Basidiomycetes in the presence of metallic oxides. *Canadian Journal Microbiology* 52: 779-785.
- Kiehl, E. J.** 1985. Fertilizantes orgânicos. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 492p.
- Kirk, T. K. & Farrell, R. L.** 1987. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41: 465-505.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A.** 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*. 169: 247-250.
- Lamar, R.T. & Scholze, R.J.** 1992. White-rot fungi biodegradation of PCP-treated ammunition boxes. *In: Proceedings of R&D 92 National research & development conference on the control of hazardous materials, San Francisco – California.*
- Lamar, R.T. & White, R.B.** 2001. Mycoremediation – Commercial status and recent developments. *In: Magar, V.S., von Fahnestock, F.M., Leeson, A. (Eds). Ex Situ Biological Treatment Technologies. Columbus: Battelle Press 157-164.*
- Li, MT., Hao, L.L., Sheng, L.X., Xu, J.B.** 2008. Identification and degradation characterization of hexachlorobutadiene degrading strain *Serratia marcescens* HL1. *Bioresource Technology* 99: 6878-6884.
- Lima, M.A.B., Nascimento, A.E., Souza, W., Fukushima, K., Campos-Takaki, G.M.** 2003. Effects of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. *Brazilian Journal of Microbiology* 34: 363-372.

- Loomis, A.K., Childress, A.M., Daigle, D., Bennett, J.W.** 1997. Alginate Encapsulation of the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Current Microbiology* 34: 127–130.
- Machado, C.F.** 2003. Influência do nitrogênio e do óleo de soja na atividade ligninolítica de *Trametes villosa* e *Psilocybe castanella*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 172 p.
- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R.** 2005a. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* 36: 246-252.
- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R.** 2005b. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 297-301.
- Marsolek, M.D., Jo Kirisits, M., Rittmann, B.E.** 2007. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenol by aerobic microbial communities: biorecalcitrance, inhibition, and adaptation. *Biodegradation* 18: 351–358.
- Martin, J.P.** 1950. Use of rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science* 69: 215-232.
- Matheus, D. R. & Okino, L. K.** 1998. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: Bononi, V. L. R. e Grandi, R. A. P. (eds.). 1998. Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente. 184p.
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R., Machado, K. M. G.** 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16 (5): 415-421.

- Matheus, D. R. & Bononi, V. L. R.** 2002. C/N Ratio and vegetable oil to mineralize 14C hexachlorobenzene by white-rot fungi. *In: Gavaskar, A. R., Chen, A. S. C. (eds.). Remediation of chlorinated and recalcitrant compounds. Monterey, CA, Paper 2B-10.*
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G.** 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16 (5): 415-421.
- Matheus, D. R.** 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.
- Matheus, D.R., Bononi, V.L.R., Machado, K.M.G., Silva, R.R., Rodrigues, T.A.** 2003. Basidiomycetes growth in bioreactors to applied in HCB soil biorremediation. Proceedings do simpósio The Seventh International Symposium In Situ and On-Site Biorremediation, Battelle Press, Orlando, Paper G5.
- Mohammadia, A. & Nasernejad,B.** 2009. Enzymatic degradation of anthracene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse. *Journal of Hazardous Materials* 161: 534-537.
- Moreira-Neto, S. L.** 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.
- Moreira-Neto S.L., Matheus, D.R, Machado, K.M.G.** 2009. Influence of pH on the growth and production of the ligninolytic system of tropical basidiomycetes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, “in press”.
- Nakagawa, L.E., & Andréa, M.M.** 2006. Efeito de alterações nas características do solo sobre a degradação de hexaclorobenzeno. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 30: 575-582.

- Okeke, B.C., Smith, J.E., Paterson, A., Watson-Craik, I.A.** 1996. Influence of environmental parameters on pentachlorophenol biotransformation in soil by *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiol Biotechnology* 45: 263-266.
- Okeke, B.C., Paterson, A., Smith, J.E., Watson-Craik, I.A.** 1997. Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of *Lentinula edodes*. *Applied Microbiol Biotechnology* 48: 563-569.
- Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V. & Vasilchenko, L.G.** 2004. Fungal Decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 40 (1): 1-17.
- Robles-Hernández, L., Franco, A.C.G., Donald L. Crawford, D.L., Chun, W.W.C.** 2008. Review of environmental organopollutants degradation by white-rot basidiomycete mushrooms - Revisión de degradación de contaminantes ambientales por basidiomicetos de la pudrición Blanca. *TecnoCiência Chihuahua* 2 (1): 32-40.
- Rodrigues, N.L.V.B.** 2005. Testes de toxicidade aguda através de bioensaios no extrato solubilizado dos resíduos classe II A – não inertes e classe II B – inertes. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 122p.
- Salvi, M.B.** 2008. Degradação química e biológica de ¹⁴C-Hexaclorobenzeno por polietilenoglicol/hidróxido de sódio e *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 150p.
- Sander, P., Wittich, R.M., Fortnagel, P., Wilkes, H., Francke, W.** 1991. Degradation of 1,2,4-Trichloro- and 1,2,4,5-Tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 5 1430-1440.

- Sawyer, N.A., Chambers, S.M., Cairney, J.W.G.** 2003. Utilisation of inorganic and organic phosphorus sources by isolates of *Amanita muscaria* and *Amanita* species native to temperate eastern Australia. *Australian Journal of Botany* 51: 151-158.
- Schumacher, B.A.** 2002. Methods for the determination of Total Organic Carbon (TOC) in soils and sediments. EPA NCEA-C-1282, EMASC-001. 23p.
- Shih, Y., Chen, Y., Chen, M., Tai, Y., Tso, C.** 2009. Dechlorination of hexachlorobenzene by using nanoscale Fe and nanoscale Pd/Fe bimetallic particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 322: 84-89.
- Silva, R. R.** 2004. Ergosterol para a determinação de biomassa de fungos *Lentinus crinitus* Berk e *Psilocybe castanella* Peck em biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 108p.
- Srinivasan, U. & Glaser, J.A.** 1999. The validity of ergosterol-based fungal biomass estimate in biorremediation, *In: Alleman, B.C., Leeson, A., Bioreactor and Ex Situ biological Treatment Technologies*. San Diego, California: Battelle Press, p.103-109.
- Vitali, V. M. V.** 2004. Biodegradação de hexaclorobenzeno por *Eupenicillium* spp. E *Psilocybe castanella* em solos contaminados com organoclorados. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 118p.
- Vitali, V. M. V., Machado, K. M. G., Andrea, M. M., Bononi, V. L. R.** 2006. Screening mitosporic fungi for organochlorides degradation. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 256-261.
- Walter, M., Boyd-Wilson, K. B., Boul, L., Ford, C., McFadden, D., Chong, B. & Pinfeld, J.** 2005. Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 56: 51-57.

Wells, J.M., Boddy, L., Donnelly, D.P. 1998. Wood decay and phosphorus translocation by the cord-forming basidiomycete *Phanerochaete velutina*: the significance of local nutrient supply. *New Phytologist* 138: 607-617.

4. Capítulo II

Biorremediação de solo contaminado com organoclorados por associação de oxidação química e biodegradação por *Trametes villosa* em reatores

Ricardo Ribeiro da Silva¹, Dácio Roberto Matheus^{2,3}

¹Pós-graduando em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo;

²Pesquisador visitante da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica de São Paulo;

³ Professor Adjunto da Universidade Federal do ABC

Corresponding author. Mailing address: Instituto de Botânica de São Paulo, Seção de Micologia e Liquenologia, Av.

Miguel Estéfano, 3687, São Paulo, CEP: 04301-012, Brazil. Tel.: (+5511) 50736300 (R 311). E-mail:

ricardo.r.s@bol.com.br

Resumo

Fungos basidiomicetos são capazes de degradar poluentes orgânicos persistentes em solo e efluentes industriais, e sua aplicação para biorremediação de solos contaminados por mistura de organoclorados vem sendo estudada no Estado de São Paulo, Brasil. Tratamentos químicos podem ser usados para promover a desalogenação de organoclorados podendo facilitar o tratamento biológico subsequente. No presente trabalho foi avaliada eficiência da desalogenação de HCB por oxidação química e posterior tratamento com *Trametes villosa* em biorreatores com 200 kg de solo, em duplicata. A desalogenação química foi feita por mistura de NaOH (10%), PEG-400 (4%) e etanol (3,5%) ao solo contaminado, durante 30 dias e neutralização do pH do solo com H₂SO₄. Porções de 200 kg de solo tratado diluído em solo não contaminado (1:1) foram depositadas nos biorreatores e esterilizadas com brometo de metila (72 h). Porções de 40 kg (base seca) de inóculo de *T.villosa*, crescido por 21 dias, a 28°C em bagaço de cana suplementado com farinha de soja (C:N 90), foram inoculadas no solo. Como controle foi utilizado mesmo substrato sem crescimento fúngico. Aos 0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias após a inoculação, foram determinadas as concentração de hexaclorobenzeno, pentaclorobenzeno, tetraclorobenzenos, pentaclorofenol, hexaclorobutadieno, pentacloroanizol e hexacloroetano, além de íons cloretos. Também determinou-se a quantidade de ergosterol, efetuou-se o re-isolamento dos basidiomicetos, determinaram-se as atividades de lacase e fenoloxidase e ainda a umidade e o pH do solo. A toxicidade aguda do lixiviado do solo foi determinada aos 0, 56 e 224 dias de incubação pelo método de *Daphnia similis*, enquanto as quantificações de microrganismos e de COT, N e P foram feitas aos 0 e 224 dias. A temperatura do solo foi medida diariamente. O tratamento químico no solo promoveu redução de cerca de 90% da concentração de HCB e PeCB, resultando principalmente na formação de tetraclorodietoxibenzeno (TCDTB) e triclorodietoxibenzeno (TriCEB). *T.villosa* apresentou desenvolvimento estável no solo até 84 dias de incubação. O pico de atividade das enzimas ligninolíticas ocorreu aos 28 dias de

incubação. Após os 224 dias de incubação de *T. villosa* não foram observadas diminuições significativas na concentração de HCB e PeCB restantes no solo. Houve a formação de isômeros TCB aos 14 e 56 dias que foram completamente removidos do solo aos 224 dias. A partir dos 56 dias foi observado aumento da concentração de TCDTB e TriCEB, no entanto, a concentração de TCDTB aos 224 dias foi reduzida aos níveis detectados no início da incubação. Observou-se total remoção de HCBU e PCA aos 224 dias. Embora o tratamento químico tenha diminuído a concentração de HCB no solo, outros compostos com maior toxicidade foram gerados, e não foram removidos pelo basidiomiceto.

Palavras chaves: hexaclorobenzeno, "scale-up", desalogenação, basidiomicetos, Fungos de podridão branca, biorreator.

Apoio Financeiro: FUNDEPAG/Rhodia do Brasil/CAPES

Abstract

Basidiomycetous fungi are able to degrade persistent organic pollutants in soil and industrial effluents. The application of basidiomycetes for bioremediation of soils contaminated by a mixture of organochlorates is under study in the state of São Paulo, Brazil. Chemical treatments can be used to promote the desallogenation of these compounds, hence make the subsequent biological treatment easier. In this study were evaluated the efficiency of desallogenation of HCB and the posterior treatment with *Trametes villosa* in bioreactors with 200 kg of soil, in duplicate. The chemical desallogenation was done by mixing the soil with NaOH (10%), PEG-400 (4%) and ethanol (3,5%) during 30 days and by neutralising the soil pH with H₂SO₄. 200 kg portions of treated soil diluted in non-contaminated soil (1:1) were placed in bioreactors and sterilised with methyl-bromete (72 h). 40 kg portions (dry base) of *T. villosa* inoculum, grown at 28°C during 21 days on sugar-cane bagasse supplemented with soybean flour (C:N 90), were inoculated in the soil. The same substrate without fungal growth

was used as control. At 0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 and 224 days the concentration of hexachlorobenzene, pentachlorobenzene, tetrachlorobenzenes, pentachlorophenol, hexachlorobutadieno, pentachloroanisole and hexachloroethane was determined, as well as chlorate ions, the quantity of ergosterol, the re-isolating of the basidiomycetes, the activities of laccase and phenoloxidase and also the soil humidity and pH. The acute toxicity of the soil lixivium was determined at 0, 56 and 224 days of incubation, whilst the quantification of micro-organisms and of COT, N and P were done at 0 and 224 days. The soil temperature was measured daily. The chemical treatment of the soil caused a reduction of circa 90% of the concentration of HCB and PeCB, resulting chiefly in the formation of tetrachlorodietoxibenzene (TCDTB) and trichlorodietoxibenzene (TriCEB). *Trametes villosa* presented a stable development in the soil until 84 days of incubation. The peak of ligninolytic enzyme activity occurred at 28 days of incubation. After 224 days of *T. villosa* incubation no significant decreases of the concentration of HCB and PeCB remaining in the soil could be observed. The formation of TCB isomers occurred at 14 and 56 days; these substances were completely removed from the soil at 224 days. An increase of the concentration of TCDTB and TriCEB was observed from 56 days, yet the concentration of TCDTB at 224 days was reduced to levels detected at the start of the incubation. A total removal of HCBU and PCA was observed at 224 days. The incorporation process of the inoculum to the soil seems to be responsible for the inoculum's decrease in viability. Although the chemical treatment reduced the concentration of HCB in the soil, other compounds with a larger toxicity were generated and not totally removed by the basidiomycete.

Key words: hexachlorobenzene, scale-up, dechlorination, basidiomycetes, WRF, bioreactor.

Financial support: FUNDEPAG/Rhodia do Brasil/CAPES

Introdução

A geração e incorreta disposição de vários resíduos químicos recalcitrantes nos ambientes aquáticos, terrestres e na atmosfera, infelizmente, foram proporcionais ao desenvolvimento dos processos industriais (Dagley 1978, Barber *et al.* 2005). A partir da década de 50 as atividades industriais se intensificaram no Brasil com o estabelecimento dos principais pólos industriais, como o localizado no município de Cubatão, São Paulo, Brasil (Targa & Klockow 1997). Entre a década de 70 e 80 grandes quantidades de resíduos industriais foram depositados de forma incorreta em várias regiões da Baixada Santista, São Paulo, gerando grandes quantidades de solo contaminado por mistura de organoclorados, dentre os quais os principais são: hexacloroetano, hexaclorobutadieno, pentaclorobenzeno, pentaclorofenol, tetraclorobenzenos e, destacando-se entre esses, hexaclorobenzeno (HCB). Estudos foram realizados pela CETESB e demonstraram que a melhor alternativa foi de remover o solo e acondicioná-lo em uma estação com condições que evitassem o agravamento da disseminação dos poluentes pelo ambiente, o que foi determinado pela Justiça Brasileira à empresa responsável pela contaminação (Matheus 1998, Nascimento *et al.* 2004).

O hexaclorobenzeno é um composto formado por um anel benzênico com seis átomos de cloro ligados a ele, conferindo grande estabilidade química à molécula. Suas principais aplicações foram como desengraxante na indústria metalúrgica, fungicidas de produtos agrícolas e preservante de madeira e de fogos de artifício, na fabricação do alumínio e produção de estireno em borrachas para pneus (Toledo 2002, Vitali 2004, Barber *et al.* 2005).

Fungos de podridão branca parecem ser os únicos microrganismos dotados de sistema enzimático capaz de degradar e mineralizar a lignina de tecido vegetal (Rabinovich *et al.* 2004), e devido à inespecificidade do seu sistema enzimático, esses fungos vêm sendo estudados para biodegradação de poluentes orgânicos persistentes (Pointing 2001, Hofrichter 2002, Asgher *et al.* 2008). A partir da década de 90 muitas espécies de basidiomicetos foram estudadas evidenciando a capacidade de degradação de inúmeras moléculas orgânicas xenobióticas, na grande maioria altamente tóxica e recalcitrante à biodegradação nos

ambientes onde elas eram descartadas. Dentre as espécies estudadas encontramos: *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Inonotus dryophilus*, *Lentinula edodes*, *Phanerochaete sórdida*, *Phellinus badius*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus pinsitus*, *Stereum hirsutum*, *Trametes hirsuta*, *T. versicolor*, *T. villosa*, *Peniophora cinerea*, *Psilocybe castanella*, *Lentinus crinitus*, capazes de degradar antraceno, pentaclorofenol, 3,4-dicloro anilina, dieldrin, fenantreno, creosoto, dibenzo-a-dioxina, dibenzofuranos policlorados, pireno, fluoreno, hexaclorobenzeno (Matheus & Okino 1998, Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005b), além de muitas outras espécies capazes de degradar inúmeros compostos xenobióticos.

Cinco linhagens de basidiomicetos, que estão depositados na Coleção de Cultura de Basidiomicetos do Instituto de Botânica-SP, mostraram tolerância a altas concentrações de pentaclorofenol e hexaclorobenzeno (Matheus *et al.* 2000 e Machado *et al.* 2005b). As espécies *Peniophora cinerea*, *Psilocybe castanella*, duas linhagens de *Trametes villosa* (CCB 176 e 213) e *Agrocybe perfecta* foram capazes de reduzir pentaclorofenol presente no solo em até 78%, 64%, 58%, 36% e 43%, respectivamente, após 90 dias de incubação. Todos os fungos mineralizaram [¹⁴C] pentaclorofenol, principalmente *P. cinérea* e *T. villosa* (CCB 176) com a produção de 7,11% e 8,15% de ¹⁴CO₂ (Machado *et al.* 2005b). Dentre outras espécies que toleram altas concentrações de hexaclorobenzeno destacaram-se *Psilocybe castanella* e *Lentinus crinitus*, os quais foram capazes de remover cerca de 3150 e 1400 mg de HCB kg⁻¹ de solo, apesar de não serem capazes de mineralizar o composto nas condições estudadas (Matheus *et al.* 2000). No entanto, Matheus & Bononi (2002) observaram que estas duas espécies eram capazes de mineralizar até 15% de HCB na presença de ácidos graxos insaturados adicionados ao solo. *P. castanella* aumentava significativamente a mineralização do HCB quando o inóculo fúngico era produzido em substrato com C/N ajustado para 90, e os autores recomendam a utilização desses fungos para biorremediação em larga escala de solo contaminado por hexaclorobenzeno.

Matheus *et al.* (2003) demonstraram que *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella* tiveram bom desenvolvimento em solo sem contaminação contido em biorreatores com capacidade de tratar 400 kg de solo cada um, recomendando o uso dos biorreatores para avaliação da degradação de solo contaminado por hexaclorobenzeno e outros organoclorados.

A associação de tratamentos físicos e químicos para desalogenação de organoclorados com tratamentos de biorremediação vem sendo estudada recentemente (Ma *et al.* 2005, Kaštánek & Kaštánek 2005, Yuan *et al.* 2006, Kulik *et al.* 2006, Salvi, 2008). Entretanto, muitas vezes os tratamentos químicos podem gerar outros compostos que tornam o solo tão ou mais tóxicos do que antes do tratamento. Por ter tolerado altas concentrações de HCB (Matheus *et al.* 2000) e apresentado excelentes taxas de degradação de pentaclorofenol (Machado *et al.* 2005b), *Trametes villosa* CCB 176 foi avaliado por Salvi (2008) para biodegradar organoclorados originados do tratamento de oxidação química de ^{14}C -HCB em microcosmo de solo. Tal tratamento de oxidação química dos organoclorados do solo promoveu a redução de 85% de ^{14}C -HCB, transformando-o em outros compostos menos clorados, principalmente em tetraclorodietoxibenzenos e triclorodietoxibenzenos. A associação desse tratamento por oxidação com a biodegradação dos organoclorados resultantes por *T. villosa* promoveu redução de 36% e 38% de HCB e pentaclorobenzeno, respectivamente, resultantes do tratamento de oxidação química do solo. Além disso, a autora também observou efeito significativo na utilização de óleo vegetal nas reduções de HCB no solo.

Diante de tais resultados, o presente trabalho avaliou a eficiência de *Trametes villosa* CCB 176 na biorremediação de solo contaminado por organoclorados resultantes do tratamento de oxidação química para desalogenação de compostos organoclorados em processo de ampliação de escala em biorreatores com 400 kg de solo.

Material e métodos

Fungo

Trametes villosa (Sw.) Kreisel está depositada na Coleção de Cultura de Basidiomicetos (CCB 274) do Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil. Conservada em tubos inclinados com batata dextrose ágar e mantida a 5° C. Para utilização nos experimentos essa espécie foi cultivada em extrato malte (2%) agar e incubada a 28° C por sete dias.

Preparo do solo

Foi construído um galpão com sistema de contenção de sólidos e líquidos próximo ao depósito de solo contaminado (Anexo 1), onde foram instalados os biorreatores e realizados todos os procedimentos de manipulação do solo utilizado no presente trabalho.

O solo utilizado aqui foi o mesmo descrito por Matheus *et al.* (2000). Todo procedimento de preparo do solo foi realizado no galpão construído para manejo de solo contaminado aprovado pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – CETESB. Foram selecionados lotes de solo com concentração de hexaclorobenzeno (HCB), principal contaminante, próxima a desejada (25.000 mg kg⁻¹ de solo). Porções de 100 kg de solo foram submetidas a peneiramento mecânico (Anexo 2) para remoção de galhos e pedras. Torrões de solo e de organoclorados foram triturados em moinho de bolas (Anexo 3) e reincorporados à massa de solo para homogeneização (Anexo 4). Estas operações se repetiram até que a concentração de HCB estivesse próxima (erro de 10%) a desejada, o que foi confirmada por análises cromatográficas dos extratos de cinco amostras simples de cada um dos lotes de solo.

Foram preparados quatro lotes de 100 kg de solo, os quais foram acondicionados em “*BigBags*” com capacidade de 1.000 kg de solo. Esses lotes de solo foram submetidos à reação de desalogenação química que consistiu na mistura, com base no peso seco de solo, de 4% de polietilenoglicol (PEG) 400, 3,5% de etanol e 10% de hidróxido de sódio (NaOH) em escamas. Após ser homogeneizado, o solo permaneceu nos “*BigBags*” por 30 dias na ausência de luz, quando o pH do solo foi ajustado até 6,5 com ácido sulfúrico. Em seguida,

cada porção de 100 kg de solo foi misturada com a mesma massa de solo não contaminado. Os lotes de 200 kg dessa mistura de solo diluído foram transferidos para os biorreatores para ajuste da umidade (50% da capacidade máxima de retenção de água) e esterilização com 193 cm³ de gás brometo de metila por 72 horas, antes da incorporação do inóculo de *T. villosa*.

Biorreatores

Os biorreatores foram construídos em concreto impermeabilizado, com 1,20 m de diâmetro e 0,90 m de altura, contendo sistema de coleta de material lixiviado. Eles possuem ainda, sistema de injeção de ar forçada e saída do ar direcionado para colunas de carvão ativado. As tampas foram construídas em fibra de vidro e vedadas por junta de borracha (Figura 1 A e B).

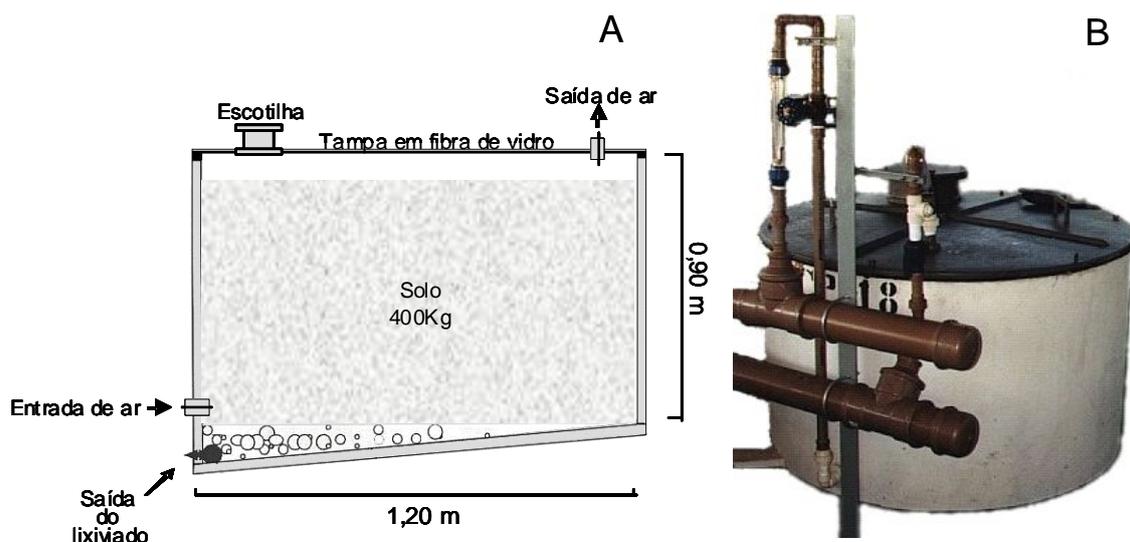


Figura 1: Biorreator para remediação de solo contaminado por organoclorados. A) Esquema do biorreator; B) Foto ilustrativa (Foto: Ricardo R. da Silva)

Foram utilizados dois biorreatores para incubação de *Trametes villosa* e dois como controles sem adição do fungo.

Inóculo fúngico

Porções de 1 kg de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farinha de soja (C:N 90) e umidade ajustada para 70 %, foram acondicionadas em sacos de plásticos e esterilizadas em autoclave (121°C / 90 min.). O micélio ativo de *Trametes villosa* (½ placa de Petri kg⁻¹ de substrato) foi inoculado no substrato e a incubação foi feita a 28 ± 2° C, por 21 dias. Os inóculos foram fragmentados manualmente 24 horas antes da sua inoculação no sistema de cultivo a fim de facilitar sua homogeneização com o solo. A mesma formulação do substrato esterilizado, mas sem crescimento fúngico foi feita nos biorreatores controles.

Condições de cultivo

O sistema de cultivo consistiu de 400 kg de solo nas condições descritas acima, óleo de soja (5% do total de solo), tween 20 (proporção de 1:9 de óleo de soja) e água. O procedimento de mistura do sistema de cultivo e do inóculo (20% da massa de solo - base seca) foi realizado em quatro etapas intercaladas por homogeneização manual (5 min./etapa). Foi instalada sonda térmica na região central do solo antes do fechamento do biorreator, e ajuste inicial do fluxo de ar para 1,5 cm³/h.

Amostragem e análises

Três amostras simples de solo de cada reator foram retiradas com o auxílio de um trado esterilizado imediatamente após a inoculação dos fungos e posteriormente aos 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação. As amostras foram acondicionadas em vidro esterilizado e refrigeradas até o momento das seguintes análises dos solos:

- Crescimento fúngico: foi determinado pela quantificação de ergosterol, extraído a partir de 10g de amostra de solo por saponificação alcoólica e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito por Silva (2004).
- Isolamento dos basidiomicetos: Foram retirados fragmentos de inóculo fúngico do solo, os quais foram inoculados em extrato malte (2%) ágar, contendo o corante Azul

de Remazol Brilhante R. Após cinco dias de incubação a 28° C foi avaliada a capacidade de crescimento e descoloração do corante e confirmação de crescimento dos basidiomicetos pela observação em microscópio ótico da presença de ansas na hifa fúngica, conforme descrito por Machado et al. (2005a).

- Umidade: avaliada por gravimetria das amostras liofilizadas para quantificação de ergosterol.
- pH: pela determinação do pH da suspensão de solo (10g de solo em 90 mL de água deionizada, agitada por 30 min. e repousada por 60 min.) em pHâmetro digital, equipado com eletrodo combinado.
- Atividades de enzimas extracelulares: Determinadas a partir de extratos obtidos pela adição de tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 5,0, a 10g de solo colonizado (1:3, p/v), agitado manualmente (3 min.) e posteriormente a 120 rpm por 60 min, filtrado sob vácuo com papel filtro faixa preta. As atividades de fenoloxidasas e lacases foram determinadas pela oxidação de 0,5 mM de ABTS à 420 nm durante 5 min, em reação tamponada com citrato-fosfato, 50mM, pH 4,0, na presença ou ausência de 100 µM de H₂O₂, respectivamente. 1 U/L correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de ABTS por minuto conforme Bourbonnais *et al.* (1996). Atividade de peroxidase dependente de manganês foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol à 610 nm conforme Kuwahara *et al.* (1984).
- Determinação da concentração de organoclorados no solo: Os compostos clorados foram extraídos em 10g de amostras de solo diluídas em 100 mL de tolueno submetida em Soxhlet por 4 h. Os extratos foram submetidos à análise por cromatografia a gás (Cromatógrafo Varian 3400, equipado com detector FID e injetor split/splitless). Foi usada coluna capilar megabore (LM 5 50m / 0,25mm / 0,5 µm – Fenil 5%, dimetilsiloxano 95%). Foi utilizado nitrogênio como gás de arraste (1,5 mL mn.⁻¹). A temperatura do injetor foi mantida em 220° C e a do detector em 270° C. O volume de

injeção foi de 1 µL e a temperatura da coluna variou entre 100° e 230° C (taxa de 4° C/min.) durante 15 min. O tempo de corrida foi de 46 min. Essas análises foram realizadas pela equipe do Centro de Pesquisa de Paulínia da Rhodia do Brasil.

Imediatamente após a inoculação dos fungos no solo e ao final do período de incubação (224 dias), foram avaliados os parâmetros abaixo relacionados:

- Contagem de unidades formadoras de colônias de fungos e bactérias: foram determinadas pelo método de “pour-plate” a partir da inoculação de 1 mL da suspensão de solo (10g de solo em 90 mL de solução salina a 0,85%) em meio de cultura nutriente agar para isolamento de bactérias (24 e 48 h de incubação) e em meio de Martin (1950) (até 7 dias de incubação) para fungos.
- Toxicidade aguda do lixiviado do solo: foi avaliada pelo método de ensaio com *Daphnia similis* de acordo com a NBR 12713 - ABNT 2004, pelo Laboratório de Análise de Impacto Ambiental, do Centro de Pesquisa de Paulínia – Rhodia do Brasil Ltda. Os resultados foram convertidos em unidade tóxica aguda ($U_{ta} = 100/CE_{50}$), conforme descrito por Rodrigues (2005).
- Concentração de carbono orgânico total (COT), nitrogênio (N) e fósforo (P): Análises realizadas pelo Laboratório T&E analítica. COT foi determinado segundo EPA NCEA-C-1282/2002 - "Methods for the determination of Total Organic Carbon (TOC) in soils and sediments", N de acordo com método clássico de Kjeldahl e P como descrito em Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Procedimento 4500-P B. e leitura do fósforo total por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Induzido (ICP-OES) com calibração com curva de resposta.

Diariamente a temperatura do solo foi monitorada em quatro leituras (0:00, 8:00, 14:00, 20:00 h), acoplado-se um termômetro de solo (mod. SalvTerm 700 - Gulton) à sonda instalada na região central da pilha de solo no biorreator.

Os dados de Tabela 1: Concentração de organoclorados no solo submetido a tratamento de oxidação química para desalogenação (mg kg^{-1}) de todos os parâmetros de monitoramento do desenvolvimento fúngico (exceto o crescimento, isolamento de *Trametes villosa* e da quantificação da microbiota) e das concentrações dos organoclorados, íons cloretos e dos dados de toxicidade foram submetidos à análise de variância ($\alpha=0,10$) utilizando ANOVA do programa gráfico-estatístico Origin 8.0. Quando foi observado efeito significativo os dados foram analisados pelo Teste Tukey com 10% de nível de segurança pelo mesmo programa.

Resultados e discussão

As concentrações de organoclorados após tratamento químico para desalogenação dos organoclorados no solo estão apresentadas na tabela 1. A concentração de hexaclorobenzeno (HCB) no lote selecionado com 400 Kg de solo foi próxima à concentração teórica ($25.000 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo).

Após o tratamento químico do solo foram observadas reduções de 89,36% de hexaclorobenzeno (HCB), 93,43% de pentaclorobenzeno (PeCB), 52,0% de 1,2,4,5 tetraclorobenzeno (TCB-1), 38,75% de 1,2,3,4 tetraclorobenzeno (TCB-2). Com a degradação química desses organoclorados foi observada a formação de tetraclorodietoxibenzeno e isômeros (TCDTB), tricloroetoxibenzeno (TriCEB), pentaclorofenol (PCF), e outros compostos clorados não foram identificados durante as análises cromatográficas, os quais foram chamados de Totais de Picos Não Identificados (TPNI).

Organoclorados	Tratamento químico para desalogenação	
	Antes	Depois
HCB	22080 (± 100)	2349 (± 177)
PeCB	2560 (± 40)	168 (± 16)
TCB-1	225 (± 5)	108 (± 4)
TCB-2	80 (± 0)	49 (± 7)
TCDTB	ND	4710 (± 2804)

TriCEB	ND	89 (± 5)
PCF	ND	800 (± 8)
TPNI	ND	2316 (± 596)
Íons cloreto	240 (± 20)	ND

HCB - Hexaclorobenzeno; TCB-1 - 1,2,4,5 tetraclorobenzeno; TCB-2 - 1,2,3,4 tetraclorobenzeno; PeCB - pentaclorobenzeno; HCBU - hexaclorobutadieno; PCF - pentaclorofenol; PCA - pentacloroanizol; TCDTB - tetraclorodietoxibenzeno e isômeros; TriCEB - triclorotrietoixibenzeno; TPNI - Totais de Picos Não Identificáveis; ND - Não detectados

As taxas de degradação de HCB e PeCB obtidas foram muito próximas às observadas por Salvi (2008) nas mesmas condições de cultivo descritas aqui, isto é, 85% de HCB e de 83% de PeCB. De acordo com Salvi (2008), a degradação de ¹⁴C-HCB pela oxidação química no solo gerou os seguintes compostos: Tetraclorodietoxibenzeno e isômeros, 1,2,4 tricloro-5-etoxibenzeno, 1,2,3,5 tetracloro-4-etoxibenzeno e pentacloroetoxibenzeno, bem como tetraclorohidroquinona, 5,6,7,8 tetracloroquinoxaline, 2,3,5 triclorofenol-6-metoxi,4-hidroxi e 3,4,6 tricloropirocatecol.

Entretanto, as reduções na concentração de TCB-1 e TCB-2 só foram observadas no solo desse estudo. A formação de PeCB e TCB a partir da desalogenação de HCB já é conhecida (Fathepure & vogel 1991, Miyoshi *et al.* 2004, Field & Sierra-Alvarez 2008, Shih *et al.* 2009), no entanto, as reduções dos isômeros de TCB foram proporcionalmente menores àquelas obtidas com HCB e PeCB no solo. A formação significativa de tetraclorodietoxibenzeno e tricloroetoxibenzeno no solo dos biorreatores após tratamento químico foi originado pelas reações dos produtos de degradação de HCB, PeCB e TCB com

os radicais etoxi (C_2H_5O), originados pelo etanol adicionado na reação de desalogenação, com o objetivo de diminuir gastos em uma escala maior de tratamento (De Nadai, *dados não publicados*).

Rahuman *et al.* (2000) observaram que a utilização de PEG em tratamentos para desalogenação de organoclorados foi uma ótima alternativa, uma vez que obtiveram quase 100 % da remoção de bifenilas policloradas, dibenzo-dioxinas policloradas e dibenzo-furanos policlorados. A desalogenação química de bifenilas policloradas pela utilização da combinação de polietilenoglicol, potássio e alumínio em escala piloto também foi bem sucedida segundo Kaštánek & Kaštánek (2005), que o apontam como uma ótima alternativa para descontaminação do solo, já que ela reduziu a toxicidade do solo e originou pouca quantidade de cloreto de sódio.

A quase total remoção de HCB por oxidação química foi observada por Miyoshi *et al.* (2004), que utilizaram uma mistura de sódio e potássio em uma solução de ciclohexano e benzeno. Segundo Ma *et al.* (2005) a combinação de óxido de cálcio e óxido de ferro promoveu a redução de 98 % da concentração de HCB em solução. Mas, recentemente a degradação de cerca de 70 % da concentração de HCB foi avaliada por Shih *et al.* (2009) em nano-escala utilizando partículas bi-metálicas de Pd/Fe.

No entanto, nesses trabalhos não são demonstradas a eficiência dessas técnicas em larga escala, salvo a que foi descrita por Kaštánek & Kaštánek (2005), embora nem eles tenham demonstrado que as aplicações da oxidação química de organoclorados sejam financeiramente viáveis para descontaminação de solo em escala industrial.

Outro fator importante a ser considerado é que a formação dos subprodutos a partir da oxidação química de organoclorados pode aumentar a toxicidade do solo, como foi observada por Salvi (2008), o que pode dificultar o desenvolvimento de microrganismos quando se tem por objetivo associar a técnica de desalogenação química ao tratamento de biodegradação de organoclorados resultantes.

Após o período em que o solo ficou contido para reações de desalogenação foi realizada a neutralização do solo até aproximadamente 6,5, para favorecer o crescimento do basidiomiceto.

A quantidade de inóculo foi de 20% em relação à quantidade de solo diluído com solo branco 1:1, pois segundo Silva & Matheus (*dados não publicados*) essa foi a melhor condição para crescimento de *Trametes villosa* em solo submetido ao tratamento e desalogenação química.

As quantidades de ergosterol nos biorreatores com *Trametes villosa* indicam que esse fungo apresentou crescimento até 28 dias no biorreator 1 e 56 dias no biorreator 2. As quantidades de ergosterol no solo dos biorreatores controles foram superiores aos biorreatores com essa espécie até 56 dias de incubação, indicando crescimento dos fungos autóctones. Aos 84 dias se observou intensa diminuição na quantidade de ergosterol nos quatro biorreatores, não diferindo das quantidades de ergosterol determinadas inicialmente nos biorreatores com *T. villosa*. A partir dos 112 dias se observou discreto aumento na quantidade de ergosterol nos biorreatores com o basidiomiceto, e não se detectaram variações significativas aos 224 dias de incubação (Figura 2).

Observando-se o perfil de crescimento fúngico nos biorreatores, é possível inferir que *T. villosa* tenha apresentado baixo desenvolvimento no solo, uma vez que mesmo no período em que se observou maior crescimento do fungo as quantidades de ergosterol no solo foram inferiores às encontradas nos biorreatores controles. No entanto, nem todas as espécies fúngicas apresentam boa correlação entre biomassa e ergosterol (Barajas-aceves *et al.* 2002), devido ao metabolismo deste esterol que ocorre diferentemente entre os fungos (Behalová *et al.* 1994, Barajas-Aceves *et al.* 2002, Silva 2004). Não foi avaliada a correlação entre ergosterol e biomassa fúngica e nem as influências das condições de cultivo na taxa de ergosterol da linhagem de *T. villosa* estudada aqui, e assim não se pode descartar a possibilidade de ter havido substimação do crescimento de *T. villosa* no solo dos biorreatores.

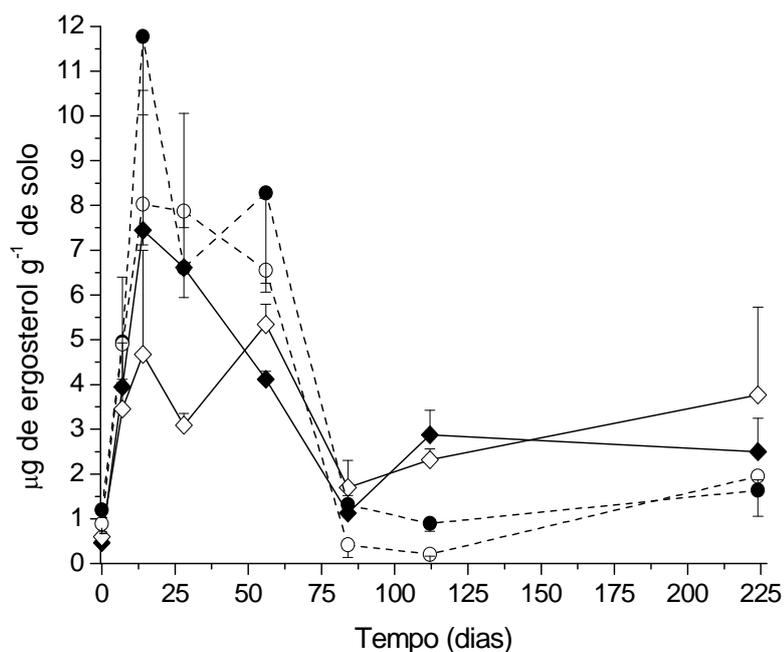


Figura 2: Crescimento fúngico no solo. *Trametes villosa* (◆/◇) e controles (●/○). Símbolos fechados biorreatores 1 e abertos biorreator 2

Foi possível isolar *T. villosa* no solo dos biorreatores até 84 dias no biorreator 1 e 56 dias no biorreator 2, períodos em que esse fungo ainda apresentou atividade metabólica medida pela descoloração de RBBR em meio de cultura (Tabela 2). Nas amostras de solo dos biorreatores controle não foi isolada nenhuma colônia fúngica de basidiomiceto capaz de degradar o corante RBBR.

Tabela 2: Isolamento de *Trametes villosa* no solo dos biorreatores

Biorreatores	Tempo de incubação (dias)							
	0	7	14	28	56	84	112	224
<i>Trametes villosa</i> 1	-++	+++	+++	-++	--+	-++	---	---
<i>Trametes villosa</i> 2	+++	-++	+++	-++	-++	---	---	---
Controle 1	---	---	---	---	---	---	---	---
Controle 2	---	---	---	---	---	---	---	---

+ indica crescimento de *T.villosa* pela descoloração de RBBR, confirmado por observação microscópica, nas três amostras de cada tempo.

- ausência de descoloração

Na tabela 3 estão apresentados os número de unidades formadoras de colônias bacterianas e fúngicas isoladas aos 224 dias nos quatro biorreatores estudados, uma vez que após a esterilização do solo nenhuma colônia fúngica e bacteriana foi isolada no solo dos biorreatores, evidenciando assim a eficiente esterilização do solo. As quantidades de fungos e bactérias nos biorreatores com *T. villosa* foram superiores às encontradas nos controles, provavelmente porque a toxicidade inicial do solo nesses biorreatores foi muito menor, como será discutido adiante.

Tabela 3: Contagem de UFCs* bacterianas e fúngicas no solo aos 224 dias

Biorreatores	Bactérias (UFC mL ⁻¹)x10 ⁷	Fungos (UFC mL ⁻¹)x10 ⁷
<i>Trametes villosa</i> 1	2,90 (± 1,93)	3,31 (± 0,64)
<i>Trametes villosa</i> 2	2,55 (± 0,76)	1,42 (± 0,40)
Controle 1	1,01 (± 0,42)	0,48 (± 0,25)
Controle 2	0,73 (± 0,22)	0,67 (± 0,31)

* (UFC mL⁻¹) – Unidades formadoras de colônias por mL de extrato de solo (solução NaCl - 0,85%)

A umidade inicial do solo dos biorreatores com *T. villosa* foi $24,07 \pm 3,49$ % e $27,39 \pm 1,73$ %, respectivamente. No biorreator 1 com *T. villosa* a umidade do solo aumentou até 28 dias ($32,17 \pm 6,32$ %) e no segundo biorreator até 14 dias ($30,95 \pm 3,94$ %). Aos 56 dias foi observada diminuição da umidade do solo nos dois biorreatores, evidenciando a necessidade de correção da umidade aos 84 dias para a umidade inicial. A seguir, não se detectou variação até os 224 dias de incubação ($32,96 \pm 9,93$ % e $33,99 \pm 8,38$ %, respectivamente). A umidade do solo nos biorreatores controles resultou em valores semelhantes aos dos biorreatores com *T. villosa* até 84 dias de incubação, não tendo sido observado aumento de umidade nesses dois biorreatores a partir desse período (Figura 3).

A degradação microbiana do material orgânico no solo promove a formação de dióxido de carbono e água (Kiehl 1985, Dupont *et al.* 1998, Alexander 1999), portanto o

aumento da umidade do solo nos biorreatores é parâmetro que indicou a atividade de *Trametes villosa* no solo até 28 dias de incubação. Esses dados concordam com o crescimento de *T. villosa* estimado por ergosterol, que se deu de maneira geral até 56 dias, período em que possivelmente o desenvolvimento desse fungo no solo tenha diminuído, uma vez que aos 84 dias esse fungo foi isolado somente no solo do biorreator 2, não sendo mais isolado aos 112 dias de incubação nos dois biorreatores. Embora não tenha sido significativo, a diminuição da umidade do solo aos 224 dias corrobora a hipótese de que *T. villosa* não esteve mais viável no solo, o que deve ter ocorrido desde os 112 dias de incubação.

Considerando que o pH inicial do solo nos biorreatores era de 7,4 (pH inicial do controle) observa-se redução para pH 5,0 logo após a inoculação de *T. villosa*. Após sete dias de incubação observou-se discreto aumento do pH do solo, mantendo-se estável até 28 dias, a partir de quando sofreu pequena diminuição não variando mais significativamente até 224 dias de incubação. No solo dos biorreatores controles o pH diminuiu desde o início do período experimental até 224 dias de incubação (4,8 e 4,9, respectivamente), período em que o pH do solo nesses biorreatores se mantiveram superiores ao pH do solo dos biorreatores com *T. villosa*. (Figura 3).

Já é bem documentada a diminuição do pH do meio ou substrato de cultivo com o crescimento de muitas espécies de basidiomicetos (Okeke *et al.* 1996, Itoh *et al.* 2000, Tekere *et al.* 2001, Galhaup *et al.* 2002, Robles-Hernández *et al.* 2008, Moreira Neto *et al.* 2009 *in press*). Yamanaka *et al.* (2008) observaram que o pH do meio de cultivo de *Trametes villosa*, mesma linhagem aqui estudada, atingiu 3,5 quando essa espécie se encontrava na fase de crescimento logarítmico, aumentando posteriormente até atingir 7,0 quando entrou na fase estacionária de crescimento.

O pH inicial no solo dos biorreatores com *T. villosa* (pH = 5,0) foi consideravelmente menor em relação ao pH do solo dos controles, o que muito provavelmente está relacionado com a liberação de ácidos orgânicos pelo basidiomiceto durante o período de incubação dos

inóculos. Geralmente, o pH ótimo do meio de cultivo utilizado para crescimento de basidiomicetos é 4,5 (Kirk *et al.* 1978, Galhaup *et al.* 2002), no entanto, o pH inicial do solo dos biorreatores com *T. villosa* foi de 5,0, mostrando um poder de tamponamento do fungo quando aplicado em solos alcalinos (pH 7,4).

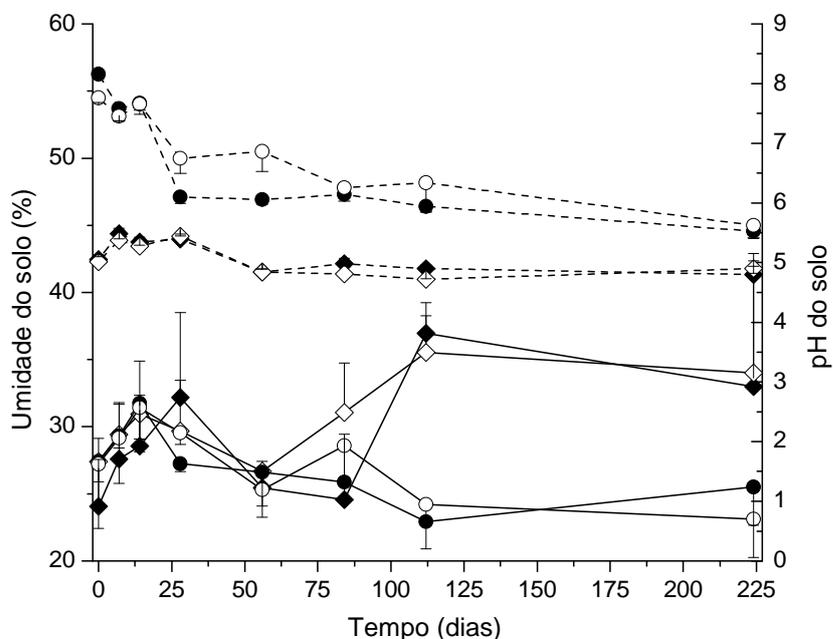


Figura 3: Umidade (linhas sólidas) e pH (linhas segmentadas) do solo nos biorreatores com *Trametes villosa* (◆/◇) e controles (●/○)

A temperatura do solo nos biorreatores com *T. villosa* foi maior nos primeiros dias de incubação e entre os 45 e 60 dias de incubação, concordando com os dados de crescimento estimado por ergosterol. A partir dos 60 dias de incubação a temperatura do solo não mais se diferenciou da temperatura do solo dos controles, tendo sido o fluxo do ar aumentado para $6 \text{ cm}^3 \text{ h}^{-1}$ (Figura 4). A temperatura ótima de crescimento de *Trametes villosa* é $25,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (dados não publicados). O fluxo de ar nos biorreatores foi ajustado para adequar a temperatura do solo próxima à temperatura ótima para crescimento de *T. villosa*, além de promover a aeração do solo, fundamental para o desenvolvimento microbiano aeróbio e reações de oxidação dos poluentes (Dupont *et al.* 1998). Devido ao grande volume de ar necessário para a oxigenação da massa de solo nos biorreatores, não foi possível filtrar o solo injetado nos biorreatores, o

que tornaria consideravelmente mais caro o tratamento. Por essa razão, o sistema de tratamento do solo nos biorreatores não ocorreu em condições assépticas durante o período experimental, o que é comum em tratamentos de biorremediação em larga escala (Alexander 1999, Lamar & White 2001).

A formação de caminhos preferenciais do fluxo de ar injetado em sistemas fechados de biorremediação de solo pode ocorrer na massa de solo seja em biorreatores ou em biopilhas, originando assim regiões com baixa oxigenação no solo (Heerenklage *et al.* 1998, Alexander 1999). Heerenklage *et al.* (1998) demonstraram que a formação de caminhos preferenciais do fluxo de ar no solo pode ser evitada aumentando a pressão interna nos sistemas fechados de biorremediação de solo. No entanto, a forma de vedação da tampa do biorreator não permitiu aumentar a pressão interna dos biorreatores, o que poderia provocar vazamentos de ar e conseqüentemente a liberação de compostos clorados voláteis para o ambiente externo. As colunas de solo retiradas nas amostras podem ter contribuído para a formação de caminhos preferenciais no solo, porque, embora os furos de amostragem fossem tampados com solo, a densidade de solo nessas regiões pode ter sido alterada.

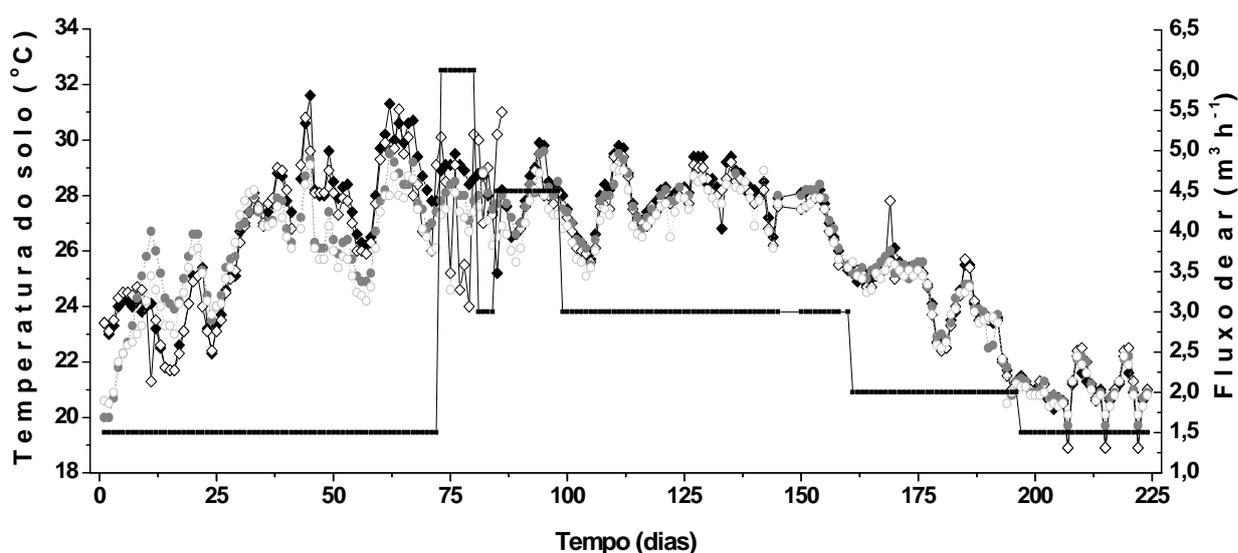


Figura 4: Monitoramento diário da temperatura do solo dos biorreatores com *Trametes villosa* (◆ / ◇) e controles (● / ○). Biorreator 1 (símbolos fechados) e biorreator 2 (símbolos abertos). Controle do fluxo de ar (-----)

Após 224 dias de incubação foi observada diminuição de cerca de 70% de carbono orgânico total (COT) e aumento em cerca de 4 vezes a concentração de fósforo total (P) no solo dos quatro biorreatores. No entanto, não foram observadas variações significativas ($P>0,05$) entre a concentração de N determinada inicialmente daquela aos 224 dias de incubação (Tabela 4).

No entanto, só se avaliaram as modificações cumulativas desses compostos entre o período inicial e aos 224 dias de incubação, não se podendo determinar a cinética de degradação de COT, N e P no solo dos biorreatores durante outros períodos amostrais.

Tabela 3: Concentração dos macronutrientes no solo

Nutrientes	Tempo	Biorreatores			
		<i>T. villosa</i> 1	<i>T. villosa</i> 2	Controle 1	Controle 2
COT (mg Kg ⁻¹)	Inicial	1184 A	1060 A	1184 A	1060 A
	224 dias	336 B	236 B	303 B	434 B
N (mg Kg ⁻¹)	Inicial	467 A	233 A	633 A	233 A
	224 dias	461 A	368 A	412 A	275 A
P (mg Kg ⁻¹)	Inicial	1930 A	1847 A	2823 A	264 A
	224 dias	7977 B	6510 B	7417 B	6857 B
C:N	Inicial	319	467	194	470
	224 dias	78	69	77	170

COT - carbono orgânico total; *N* - nitrogênio; *P* - fósforo; *C:N* – relação carbono:nitrogênio

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, em cada categoria, não diferiram estatisticamente entre si de acordo com Teste Tukey (0,05%).

O consumo de nutrientes no solo está diretamente ligado ao metabolismo de microrganismos (Kiehl 1985). De acordo com os outros parâmetros de monitoramento *T. villosa* não mostrou bom desenvolvimento no solo contaminado por organoclorados e submetido a tratamento químico de desalogenação. O consumo de nutrientes nos biorreatores com *T. villosa* não foi significativamente diferente dos biorreatores controles, evidenciando

que o consumo de COT foi promovido principalmente por outros fungos e bactérias que cresceram no solo dos biorreatores. O aumento da concentração de P no solo se deve à ação de fungos, os quais são os principais microrganismos responsáveis pela ciclagem desse macronutriente, disponibilizando-o às plantas (Wells *et al.* 1990, Wells *et al.* 1998, Cerezine *et al.* 1988, Caesar-TonThat & Cochran 2001, Sawyer *et al.* 2003).

Os picos de atividade de fenoloxidasas (FEN), lacases (LAC) e peroxidases dependentes de manganês (MnP), no solo dos biorreatores com *Trametes villosa* ocorreram aos 28 dias de incubação, quando foram detectadas $108,80 \pm 86,70$ U de FEN kg^{-1} de solo e $45,14 \pm 0,69$ U de LAC kg^{-1} de solo do biorreator 1. No solo do segundo biorreator, foram detectados $43,05 \pm 13,89$ U de FEN kg^{-1} e $12,50 \pm 0,0$ U de LAC kg^{-1} de solo (Figura 5 A). Aos 56 dias houve diminuição na atividade dessas enzimas, não sendo mais detectadas a partir dos 84 dias no solo do biorreator 2 e de 112 dias no solo do biorreator 1. A atividade de MnP aos 28 dias de incubação foi de $7,55 \pm 3,90$ e $3,46 \pm 0,00$ U kg^{-1} de solo, respectivamente aos biorreator 1 e 2 com *T. villosa*. Aos 56 dias a atividade de MnP diminuiu, não sendo mais detectada a partir dos 84 dias no solo dos dois biorreatores com o fungo estudado (Figura 5 B). Nenhuma atividade dessas enzimas foi encontrada no solo dos biorreatores controles.

As condições nutricionais do meio de cultivo influenciam grandemente a produção e atividade das enzimas ligninolíticas (Hofrichter 2002).

No entanto, as atividades de lacases no solo dos biorreatores foram muito inferiores às obtidas por outras espécies de *Trametes* em outros estudos em condições nutricionais muito distintas (Itho *et al.* 2000, Galhaup *et al.* 2002, Machado *et al.* 2005a, Pazarlioglu *et al.* 2005, McErlean *et al.* 2006).

Conforme observado por Machado *et al.* (2005b), *Trametes villosa* CCB 176 apresentou maior atividade ligninolítica quando foi cultivada em solo contendo 1800 mg de pentaclorofenol kg^{-1} de solo em comparação com o solo sem organoclorado. Por outro lado,

essa espécie pode ser suscetível à ação tóxica de outros compostos, principalmente os que foram gerados com o tratamento químico de desalogenação em que o solo foi submetido antes do tratamento biológico.

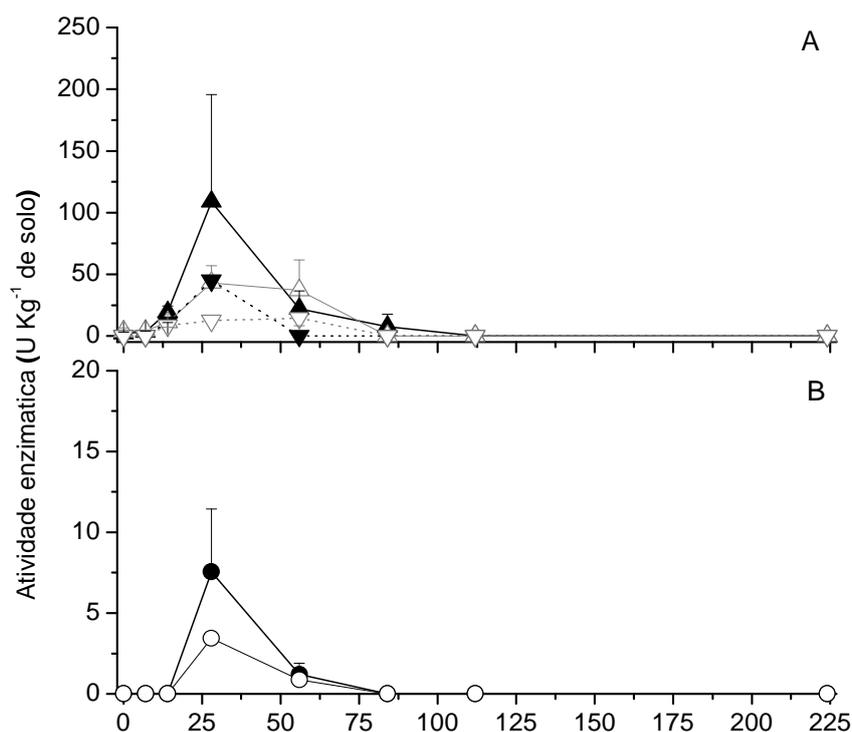


Figura 5: Atividade enzimática no solo. A) Fenoloxidasas (▲/△) e lacases (▼/▽); B) peroxidases dependentes de manganês (●/○). Símbolos fechados biorreator 1 e abertos biorreator 2, com *Trametes villosa*

A concentração de HCB no solo do primeiro biorreator com esse fungo aos 84 dias de incubação ($560 \pm 33,3$ mg de HCB kg^{-1} de solo) foi significativamente menor ($P = 0,00006$) em relação à concentração inicial ($1046,6 \pm 137,7$ mg kg^{-1} de solo). Mesmo efeito foi observado no solo do segundo biorreator aos 56 dias ($713,3 \pm 102,2$ mg kg^{-1} de solo) que foi significativamente menor ($P = 0,007$) da determinada inicialmente ($1010,0 \pm 93,3$ mg kg^{-1} de solo) assim como também foi menor em relação às determinadas aos 7, 14, 112 e 224 dias de

incubação ($P < 0,05$). Por outro lado, as concentrações de HCB aos 224 dias de incubação no solo do biorreator 1 ($1283,3 \pm 11,1 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo) e do biorreator 2 ($1196,0 \pm 11,11 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo) não diferiram significativamente ($P = 0,055$ e $0,165$, respectivamente) da concentração inicial de HCB desses biorreatores. No solo do biorreator do primeiro controle a concentração de HCB aos 56 dias ($810,0 \pm 26,6 \text{ mg Kg}^{-1}$ de solo) foi significativamente menor ($P = 0,029$) da observada inicialmente ($1096,6 \pm 31,1 \text{ mg de HCB Kg}^{-1}$ de solo), no entanto, a concentração desse composto aos 224 dias ($1400,0 \pm 126,6 \text{ mg Kg}^{-1}$) não diferiu significativamente ($P = 0,289$) da encontrada inicialmente. No solo do segundo controle não foram observadas variações significativas durante todo o período experimental (Anexo 6).

Embora não tenha ocorrido redução da concentração de HCB no solo submetido a tratamento químico de desalogenação após 224 dias de incubação de *T. villosa*, foi possível, entretanto, observar efeito biótico possivelmente significativo na variação das concentrações desse composto em relação às concentrações observadas nos biorreatores controles, durante o período experimental. Aos 56 dias de incubação *T. villosa* apresentava-se ainda viável no solo, o que foi confirmado até 84 dias no solo do biorreator 1. Além disso, nesse mesmo período foi possível determinar atividade enzimática, embora em níveis abaixo do que observado por Matheus *et al.* (2003) para *Lenitus crinitus* e *Psilocybe castanella*, quando foram incubados em solo não contaminado por 70 dias nos mesmos biorreatores estudados aqui.

Trametes villosa CCB 176 foi selecionado por Matheus *et al.* (2000) como sendo capaz de degradar 13,98 % da quantidade de HCB em solo contaminado com 29180 mg Kg^{-1} de solo, em 65 dias de incubação. Esse autor observou também que *T. villosa* CCB 176 apresentou bom desenvolvimento em solo, contendo alta concentração de íons cloreto no solo, o que de fato torna o solo mais tóxico. Essa evidência foi confirmada por Machado *et al.* (2005b), que observaram que essa linhagem de fungo foi capaz de degradar 58,07 % de pentaclorofenol em 90 dias de incubação em solo contendo 1278 mg desse composto kg^{-1} de

solo, confirmando o observado por Matheus *et al.* (2000) em relação a resistência a maior toxicidade aguda de solo devido à maior concentração de íons cloro. Pentaclorofenol é muito tóxico por interferir nas reações de fosforilação oxidativa de organismos vivos (Barbeu *et al.* 1997, Machado *et al.* 2005b, Walter *et al.* 2005).

Por ser mais resistente à toxicidade dos organoclorados, Salvi (2008) aplicou *T. villosa* CCB 176 estudou a biodegradação de organoclorados em solo submetido a tratamento químico para desalogenação, e observou que essa linhagem promoveu redução de 36,34 % da concentração de HCB e mineralização de quase 4% desse composto, em microcosmos, com as mesmas condições de cultivo utilizadas aqui, durante 112 dias de incubação. Ela descreve bom desenvolvimento desse fungo no solo submetido a tratamento químico prévio previamente tratado quimicamente para desalogenação de organoclorados. No presente trabalho, o crescimento de *T. villosa* não superou o de outros fungos no solo, de acordo com as quantidades de ergosterol, embora as taxas de ergosterol possam ter sido influenciadas pelas condições de cultivo desse fungo no solo dos biorreatores. No entanto, as baixas atividades enzimáticas apresentadas por *T. villosa* podem ser mais uma evidência do baixo desenvolvimento desse fungo no solo, considerando que Machado *et al.* (2005b) observou ótimas taxas de oxidases e peroxidases em solo contaminado com pentaclorofenol, conforme mencionado anteriormente.

O HCB possui baixa solubilidade em água, sendo altamente lipossolúvel (Bogan & Lamar 1996, Yuan *et al.* 2006, Yuan *et al.* 2007) e por essa razão, é possível que a emulsão de óleo vegetal possa ter contribuído para sua dissolução no solo dos biorreatores a partir dos 112 de incubação, período em que *T. villosa* não mais esteve viável no solo. Entretanto, Salvi (2008) obteve as maiores taxas de recuperação de compostos ¹⁴C-resíduos clorados, quando o sistema de cultivo continha 5% de óleo vegetal tanto nos tratamentos com *T. villosa* assim como nos controles.

O primeiro produto da degradação de HCB é o pentaclorobenzeno (PeCB), seja por biodegradação (Fiel & Sierra-Alvarez 2008) ou degradação físico-química (Shih *et al.* 2009). A concentração de PeCB no solo do biorreator 1 com *T. villosa* aos 84 dias ($23,3 \pm 8,8$ mg de PeCB kg^{-1} de solo) foi significativamente menor ($P = 0,002$) em relação à concentração determinada inicialmente ($63,3 \pm 8,8$ mg de PeCB kg^{-1} de solo). No entanto, aos 224 dias a concentração desse organoclorado ($73,3 \pm 0,0$ mg de PeCB kg^{-1} de solo) não diferiu ($P = 0,416$) da concentração inicial. Já no solo do biorreator 2 com *T. villosa* não foram observadas variações significativas ($P = 0,937$) da concentração de PeCB entre os períodos amostrais. No solo do biorreator controle 1 não foram observadas diferenças significativas ($P = 0,518$) entre a concentração inicial de PeCB ($73,3 \pm 4,4$ mg kg^{-1} de solo) e a determinada aos 224 dias de incubação ($66,6 \pm 0,0$ mg de PeCB kg^{-1} de solo). Somente a concentração de PeCB aos 56 dias mostrou-se pouco menor ($P = 0,034$) da determinada aos 28 dias. Já no solo do controle 2 não foi observada variações significativas ($P = 0,223$) entre as concentrações de PeCB determinadas ao longo dos períodos amostrais (Figura 6).

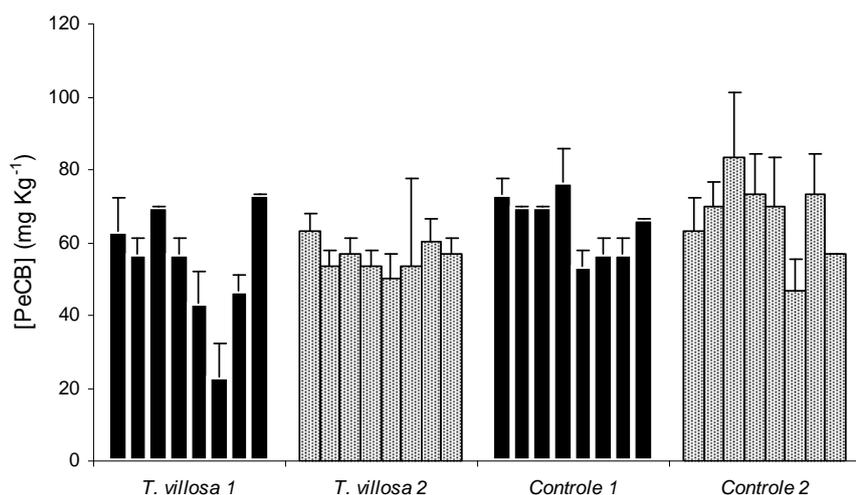


Figura 6: Concentração de pentaclorobenzeno (PeCB) no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)

A formação de PeCB a partir da desalogenação de HCB é bem descrita na literatura (Matheus 2003, Vitali 2004, Field & Sierra-Alvarez 2008, Shih *et al.* 2009). A remoção de cerca de 38% de PeCB por *T. villosa* CCB 176 em microcosmos, com a mesma condições de cultivo descrita aqui, foi observada por Salvi (2008).

A formação de isômeros de tetraclorobenzeno a partir da biodegradação de PeCB já foi observada (Fathepure & Vogel 1991, Field & Sierra-Alvarez 2008). No solo do biorreator 1 com *T. villosa* foi detectado o aparecimento de 1,2,4,5 tetraclorobenzeno (TCB-1) aos 14 dias ($13,3 \pm 4,4$ mg de TCB-1 kg^{-1} de solo), cuja concentração aumentou aos 56 dias ($23,3 \pm 4,4$ mg de TCB-1 kg^{-1} de solo). No segundo biorretor com fungo foi observado efeito semelhante, embora a concentração de TCB-1 aos 14 dias ($20,0 \pm 6,6$ mg kg^{-1} de solo) não tenha se diferenciado ($P = 0,282$) daquela observada aos 56 dias de incubação ($30,0 \pm 6,6$ mg de TCB-1 kg^{-1} de solo). Cerca de 10 mg de TCB-1 kg^{-1} de solo foram encontrados aos 14 e 28 dias no solo do biorreator controle 1 e aos 14 dias no solo do segundo controle (Figura 7).

Perfil semelhante foi observado com seu isômero, 1,2,3,4 tetraclorobeno (TCB-2). Esse composto foi detectado no solo do biorreator 1 com *T. villosa*, somente aos 28 dias de incubação ($10,0 \pm 0,0$ mg de TCB-2 kg^{-1} de solo) e no solo do segundo biorreator com esse fungo foi detectado nas amostrais iniciais ($5,0 \pm 0,0$ mg kg^{-1} de solo) e após 14 dias de incubação ($10,0 \pm 0,0$ mg kg^{-1} de solo). No solo dos biorreatores controles foi observado perfil parecido, tendo sido detectado TCB-2 no solo do controle 1 aos 14 dias ($16,0 \pm 0,0$ mg kg^{-1} de solo) e aos 28 dias ($10,0 \pm 0,0$ mg kg^{-1} de solo) e no solo do controle 2 cerca de 10 mg de TCB-2 kg^{-1} de solo aos 14 e aos 28 dias de incubação (Figura 8).

Foi observada diminuição na concentração de TCB-1 e TCB-2 após tratamento químico de desalogenação. Salvi (2008) não detectou esses compostos no solo estudado por ela. Em seu estudo ficou evidenciado que a partir do tratamento químico para desalogenação de HCB, os principais produtos formados foram tetraclorodietoxibenzeno e

triclorodietoxibenzeno. Embora no presente trabalho, além de não se ter condições - e nem seja objeto de pesquisa avaliar as vias de degradação dos compostos clorados - é possível inferir que muito provavelmente a degradação dos isômeros de tetraclorobenzeno pelo tratamento químico de desalogenação tenha originado os tricloroetoxibenzeno. Segundo Salvi (2008) a formação de radicais etoxi (C_2H_5O) deve-se ao uso de etanol nas reações de desalogenação química.

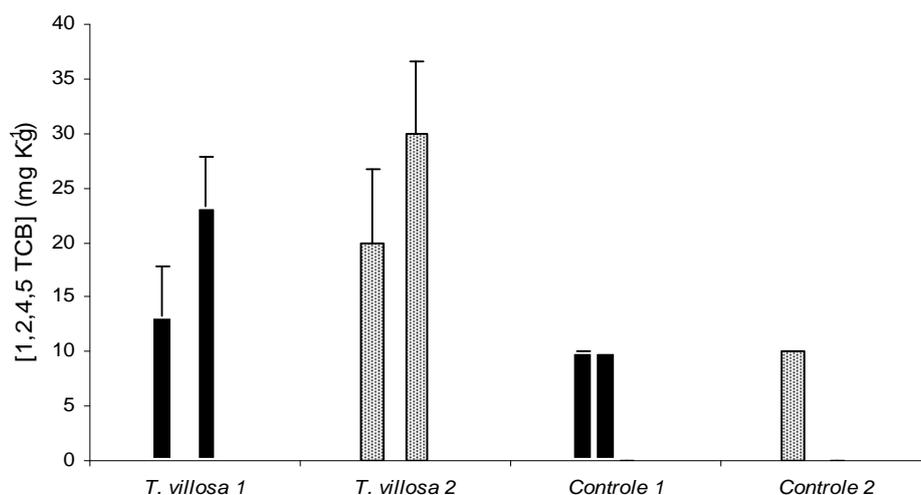


Figura 7: Concentração de 1,2,4,5 tetraclorobenzeno (TCB-1) no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)

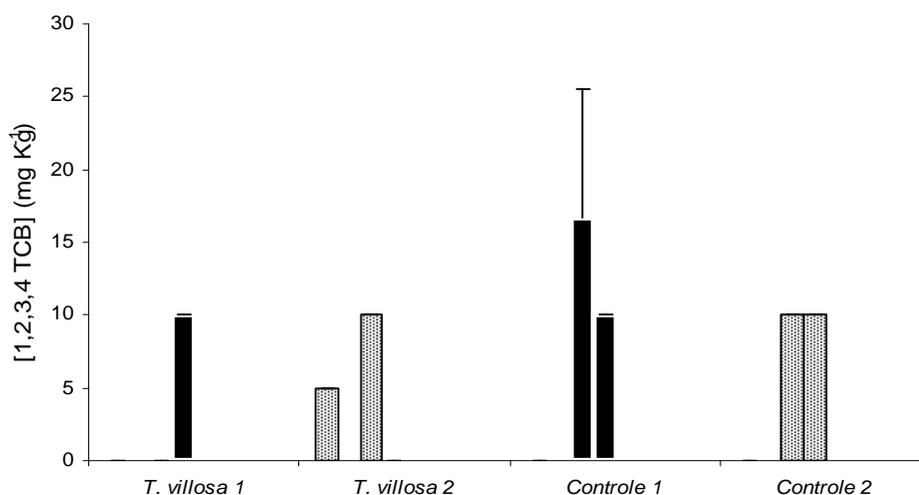


Figura 8: Concentração de 1,2,3,4 tetraclorobenzeno (TCB-2) no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)

O aparecimento de TCB-1 e TCB-2 no solo dos biorreatores pode ter se dado pelo desprendimento desses compostos da matriz sólida do solo devido à ação microbiológica. É conhecida a degradação biológica desses compostos, como demonstrado por Sander *et al.* (1991) na redução de 1,2,4,5 tetraclorobenzeno por linhagem de *Pseudomonas.spp.* Outras evidências também demonstram a capacidade de fungos basidiomicetos degradarem tetraclorobenzenos, como o estudo de D'Annibale *et al.* (2005) que demonstrou a total remoção de 1,2,3,4 tetraclorobenzeno por *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus pulmonarius*.

A concentração de tetraclorodietoxibenzeno (TCDTB) e seus isômeros aumentou significativamente a partir dos 14 dias nos quatro biorreatores avaliados aqui (Figura 9). No biorreator 1 com *T. villosa* a concentração de TCDTB aumentou expressivamente aos 14 dias ($973,3 \pm 15,5$ mg de TCDTB Kg^{-1} de solo), diminuiu a partir dos 28 dias até 224 dias de incubação ($578,33 \pm 315,5$ mg de TCDTB Kg^{-1} de solo), quando não diferiu ($P = 0,984$) da concentração determinada inicialmente ($573,3 \pm 37,7$ mg de TCDTB kg^{-1} de solo). No solo do segundo biorreator com esse fungo a concentração de TCDTB aos 14 dias ($903,3 \pm 102,2$ mg kg^{-1} de solo) diminuindo até 224 dias de incubação ($673,3,3 \pm 17,7$ mg kg^{-1} de solo). No entanto, a concentração nesse período foi um pouco maior ($P = 0,005$) que a determinada inicialmente ($570,0 \pm 13,3$ mg de TCDTB kg^{-1} de solo). No solo do controle 1 a concentração de TCDTB aumentou expressivamente aos 14 dias ($796,6 \pm 33,3$ mg kg^{-1} de solo) diminuindo a partir dos 28 dias até 224 dias de incubação ($603,3 \pm 64,4$ mg de TCDTB kg^{-1} de solo), quando não diferiu ($P = 0,516$) da concentração determinada inicialmente ($560,0 \pm 33,3$ mg de TCDTB kg^{-1} de solo). Já no solo do segundo controle a maior concentração de TCDTB também foi aos 14 dias de incubação ($1060,0 \pm 93,3$ mg de TCDTB kg^{-1} de solo), diminuindo a partir de então até 224 dias ($716,6 \pm 44,4$ mg de TCDTB kg^{-1} de solo), mas permanecendo superior a concentração determinada inicialmente ($593,3 \pm 28,8$ mg de TCDTB kg^{-1} de solo).

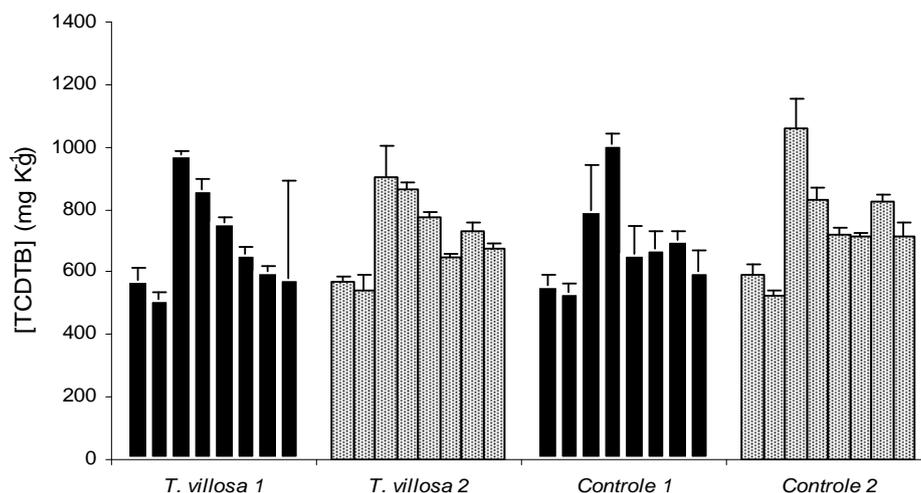


Figura 9: Concentração de tetraclorodietoxibenzeno e isômeros (TCDTB) no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)

A formação de triclorotrietoxibenzeno (TriCEB) está relacionada com a remoção de mais um átomo de cloro e ligação com mais um radical etoxi. A concentração de triclorotrietoxibenzeno aumentou no solo dos quatro biorreatores a partir dos 14 dias de incubação. No biorreator 1 houve aumento muito significativo ($P = 0,0000007$) da maior concentração de TriCEB aos 56 dias ($920 \pm 120 \text{ mg kg}^{-1}$) em relação à concentração determinada aos 14 dias ($282 \pm 33 \text{ mg de TriCEB kg}^{-1}$ de solo), não variando até 112 dias ($P > 0,05$) aumentando significativamente aos 224 dias ($1616 \pm 77 \text{ mg de TriCEB kg}^{-1}$ de solo). No segundo biorreator também se observou aumento muito expressivo ($P = 0,01$) na concentração de TriCEB aos 56 dias de incubação ($920 \pm 33 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo) em relação à concentração determinada aos 14 dias ($373 \pm 75 \text{ mg de TriCEB kg}^{-1}$ de solo). No entanto, a partir dos 56 dias, a concentração de TriCEB não variou mais até 224 dias de incubação ($1276 \pm 131 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo), porém, sendo muito maior que a concentração determinada inicialmente ($33 \pm 4 \text{ mg de TriCEB kg}^{-1}$ de solo). No solo do biorreator controle 1 também se observou aumento muito intenso da concentração de TriCEB a partir dos 14 dias de incubação ($680 \pm 60 \text{ mg de TriCEB kg}^{-1}$ de solo). Entretanto a concentração desse composto aos 224

dias (1716 ± 224 mg de TriCEB kg^{-1} de solo) não se diferenciou ($P > 0,05$) das determinadas aos 56 e 84 dias, mas foi bem maior ($P = 0,0003$) da determinada aos 112 dias (164 ± 57 mg de TriCEB kg^{-1} de solo). No controle 2 a concentração de TriCEB aos 56 dias (803 ± 291 mg kg^{-1} de solo) aumentou expressivamente ($P = 0,0009$) em relação à concentração determinada inicialmente (36 ± 4 mg kg^{-1} de solo). No entanto, não se diferenciou ($P > 0,05$) da determinada aos 84 e 112 dias. Aos 224 dias foi determinada a maior ($P < 0,05$) concentração de TriCEB em todo o período experimental (Figura 10).

Salvi (2008) identificou a formação de um isômero de ^{14}C -tricloroetoxibenzeno (tricloro-5-etoxibenzeno) a partir da degradação de ^{14}C -HCB, o que concorda com os dados aqui apresentados, além da formação de outros compostos combinados com radical etoxi, como tetraclorohidroquinona, 5,6,7,8 tetracloroquinoxaline, 2,3,5 triclorofenol-6-metóxi, 4-hidroxi e 3,4,6 tricloropirocatecol não identificados no presente trabalho.

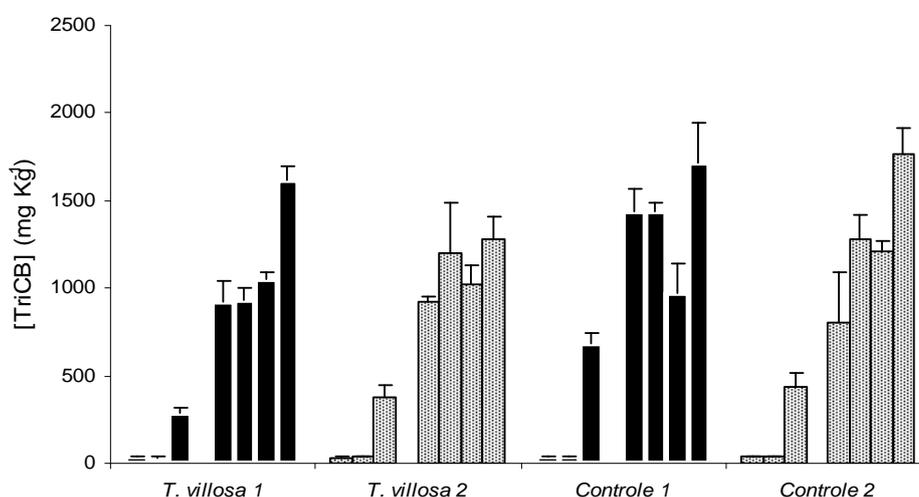


Figura 10: Concentração de tricloroetoxibenzeno (TriCEB) no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)

As diminuições na concentração de TriCEB mostram certa relação com as diminuições na concentração de TCDTB observadas nos biorreatores com *T. villosa*.

Entretanto, não se observou um efeito biótico evidente nem nas variações da concentração de TCDTB e nem nas de TriCEB, corroborando para a hipótese de que as reações químicas de desalogenação continuam mesmo após a neutralização com ácido sulfúrico, ou podem ser facilitadas pela ação microbiana, independente dos basidiomicetos, uma vez que também foram observadas nos biorreatores controle.

No entanto, mesmo *T. villosa* tendo apresentado baixo desenvolvimento no solo dos biorreatores, é evidente seu efeito na degradação de hexaclorobutadieno, o que foi evidenciado por outros basidiomicetos, como os estudados no capítulo 1.

A concentração de hexaclorobutadieno (HCBU) aumentou significativamente no solo dos biorreatores com *T. villosa* a partir dos 56 dias de incubação (Figura 11). Nesse período a concentração de HCBU no solo do biorreator 1 com esse fungo foi muito superior ($86,6 \pm 15,5$ mg kg⁻¹ de solo) àquela encontrada inicialmente ($5,0 \pm 0,0$ mg de HCBU kg⁻¹ de solo). Aos 84 dias se observou diminuição na concentração desse composto, não diferindo ($P = 1$) da encontrada inicialmente, mas sendo significativamente menor ($P = 0,005$) da encontrada aos 112 dias de incubação ($33,0 \pm 4,4$ mg kg⁻¹ de solo). Efeito parecido foi observado no solo do segundo biorreator com *T. villosa*, onde a maior concentração de HCBU foi determinada aos 56 dias ($100,0 \pm 13,3$ mg kg⁻¹ de solo), diminuindo até 112 dias de incubação ($13,3 \pm 4,4$ mg de HCBU kg⁻¹ de solo), não se diferenciando ($P = 0,925$) da concentração determinada inicialmente ($5,6 \pm 1,1$ mg de HCBU kg⁻¹ de solo). No controle 1 a concentração de HCBU aos 56 dias de incubação ($5,6 \pm 1,1$ mg de HCBU kg⁻¹ de solo) em relação à concentração inicial ($5,0 \pm 0$ mg de HCBU kg⁻¹ de solo). Porém foi detectado novamente somente aos 84 dias de incubação ($7,5 \pm 0,5$ mg de HCBU kg⁻¹ de solo), quando não se diferenciou ($P = 0,983$) da concentração determinada inicialmente. No segundo controle HCBU só foi detectado aos 56 dias de incubação (30 ± 0 mg kg⁻¹ de solo), parecendo não sofrer variações expressivas a partir de então até 112 dias ($P > 0,05$), não sendo detectado aos 224 dias de incubação.

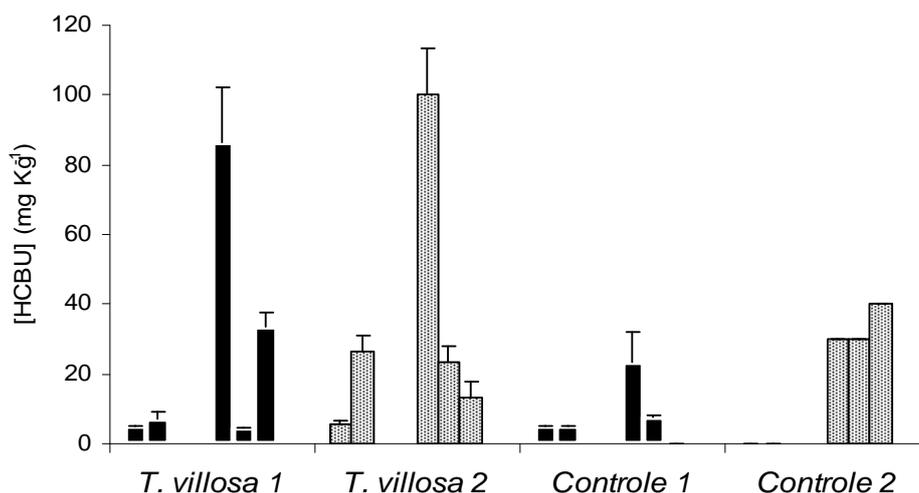


Figura 11: Concentração de hexaclorobutadieno (HCBU) no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)

Poucas são as evidências de biodegradação de hexaclorobutadieno (Booker & Pavlostathis 2000, Li *et al.* 2008). Mas, recentemente Li *et al.* (2008) demonstraram que *Serratia marcescens* HL1 foi capaz de remover 100% de HCBU em meio contaminado com 50mg L^{-1} desse poluente.

No capítulo 1 desse trabalho ficou evidenciada a capacidade de *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella* de degradarem HCBU. Aqui também ficou muito evidenciado o efeito biótico na degradação de HCBU nos quatro biorreatores. Embora *T. villosa* tenha apresentado baixo desenvolvimento no solo, essa espécie evidenciou, mais uma vez, que a utilização de basidiomicetos para bioremediação de solo contaminado com hexaclorobutadieno pode ser uma boa alternativa. Entretanto, é importante mais estudos das vias de degradação desse composto por esse grupo de fungos.

A formação de pentacloroanizol (PCA) tem origem principalmente a partir da degradação de pentaclorofenol (Barbeu *et al.* 1997, Field 2001, Machado *et al.* 2005b). Neste trabalho, após o tratamento químico do solo para desalogenação dos organoclorados se observou a formação de pentaclorofenol. No entanto, nas amostras de solo retiradas logo após a incorporação do inóculo de *T. villosa* no solo não foi detectada a presença de PCF, mas sim

de PCA evidenciando a degradação de PCF após o tratamento químico do solo. No entanto, foi observado nos quatro biorreatores que a concentração de PCA aos sete dias de incubação não se diferenciou ($P > 0,05$) da concentração inicial (Figura 12).

Machado *et al.* (2005b) relacionaram a formação de PCA com a degradação de PCF por *Trametes villosa* CCB 176. No entanto, outros microorganismos também podem ter originado PCA no solo submetido ao tratamento químico e ser misturado em igual proporção com solo destituído de contaminação pelo fato de ter permanecido no biorreator cinco dias antes da montagem do experimento. Entretanto, o desaparecimento de PCA no solo dos biorreatores controles, já a partir dos 14 dias de incubação, pode ser mais um indício de que as reações químicas continuaram a ocorrer mesmo após a neutralização do solo, embora, a ação de outros microorganismos possa também ter contribuído para a remoção de PCA do solo.

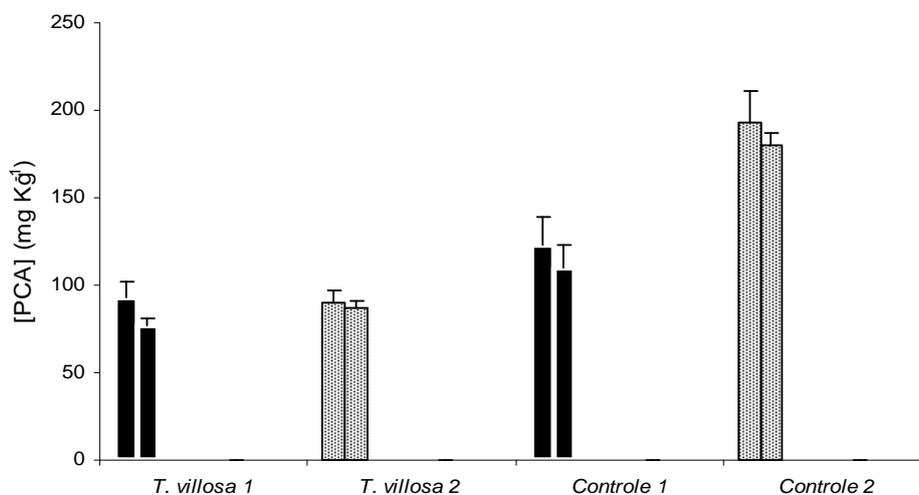


Figura 12: Concentração de pentacloroanizol (PCA) no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)

A degradação dos compostos clorados presentes no solo deu origem também a compostos que não puderam ser identificados nas análises cromatográficas. Tais compostos foram referidos aqui como os totais de picos não identificados (TPNI) (Figura 13).

No solo do biorreator 1 com *T. villosa* a concentração de TPNI aos 28 dias ($2550,0 \pm 266,6$ mg kg⁻¹ de solo) foi maior ($P = 0,001$) da encontrada inicialmente ($1356,6 \pm 202,2$ mg kg⁻¹ de solo), e também foi significativamente maior ($P = 0,023$) da concentração determinada aos 224 dias de incubação (1690 ± 360 mg kg⁻¹ de solo). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações determinadas aos 56, 84, 122 e 224 dias com as determinadas inicialmente ($P > 0,05$). A maior concentração de TPNI no solo do segundo biorreator com *T. villosa* também foi determinada aos 28 dias de incubação (2183 ± 187 mg de TPNI kg⁻¹ de solo) em aos demais períodos amostrais. No entanto, a concentração desses compostos foi significativamente menor aos 224 dias de incubação em relação à concentração desses compostos determinada inicialmente (1503 ± 124 mg kg⁻¹ de solo).

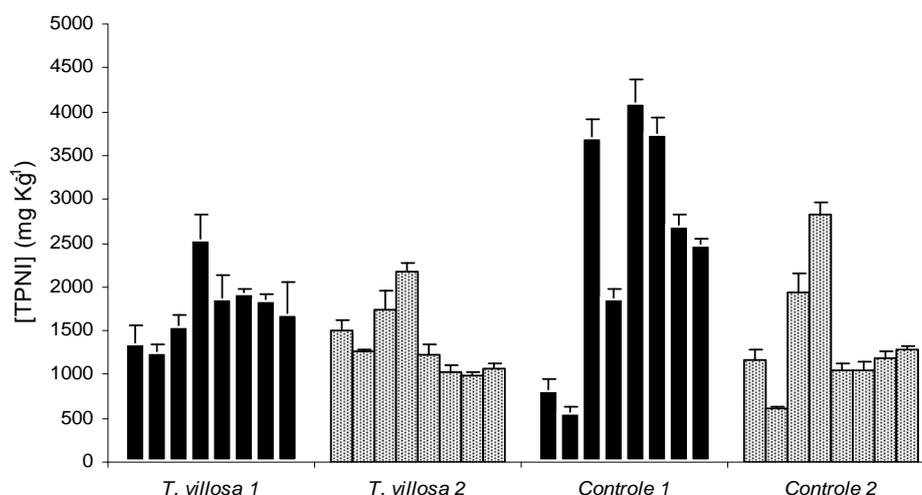


Figura 13: Concentração de Totais de Picos Não Identificados (TPNI) no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)

Foi observado aumento da concentração de TPNI nos dois biorreatores controles a partir dos 14 dias de incubação. No solo do controle 1 a concentração dos TPNI aumentou significativamente aos 14 dias (3706 ± 204 mg kg⁻¹ de solo) em relação à determinada inicialmente (826 ± 115 mg kg⁻¹ de solo). Embora a concentração dos TPNI tenha diminuído

aos 224 dias ($2500 \pm 46 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo), em relação à determinada aos 84 dias ($3756 \pm 151 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo) de incubação, ainda assim foi maior do que a concentração determinada inicialmente (Figura 13).

É possível observar que nos biorreatores com *T. villosa* houve menor formação dos compostos clorados não identificados, originados a partir da biodegradação dos organoclorados e da possível continuidade das reações de desalogenação do prévio tratamento químico realizado no solo, embora não tenhamos evidências de tais fenômenos.

Além da formação dos compostos não identificáveis, é de se esperar um aumento na concentração de íons cloreto, após degradação dos organoclorados no solo. No entanto, não foi observado aumento na concentração de íons cloreto em nenhum dos biorreatores avaliados (Figura 14). Nos dois biorreatores com *T. villosa* a concentração de íons cloreto no solo aos 224 dias foram menores, embora ao nível de significância de 5% não tenha sido observadas variações significativas entre a concentração desses íons durante o período experimental ($P = 0,316$ e $0,117$, respectivamente). Também não ocorreram variações significativas na concentração de íons cloreto no solo dos biorreatores controles ($P = 0,169$ e $0,245$, respectivamente aos controle 1 e 2), embora possa ser visualizada tendência em diminuição da concentração de íons cloro.

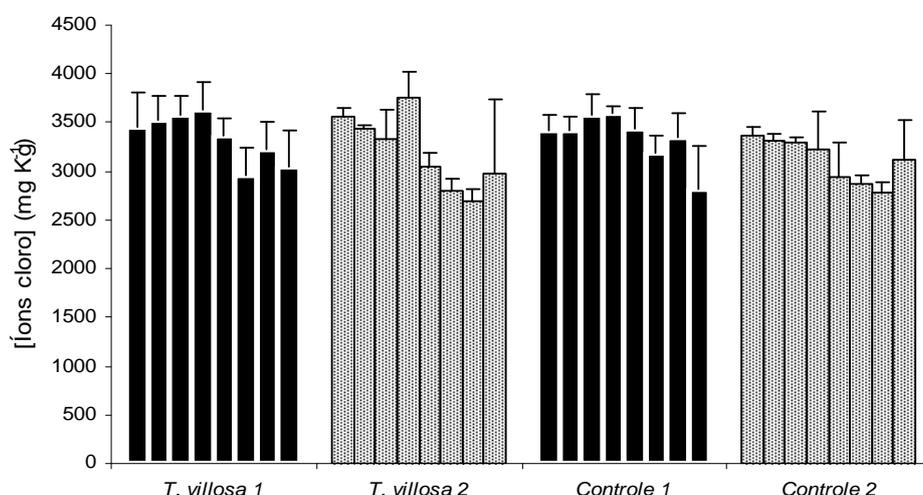


Figura 14: Concentração de íons cloro no solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)

A determinação da concentração de íons cloreto é bom indicador de degradação de organoclorados tanto em estudos *in vitro* com em larga escala (Aiken & Logan 1996, Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005b). Neste trabalho se detectou um aumento muito expressivo na quantidade de íons cloreto após o tratamento químico do solo para desalogenação dos organoclorados. A concentração desses íons no solo antes de ser submetido ao tratamento químico foi de $240 \pm 20 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo, e após a incorporação do inóculo ao solo, foi de $2988 \pm 500 \text{ mg de íons cloro kg}^{-1}$ de solo. No entanto não foi observada nenhuma variação na concentração desses íons que pudessem ser atribuídas à ação de *T. villosa*, embora D'Annibale *et al.* (2006) tenham correlacionado o aumento de íons cloreto em solo com a degradação de organoclorados promovida pelas linhagens fúngicas *Stachybotrys* sp. e *Allescheriella* sp., em solo contaminado com vários poluentes orgânicos persistentes. Esses autores também observaram que as maiores taxas de degradação de organoclorados se deu quando detectaram os picos de atividade enzimática. No solo dos biorreatores com *T. villosa* não foram observadas boas atividades de lacases e demais fenoloxidasas e peroxidases dependentes do manganês, em relação a outras experiências obtidas com essa linhagem em laboratório (Yamanaka *et al.* 2008, Machado *et al.* 2005b), evidenciando com isso o baixo desenvolvimento dessa espécie no solo dos biorreatores, muito provavelmente devido à toxicidade dos compostos clorados formados com o tratamento químico para desalogenação dos organoclorados.

Foi observado forte queda da toxicidade aguda do lixiviado do solo (TAS) nos dois biorreatores com *T. villosa*, logo após a inoculação dos fungos no solo, se comparadas aos biorreatores controle, sendo observado aumento da toxicidade durante o período de incubação (Figura 15), passando de $10,49 \pm 3,86$ Unidades tóxicas agudas (Uta) para $34,01 \pm 4,42$ Uta, significativamente maior ($P = 0,001$) que a Uta inicial. O mesmo comportamento foi observado no segundo biorreator com *T. villosa*. Nos biorreatores controle não se observou efeito da inoculação do bagaço de cana-de-açúcar sem fungo no solo, que no entanto, parece

ter estimulado a microbiota autóctone a diminuir muito significativamente a TAS do solo de $224,01 \pm 111,67$ Uta para $27,76 \pm 2,19$ Uta (Figura 15).

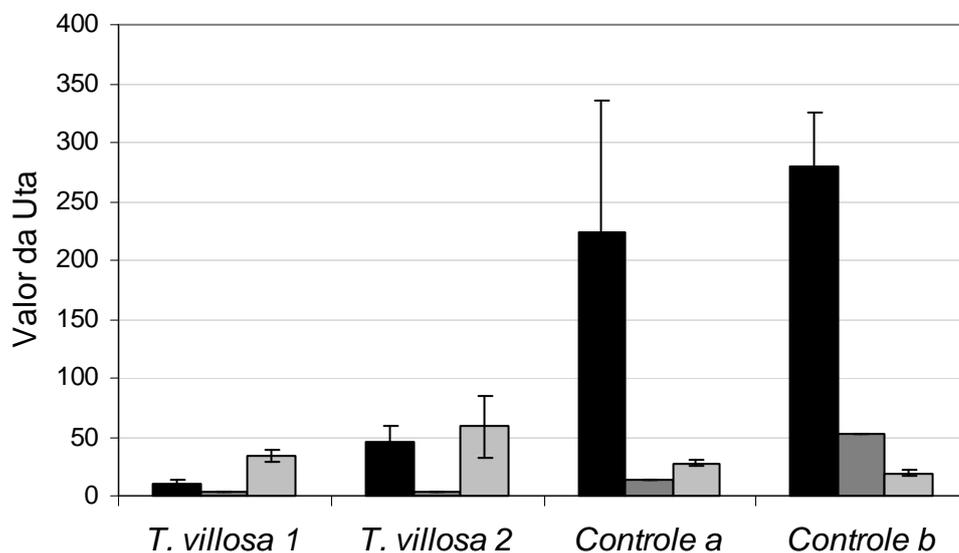


Figura 15: Toxicidade aguda do solo dos biorreatores. As colunas correspondem aos dias de amostragem de solo após inoculação do fungo no solo, aos 56 e 224 dias de incubação. Unidade tóxica aguda (Uta) equivale a razão entre 100 / CE50.

Segundo D'Annibale *et al.* (2005) os basidiomicetos *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus pulmonarius* promoveram diminuição da toxicidade do solo contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos e metais pesados. Entretanto, eles relatam que outros microrganismos crescendo concomitantemente com os basidiomicetos tiveram grande participação na diminuição da toxicidade do solo. Esse fato foi mais evidenciado por D'Annibale *et al.* (2006) que observaram maior eficiência na diminuição da toxicidade do solo, quando realizaram a bioaugmentação de fungos nativos do solo contaminado há muito tempo com hidrocarbonetos poliaromáticos. Esses autores descrevem ainda que a ação conjunta com outros microrganismos pode favorecer o processo de biorremediação de solo uma vez que as bactérias podem utilizar compostos menores como fonte de carbono, os quais

podem ser originados a partir da ação de fungos na degradação dos compostos com maior estabilidade química.

A diminuição da TAS observada nos biorreatores controles muito provavelmente foi promovida pelos microrganismos ali presentes, uma vez que aos 56 dias ficou evidente tal diminuição da TAS. Conforme discutido anteriormente, aos 224 dias foram quantificados outros fungos e bactérias que cresceram tanto no solo dos biorreatores controles como naqueles onde *T. villosa* foi incubado. Embora não se tenha realizado a quantificação desses microrganismos aos 56 dias, eles já deviam estar presentes no solo, uma vez que a aeração do solo foi provavelmente o principal veículo de entrada deles. Uma nova inoculação de fungos selecionados do próprio ambiente contaminado foi defendida por D'Annibale *et al.* (2006), para uma ação mais eficiente sobre os compostos resultantes da biodegradação precedente.

O tratamento químico para desalogenação dos organoclorados mostrou-se muito eficiente principalmente para a degradação de hexaclorobenzeno e pentaclorobenzeno, no entanto, houve a formação de compostos clorados ligados a radicais etoxi os quais aumentaram a toxicidade do solo, o que pode ter prejudicado o desenvolvimento de *T. villosa* nos bioreatores.

Outro fato que pode ter contribuído para o baixo desenvolvimento de *T. villosa* foi a possível formação de áreas com baixa aeração na massa de solo dos biorreatores. De acordo com os cálculos o volume mínimo de ar no solo foi de $1,5 \text{ cm}^3 \text{ h}^{-1}$, e embora tenha sido injetado maior volume de ar na maior parte do estudo, não é possível afirmar com segurança que toda a massa de solo tenha sido oxigenada por igual. As variações nos macronutrientes indicaram a atividade microbiana no solo, não tendo sido observada diferença entre os biorreatores com o *Trametes villosa* dos controles. Por outro lado, são várias as evidências de que o consórcio entre microrganismos pode ser interessante para os processos de

bioremediação (Holroyd & Caunt 1995, Jorgensen *et al.* 2000, Vitali 2004, D'Annibale *et al.* 2006, Field & Sierra-Alvarez 2008, Guerin 2008).

O tratamento químico aqui empregado, além de originar os radicais etoxi altamente reativos, com a desalogenação de HCB também gerou combinação de glicol éter e/ou composto hidroxilado, e um sal alcalino, os quais apresentam alta solubilidade (Arruda 2005). De acordo com Matheus & Silva (dados não publicados) a mistura de solo submetido a tratamento químico para desalogenação com solo sem contaminação (1:1) proporcionou melhor crescimento de *T. villosa* em microcosmos. No entanto, de acordo com os resultados apresentados aqui, a proporção de diluição do solo parece não ter favorecido o crescimento de *T. villosa*, embora essa espécie tenha se mantido viável até 56 dias e aos 224 dias tenha sido evidenciada a presença de outros fungos e bactérias.

Conclusões

Em que pese o baixo desenvolvimento de *Trametes villosa* foram observadas reduções nas concentrações dos isômeros de tetraclorobenzeno, de hexaclorobutadieno e de pentacloroanizol. Microrganismos oportunistas contribuíram para as reduções desses organoclorados nos biorreatores controles, indicando que pode ser evitada a esterilização química do solo, desde que não sejam competitivos durante o período de aclimação e colonização inicial dos basidiomicetos no solo. A produção de inóculo em bagaço de cana-de-açúcar em forma de peletes pode melhorar o desenvolvimento de *Trametes villosa*, protegendo-o dos efeitos tóxicos dos organoclorados no solo. Embora tenha promovido redução de mais de 80% da concentração de HCB, o prévio tratamento químico do solo para oxidação de HCB não se mostrou uma técnica viável, uma vez que resultou na formação de outros compostos mais tóxicos no solo, os quais não foram biodegradados. Além disso, esse tratamento químico torna o processo mais caro, o que é indesejável para a aplicação no solo

em larga escala, apesar da significativa redução da toxicidade do lixiviado do solo quando aplicado o basidiomiceto posteriormente.

Agradecimentos

Somos gratos ao Instituto de Botânica de São Paulo e ao Programa de Pós-graduação desse instituto pelo apoio institucional desse projeto, à Fundação para o Desenvolvimento da Pesquisa Agropecuária e à Rhodia do Brasil, pelo apoio financeiro e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior.

Referências bibliográficas

- Aiken, B.S. & Logan, B.E.** 1996. Degradation of pentachlorophenol by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown in ammonium lignosulphonate media. *Biodegradation*. 7: 175-182.
- Alexander, M.** *Biodegradation and Bioremediation*. New York: Ed. Academic Press, 1999. 453p.
- Arruda, T. L.** 2005. Uso de processos oxidativas avançados e ferro elementar na remediação de água subterrânea contendo compostos organoclorados. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 172p. *apud* Salvi, M.B. 2008. Degradação química e biológica de 14CHexaclorobenzeno por polietilenoglicol/hidróxido de sódio e *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 150p.
- Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M., Legge, R.L.** 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*.

- Barajas-Aceves, M., Hassan, M., Yinoco, R., Vazquez-Duhalt, R.** 2002. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. *Journal of Microbiological Methods* 50: 227-236.
- Barber, J.L., Sweetman, A.J., van Wijkb, D., Jonesa, K.C.** 2005. Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes. *Science of the Total Environment* 349: 1-44.
- Barbeau, C., Deschenes, L., Karamanev, D., Comeau, Y., Samson, R.** 1997. Bioremediation Of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 745-752.
- Behalová, B., Bláhová, M., Behal, V.** 1994. Regulation of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiology* 39: 4 287-290.
- Bogan, B.W. & Lamar, R.T.** 1996. One-Electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (7): 2631- 2635.
- Booker, R.S., Pavlostathis, S.G.** 2000. Microbial reductive dechlorination of hexachloro-1,3-butadiene in a methanogenic enrichment culture. *Water Research* 34: (18) 4437–4445.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E. & Bornemann, S.** 1996. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4627-4632.
- Caesar-TonThat, T.C., Cochran, V.L.** 2001. Role of a saprophytic basidiomycete soil fungus in aggregate stabilization. *In: Stott, D.E., Mahtar, R.H., Steinhardt, G.C.* 1999. *Suitaining the Global Farm*. 10th International Soil Conservation Organization Meeting held. France, Purdue University and the USDA-ARS National Soil Erosion Research Laboratory.

- Cerezine, P.C., Nahas, E., Banzatto, D.A.** 1988. Soluble phosphate accumulation by *Aspergillus niger* from fluorapatite. *Applied Microbiology Biotechnology* 29: 501-505.
- D'Annibale, A., Ricci, M., Leonardi, V., Quarantino, D., Mincione, E., Petruccioli, M.** 2005. Degradation of Aromatic Hydrocarbons by White-Rot Fungi in a Historically Contaminated Soil. *Biotechnology and Bioengineering* 90:6 723-731.
- D'Annibale, A., Rosetto, F., Leonardi, V., Federici, F., Petruccioli, M.** 2006. Role of Autochthonous Filamentous Fungi in Bioremediation of a Soil Historically Contaminated with Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 72:1 28-36
- Dagley, S.** 1978. Microbial catabolism, the carbon cycle and environmental pollution. *Naturwissenschaften* 65: 85-95, *apud* Matheus, D.R. 1998. Biorremediação de solos contaminados com compostos orgânicos e biodegradação de hexaclorobenzeno por basidiomicetos brasileiros. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista-UNESP, Rio Claro, 166p.
- Dupont, R.R., Bruell, C.J., Marley, M.C., Downey, D.C., Norris, R.D., Hulling, S.G. & Pivets, B.** 1997. Bioremediation. Annapolis: American Academy of Environmental Engineers and USEPA. 596p.
- Eggen, T. & Sveum, P.** 2001. DDT degradation by chemical oxidation and white rot fungi. *In: Ex situ biological treatment technologies.* Magar, V.S., von Fahnestock, F.M., Leeson, A. (eds.). Columbus: Battelle Press 157-164.
- Fathepure, B.Z., Vogel, T.M.** 1991. Complete degradation of polychlorinated hydrocarbons by two-stage biofilm reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (12): 3418-3422.

- Field, J.A., Sierra-Alvarez, R.** 2008. Microbial degradation of chlorinated benzenes. *Biodegradation* 19: 463-480.
- Gallaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B. & Haltrich, D.** 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 529-536.
- Guerin, T.F.** 2008. Ex-situ bioremediation of chlorobenzenes in soil. *Journal of Hazardous Materials* 154: 9-20.
- Heerenklage, H.,K., Woyczehowski, H., Bollow, S., Stegmann, R.** 1998. Influence of oxygen on the degradation of Diesel Fuel in Soil Bioreactors. *Acta Biotechnology* 2: 109-122.
- Hofrichter M.** 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 454-466.
- Holroyd, M.L. & Caunt, P.** 1995. Large-Scale Soil Bioremediation Using White-Rot Fungi. *In: Bioaugmentation for Site Remediation*. Hinchee, R., Fredrickson, J., Alleman, B.C. (eds.). Columbus: Battelle Press 181-187.
- Itoh, K., Fujita, M., Kumano, K., Suyama, K., Yamamoto, H.** 2000. Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 85-91.
- Jong, E., Field, J.A.** 1997. Sulfur tuft and turkey tail: Biosynthesis and biodegradation of organohalogenes by basidiomycetes. *Annual Review Microbiology* 51: 375-414.
- Jorgensen, K.S., Puustinen,J., Suortti, A.-M.** 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution* 107: 245-254.

- Kaštánek, F. & Kaštánek, P.** 2005. Combined decontamination processes for wastes containing PCBs. *Journal of Hazardous Materials B117*: 185-205.
- Kiehl, E. J.** 1985. *Fertilizantes orgânicos*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 492p.
- Kirk, T.K., Schultz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F. & Zeikus, J.G.** 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*. 117: 277-285.
- Kulik, N., Goi, A., Trapido, M., Tuhkanen, T.** 2006. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *Journal of Environmental Management* 78: 382-391.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A.** 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*. 169: 247-250.
- Lamar, R.T., Dietrich, D.M.** 1990. In situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 3093-3100.
- Lamar, R.T., White, R.B.** 2001. Mycoremediation – Commercial Status and Recent Developments. *In*: Magar, V.S., von Fahnstock, F.M., Leeson, A. (Eds). *Ex Situ Biological Treatment Technologies*. Columbus: Battelle Press 157-164.
- Li, M.T., Hao, L.L., Sheng, L.X., Xu, J.B.** 2008. Identification and degradation characterization of hexachlorobutadiene degrading strain *Serratia marcescens* HL1. *Bioresource Technology* 99: 6878-6884.
- Ma, X., Zheng, M., Liu, W., Qian, Y., Zhao, X. & Zhang, B.** 2005. Synergic effect of calcium oxide and iron (III) oxide on the dechlorination of hexachlorobenzene. *Chemosphere* 60: 796-801.

- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R.** 2005a. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* 36: 246-252.
- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R.** 2005b. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 297-301.
- Martin, J.P.** 1950. Use of rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science* 69: 215-232.
- Matheus, D. R. & Okino, L. K.** 1998. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. *In: Bononi, V. L. R. e Grandi, R. A. P. (eds.). 1998. Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente. 184p.*
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G.** 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16 (5): 415-421.
- Matheus, D. R. & Bononi, V. L. R.** 2002. C/N Ratio and vegetable oil to mineralize ¹⁴C hexachlorobenzene by white-rot-fungi. *In: Gavaskar, A. R., Chen, A. S. C. (eds.). Remediation of chlorinated and recalcitrant compounds. Monterey, CA, Paper 2B-10.*
- Matheus, D. R.** 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.
- Matheus, D.R., Bononi, V.L.R., Machado, K.M.G., Silva, R.R., Rodrigues, T.A.** 2003. Basidiomycetes growth in bioreactors to applied in HCB soil biorremediation. *Proceedings*

do simpósio The Seventh International Symposium In Situ and On-Site Biorremediation, Battelle Press, Orlando, Paper G5.

McErlean, C., Marchant, R., Banat, I.M. 2006. An evaluation of soil colonisation potential of selected fungi and their production of ligninolytic enzymes for use in soil bioremediations. *Antonie van Leeuwenhoek* 90: 147-158.

Miyoshi, K., Nishio, T., Yasuhara, A., Morita, M. & Shibamoto, T. 2004. Detoxification of hexachlorobenzene by dechlorination with potassium–sodium alloy. *Chemosphere* 55: 1439-1446.

Moreira-Neto, Matheus, D.R, Machado, K.M.G. 2009. Influence of pH on the growth and production of the ligninolytic system of tropical basidiomycetes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, “*in press*”.

Nascimento, N.R., Nicola, S.M.C., Rezende, M.O.O., Oliveira, T.A., Oberg, G. 2004. Pollution by hexachlorobenzene and pentachlorophenol in the coastal plain of São Paulo state, Brazil. *Geoderma* 121: 221-232.

Okeke, B.C., Smith, J.E., Paterson, A., Watson-Craik, I.A. 1996. Influence of environmental parameters on pentachlorophenol biotransformation in soil Influence of environmental parameters on pentachlorophenol biotransformation in soil by *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiol Biotechnology* 45: 263-266.

Pazarlioglu, N, Urekb, R.O., Ergunc, F.Urekb, R.O., Ergunc, F. 2005. Biodecolourization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry* 40: 1923–1929.

Pointing, S. B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 20–33.

- Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V. & Vasilchenko, L.G.** 2004. Fungal Decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 40 (1): 1-17.
- Rahuman, M.S.M., Pistone, L., Trifiró, F., Miertus, S.** 2000. Destruction technologies for polychlorinated biphenyls (PCBs). *In* : Annals of Expert Group Meetings on POPs and Pesticides Contamination : Remediation Technologies, International Centre for Science and High Technology United Nations Industrial Development Organization (ICS-UNIDO), 55p.
- Robles-Hernández, L., Franco, A.C.G., Donald L. Crawford, D.L., Chun, W.W.C.** 2008. Review of environmental organopollutants degradation by white-rot basidiomycete mushrooms - Revisión de degradación de contaminantes ambientales por basidiomicetos de la pudrición Blanca. *TecnoCiência Chihuahua* 2 (1): 32-40.
- Rodrigues, N.L.V.B.** 2005. Testes de toxicidade aguda através de bioensaios no extrato solubilizado dos resíduos classe II A – não inertes e classe II B – inertes. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 122p.
- Salvi, M.B.** 2008. Degradação química e biológica de ¹⁴CHexaclorobenzeno por polietilenoglicol/hidróxido de sódio e *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 150p.
- Sander, P., Wittich, R.M., Fortnagel, P., Wilkes, H., Francke, W.** 1991. Degradation of 1,2,4-Trichloro- and 1,2,4,5-Tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 5 1430-1440.
- Sawyer, N.A., Chambers, S.M., Cairney, J.W.G.** 2003. Utilisation of inorganic and organic phosphorus sources by isolates of *Amanita muscaria* and *Amanita* species native to temperate eastern Australia. *Australian Journal of Botany* 51: 151-158.

- Shih, Y., Chen, Y., Chen, M., Tai, Y., Tsob, C.** 2009. Dechlorination of hexachlorobenzene by using nanoscale Fe and nanoscale Pd/Fe bimetallic particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineer. Aspects* 322: 84-89.
- Silva, R. R.** 2004. Ergosterol para a determinação de biomassa de fungos *Lentinus crinitus* Berk e *Psilocybe castanella* Peck em biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 108p.
- Targa, H.J., Klockow, D.** 1997. Air pollution and vegetation damage in the tropics – the Serra do Mar as an example. *In: Klockow, D., Targa, H.J., Vautz, W.* ed. São Paulo.
- Tekere, M., Mswaka, A.Y., Zvauya, R., Read, J.S.** 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 420–426.
- Vitali, V. M. V.** 2004. Biodegradação de hexaclorobenzeno por *Eupenicillium* spp. E *Psilocybe castanella* em solos contaminados com organoclorados. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 116p.
- Vitali, V. M. V., Machado, K. M. G., Andrea, M. M., Bononi, V. L. R.** 2006. Screening mitosporic fungi for organochlorides degradation. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 256-261.
- Walter, M., Boyd-Wilson, K. B., Boul, L, Ford, C., McFadden, D., Chong, B. & Pinfeld, J.** 2005. Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 56: 51–57.
- Wells, J.M., Hughes, C., Boddy, L.** 1990. The fate of soil-derived phosphorus in mycelial cord systems of *Phanerochaete velutina* and *Phallus impudicus*. *New Phytologist* 141: 595-606.

- Wells, J.M., Boddy, L., Donnelly, D.P.** 1998. Wood decay and phosphorus translocation by the cord-forming basidiomycete *Phanerochaete velutina*: the significance of local nutrient supply. *New Phytologist* 138: 607-617.
- Yamanaka, R., Soares, C. F., Matheus, D. R. & Machado, K. M. G.** 2008. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 78-84.
- Yuan, S., Tian, M. & Lu, X.** 2006. Electrokinetic movement of hexachlorobenzene in clayed soils enhanced by Tween 80 and β -cyclodextrin. *Journal of Hazardous Materials* 137 (2): 1218-1225.
- Yuan, S., Shu, Z., Wan, J. & Lu, X.** 2007. Enhanced desorption of hexachlorobenzene from kaolin by single and mixed surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* 314 (1): 167-175.
- Zang, S., Li, P., Li, W., Zhang, D. & Hamilton, A.** 2007. Degradation mechanisms of benzo[a]pyrene and its accumulated metabolites by biodegradation combined with chemical oxidation. *Chemosphere* 67: 1368-1374.

5. Discussão geral

As linhagens *Lentinus crinitus*, *Psilocybe castanella* e *Trametes villosa* estudadas aqui já mostraram grande potencial para a degradação de hexaclorobenzeno e pentaclorofenol em microcosmos com 30 e 100 g de solo (Matheus *et al.* 2000, Matheus 2003, Machado *et al.* 2005a, Vitali *et al.* 2006, Moreira-Neto 2006, Ballaminut 2007, Coelho 2007, Salvi 2008). Entretanto, até o momento não se havia testado a eficiência desses fungos na degradação desses poluentes em maior escala de solo. A aplicação dessas espécies para biorremediação de solo contaminado por organoclorados foi avaliada em biorreatores desenvolvidos em área do município de São Vicente, SP., onde estão depositados cerca de 33.000 toneladas de solo contaminado com organoclorados, dentre os quais, os principais compostos são hexaclorobenzeno, pentaclorobenzeno, tetraclorobenzeno, pentaclorofenol, hexaclorobutadieno e outros. Em uma primeira avaliação evidenciou-se a necessidade em adequar os biorreatores para o crescimento dos basidiomicetos, com a instalação de sistema de aeração do solo e vedação da tampa do biorreator. Conforme descrito por Matheus *et al.* (2003) *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella* apresentaram bom desenvolvimento em solo sem contaminação nos mesmos biorreatores estudados aqui, seguindo as condições de cultivo descritas por Matheus & Bononi (2002).

Mas, de acordo com os dados obtidos no presente trabalho observou-se que não foi possível repetir as taxas de degradação de hexaclorobenzeno obtidas nos estudos em laboratório.

O crescimento de *L. crinitus* no solo dos biorreatores aqui estudados não foi expressivamente maior do que o crescimento fúngico estimado nos biorreatores controles, sendo importante lembrar que outras espécies fúngicas também cresceram concomitante nos biorreatores onde *L. crinitus* foi incubado. Assim, não foi possível distinguir as fases de crescimento de *L. crinitus* até 112 dias, a partir de quando as quantidades de ergosterol

diminuíram expressivamente. *P. castanella* também não exibiu um perfil característico das fases de crescimento microbiano. Entretanto, conforme descrito por Matheus *et al.* (2003) o crescimento de *L. crinitus* no solo sem contaminação contido nos biorreatores ter sido muito satisfatório, tendo sido possível distinguir as fases de crescimento desse basidiomiceto, ao contrário de *P. castanella* que apresentou crescimento estável durante 76 dias de incubação. Por outro lado, esses dois basidiomicetos foram recuperados do solo, e apresentaram atividade metabólica até 112 dias de incubação, indicando sua presença e viabilidade no solo até este período.

A umidade do solo nos biorreatores com *L. crinitus* e controles se mantiveram estáveis até 112 dias de incubação, aumentando expressivamente aos 224 dias nos biorreatores com *L. crinitus*, período em que essa espécie não foi isolada no solo. Como quantidades consideráveis de outros fungos e bactérias foram quantificados no solo, pressupõe-se que eles tenham contribuído enormemente para o aumento da umidade do solo nesses biorreatores nesse período. Entre os biorreatores com *P. castanella* se observou diferentes perfis da umidade do solo, tendo sido necessário inclusive ajustar a umidade do solo de um dos biorreatores. Também o pH do solo dos seis biorreatores diminuiu durante o período experimental, e manteve-se abaixo do pH determinado no solo dos biorreatores controles até 84 dias nos biorreatores com *L. crinitus* e até 112 dias nos biorreatores com *P. castanella*. Ácidos orgânicos (ácidos oxálico, carboxílicos, malônico, málico, tartárico ou láctico) estabilizam íons (Mn^{+3}) e funcionam como oxi-redutores de baixo peso molecular, atacando moléculas orgânicas inespecificamente, através da subtração de hidrogênio e um elétron (Hatakka 1994), o que muito provavelmente tenha contribuído para as reações de degradação dos clorados nos dois trabalhos descritos anteriormente.

A variação da temperatura do solo nos biorreatores com *L. crinitus* esteve de acordo com os outros parâmetros avaliados, uma vez que permaneceu superior à temperatura do solo dos controles até próximo dos 60 dias de incubação, a partir de quando o metabolismo desse

fungo deve ter diminuído no solo. Por outro lado, nos biorreatores com *P. castanella* a temperatura do solo tendeu a aumentar logo nos primeiros 28 dias de incubação, e por essa razão, foi necessário aumentar o fluxo de ar uma vez que a temperatura ótima de crescimento dessa espécie é aproximadamente 25° C, diferente de *L. crinitus* que cresce em condições ótimas a aproximadamente 34° C. O controle da temperatura do processo de biorremediação é de extrema importância para regulação das temperaturas ótimas de crescimento dos microrganismos, a fim de se evitar diminuição do crescimento microbiano (Zilouei *et al.* 2006). A aeração do solo nos biorreatores foi calculada conforme Dupont *et al.* (1998) sendo que o ajuste mínimo do fluxo de ar (1,5 cm³ h⁻¹) fosse capaz de suprir a quantidade de ar necessária para oxigenação de toda a massa de solo. No entanto, segundo Heerenklage *et al.* (1998) é necessário combater a formação de caminhos preferenciais do fluxo de ar através da coluna de solo, o que é de ocorrência muito comum, formando regiões do solo com baixa oxigenação do solo, o que é prejudicial não só para o crescimento dos microrganismos, mas também para a natureza das reações de degradação dos organoclorados. No entanto, segundo esses autores, a formação de pressão interna em reatores de tratamentos de biorremediação pode dificultar a formação dos caminhos preferenciais no solo. No entanto, a estrutura das tampas seu fechamento nos biorreatores estudados aqui não permitia a formação de maior pressão interna.

As diminuições da concentração de carbono orgânico total (*COT*), nitrogênio (*N*) e aumento do fósforo (*P*) indicaram atividade microbiana no solo dos biorreatores. No entanto, não ficou evidenciada maior degradação do material orgânico no solo por *L. crinitus* em relação aos biorreatores controles, uma vez que as variações na concentração de carbono orgânico total e de nitrogênio nos biorreatores com esse fungo obedeceram os mesmos perfis e ordens de grandeza observados nos biorreatores controle. Já a degradação do material orgânico no solo dos biorreatores com *P. castanella* foi menor em relação à observada nos controles indicando menor desenvolvimento dessa espécie em relação aos microrganismos

presentes nos controles. É bem conhecido que os fungos desempenham importante papel na ciclagem de *P* no ambiente, disponibilizando fontes de fosfatos no solo (Wells *et al.* 1990, Van Hemme *et al.* 2003, Lima *et al.* 2003), e aqui, mais uma vez, ficou evidenciada maior ação metabólica nos biorreatores com *L. crinitus* e controles, uma vez que foi observado aumento na concentração de compostos fosfatados, o que não foi observado tão expressivamente nos biorreatores com *P. castanella*. Por outro lado, a capacidade de mobilização de fósforo no solo é uma característica específica (Lima *et al.* 2003), não indicando necessariamente baixo desenvolvimento de *P. castanella* no solo pela diminuição da biomassa viável.

As atividades das enzimas ligninolíticas no solo dos biorreatores com *Lentinus crinitus* e *P. castanella* foram bem menores às observadas por Matheus *et al.* (2003). A única diferença da condição de cultivo no presente estudo em relação ao estudo realizado por esses autores foi a presença dos organoclorados no solo. Embora se tenha observado crescimento de outros fungos no solo dos biorreatores controles, nesses não foram encontradas atividades de lacases e outras fenoloxidasas e nem de peroxidases dependentes do manganês.

Após a esterilização do solo não foi encontrada nenhuma colônia fúngica e nem bacteriana no solo dos biorreatores, evidenciando com isso a eficiência do procedimento de esterilização química do solo. Portanto, a introdução de outros microrganismos se deu pelo ar injetado nos biorreatores e quando os biorreatores eram abertos para retiradas das amostras.

As condições iniciais foram propícias para o crescimento dos basidiomicetos estudados, uma vez que a quantidade de inóculo das duas espécies foi equivalente a 10% da quantidade de solo tendo sido inoculada no solo em condição muito favorável para seu desenvolvimento, uma vez que a competição com outros microrganismos foi minimizada pela esterilização inicial do solo.

Pelo fato da quantificação dos microrganismos oportunistas ter sido realizada somente na amostragem inicial e após 224 dias de incubação, não foi possível observar a partir de

quando a quantidade desses microrganismos aumentou nos biorreatores. Entretanto, é possível observar que o perfil da degradação do material orgânico foi equivalente entre os biorreatores com *L. crinitus* e controles e, baseando-se também por outros parâmetros, o desenvolvimento desse fungo não parece ter superado os microrganismos oportunistas crescidos nos biorreatores controles. Já nos biorreatores com *P. castanella*, se observou menor degradação do material orgânico do solo em relação aos controles, observando as variações entre as concentrações dos macronutrientes e da umidade do solo. No entanto, é preciso considerar também que *P. castanella* foi inoculado no solo a partir de 85 dias após o início da experimentação dos biorreatores com *L. crinitus* e controles, embora tenha sido incubado também por 224 dias.

Foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar como substrato para produção de inóculo dos fungos estudados aqui por ser resíduo lignocelulósico prontamente disponível, produzido em larga escala no Brasil pela indústria sulcro-alcóoleira (Sparovek *et al.* 2001). No entanto, após a colonização sua colonização, foi necessário fragmentar o inóculo para incorporação no solo, o que promoveu perda de 70 % da viabilidade do inóculo das linhagens estudadas aqui (dados não publicados). Compart *et al.* (2007) verificaram que a proteção do inóculo de *P. castanella* CCB 444 em cápsulas cerâmicas reduziu as perdas de atividade enzimática de 88% para 5% em relação ao inóculo fragmentado não protegido. A destruição da massa micelial das espécies estudadas neste trabalho contribuiu enormemente para a menor desenvolvimento de *L. crinitus*, *P. castanella* e *T. villosa* em solo contaminado por organoclorados.

São muitas as evidências de que a imobilização do inóculo favorece o desenvolvimento dos fungos em substrato sólido. Por exemplo, a eficiência da imobilização do inóculo de *Trametes hirsuta* foi confirmada por Lamar & Scholze (1992) para a degradação de pentaclorofenol em resíduos de madeira. Segundo Lëstan & Lamar (1996) a suplementação de resíduo de madeira em forma de peletes para produção de inóculo de basidiomicetos imobilizado por alginato aumentou a eficiência da colonização favorecendo o

crescimento dos basidiomicetos avaliado por eles perante microbiota do solo. Concordando com esses dados Loomis *et al.* (1997) observaram que além de minimizar as perdas de viabilidade do inóculo pelo transporte e manipulação nas aplicações de biorremediação, a imobilização do micélio de *Phanerochaete chrisosporium* em alginato também pode favorecer a competitividade dessa espécie em processos de biorremediação de poluentes em solo. Bom desenvolvimento de *Trametes versicolor* na presença de organoclorados foi observado por Sedarati *et al.* (2003) quando o inóculo desse fungo foi imobilizado em malha de nylon. No entanto, todos estes agregados aumentam o custo do processo e devem ser minimizados ao máximo.

Utilizar maior quantidade de inóculo em processo de biorremediação de larga escala de solo não garante por si só boa colonização e desenvolvimento de basidiomicetos no solo, o que está diretamente relacionado com as condições de cultivo, principalmente nos primeiros dias de tratamento, quando os fungos estão ajustando seu metabolismo ao substrato que colonizam. Essa evidência foi muito bem ilustrada por Walter *et al.* (2005), que avaliaram a degradação de pentaclorofenol em reatores muito semelhantes aos biorreatores aqui estudados.

As condições de cultivo são determinantes para o bom desenvolvimento dos basidiomicetos e para produção e atividade das enzimas ligninolíticas e mediadores enzimáticos, como foi observado por Novotny *et al.* (2004) que observaram que a imobilização do inóculo basidiomicetos favoreceu a produção dessas enzimas, uma vez que os fungos exibiram bom desenvolvimento no solo.

O sucesso da degradação de xenobióticos por basidiomicetos está relacionado com o bom desenvolvimento fúngico e com as condições de cultivo no substrato que possam favorecer a produção e atividade de enzimas ligninolíticas, de mediadores enzimáticos e compostos de baixa massa molecular (Chung & Aust 1995, Jong & Field 1997, Pointing

2001, Hofrichter 2002, Arantes & Milagres 2007, Robles-Hernández *et al.* 2008, Asgher *et al.* 2008, Rigas *et al.* 2008, Mohammadi & Nasernejad 2009).

D'Annibale *et al.* (2005) descrevem excelentes taxas de degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos em solo envelhecido pela ação de *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus pulmonarius*. No entanto, esses autores descrevem bom desenvolvimento desses fungos no solo, apresentando boas taxas de crescimento e altas atividades enzimáticas, e chamam a atenção para o bom desenvolvimento dos fungos como condição fundamental para a tolerância à toxicidade do solo contaminado.

Bom desenvolvimento de *Trametes versicolor* foi observado por Walter *et al.* (2005) em solo contaminado por pentaclorofenol. Esses autores ainda observaram uma relação muito forte com os parâmetros de monitoramento e o desenvolvimento desse fungo no solo. A temperatura do solo foi adequada à temperatura ótima dos fungos durante todo o tratamento; observaram aumento da umidade do solo.

Melhor degradação de PCF em solo por *Phanerochaete chrysosporium* foi observada por Jiang *et al.*, (2006), que detectaram degradação de 100% de PCF em 60 dias de incubação na presença de outros microrganismos. Eles atribuíram às melhores taxas de degradação de PCF devido à imobilização do inóculo da linhagem de *P. chrysosporium* que melhorou muito sua colonização no solo.

Embora não tenha sido possível reproduzir as taxas de degradação de hexaclorobenzeno em solo por *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella*, descritos por Matheus *et al.* (2000), Matheus & Bononi (2002), Machado *et al.*, (2005b), Moreira-Neto (2006), Vitali *et al.* (2006), Ballaminut & Matheus (2007), foi possível observar que essas duas espécies foram capazes de alterar as concentrações de outros organoclorados no solo dos biorreatores.

As duas espécies estudadas aqui promoveram a completa remoção de hexaclorobutadieno (HCBU) no solo dos biorreatores. No solo dos biorreatores onde *L.*

crinitus foi incubado, a concentração desse clorado aumentou até 28 dias, e não foi mais detectado a partir dos 56 dias de incubação. Nos biorreatores com *Psilocybe castanella* a concentração de HCBU diminuiu a partir dos 14 dias de incubação até os 224 dias, quando as concentrações desse composto foram expressivamente menores que a concentração inicial. O aumento na concentração de HCBU aos 28 dias de incubação de *L. crinitus* indicou que esse composto é muito provavelmente produto da degradação de algum dos outros compostos clorados presentes no solo dos biorreatores. Porém, ainda não há evidências das vias de biodegradação desse composto por fungos basidiomicetos. No entanto, o aumento da concentração de compostos com menor quantidade de cloro em sua molécula pela biodegradação de outros organoclorados com maior complexidade química já vem sendo bem descrito na literatura (Fathepure & Vogel 1991, Field & Sierra-Alvarez 2008). É possível observar que os microrganismos presentes no solo dos biorreatores controles também promoveram diminuição da concentração de HCBU aos 224 dias de incubação. Entretanto, as variações da concentração desses compostos nos demais períodos amostrais tiveram perfil diferente aos observados nos biorreatores com *L. crinitus*. As concentrações iniciais de HCBU no solo dos biorreatores com *P. castanella* foi bem maior às observadas nos demais biorreatores, o que deve estar relacionado muito provavelmente com o tempo em que o solo ficou nos biorreatores aguardando a produção do inóculo de *P. castanella*. Isso pode indicar de certo modo que são contínuas as reações dos organoclorados mesmo em solo estocado, o que pode agravar a toxicidade do solo dificultando o crescimento da microbiota em processos de biorremediação do solo.

Também foi observada completa remoção de pentaclorofenol (PCF) no solo de todos os biorreatores. O perfil de degradação de pentaclorofenol entre os biorreatores com *L. crinitus* e controles foi muito semelhante com aumento da concentração de PCF até 28 dias e completa remoção aos 224 dias. Nos biorreatores com *P. castanella* PCF foi detectado na amostragem inicial e após sete dias de incubação. Devido à alta toxicidade e persistência de

PCF, a biodegradação desse poluente por fungos basidiomicetos vem sendo muito pesquisada nos últimos anos, obtendo-se excelentes resultados e demonstrando-se a alta eficiência dos basidiomicetos de podridão branca na remoção de PCF de diferentes substratos sólidos (Tuomela *et al.* 1999, McGrath & Singleton 2000, Kao *et al.* 2004, Machado *et al.* 2005b, Jiang *et al.* 2006, Ballaminut & Matheus 2007).

Durante as análises cromatográficas das amostras de solo dos biorreatores foi observada a presença de compostos clorados que não puderam ser identificados, os quais foram chamados aqui como Totais de Picos Não Identificados (TPNI). A seqüência variável de degradação de HCB se dá pela desalogenação da molécula formando pentaclorobenzeno, tetraclorobenzeno, triclorobenzenos e di- e monoclorobenzenos (Field & Sierra-Alvarez 2008). A partir dos 84 dias foi observada a formação dos TPNI nos biorreatores com *L. crinitus*, assim como no solo dos controles, os quais diminuíram até 224 dias. Por outro lado, a concentração inicial dos TPNI na primeira amostragem dos biorreatores com *P. castanella* foi expressivamente maior do que a observada nos demais biorreatores, corroborando a hipótese de que são frequentes as reações dos organoclorados no solo em repouso. No entanto, tais reações de degradação devem ser originadas dos demais organoclorados menos halogenados que o HCB pois, segundo Field & Sierra-Alvarez (2008), microrganismos autóctones foram capazes de degradar compostos clorados oriundos da degradação de HCB. Entretanto, Nakagawa & Andréa (2006) observaram que a microbiota autóctone do solo não foi capaz de degradar ¹⁴C-HCB em microcosmos, mesmo com adição de diferentes fontes de material orgânico. As condições de cultivo em maior escala de solo favoreceram o crescimento de microrganismos oportunistas provavelmente inseridos durante a aeração do solo, os quais puderam promover a degradação dos compostos clorados presente nos solos dos biorreatores.

O aumento da concentração de íons cloro a partir dos 56 dias nos biorreatores onde os fungos estudados foram incubados também deve ter sido em consequência das degradações de

outros compostos clorados, principalmente da degradação de hexaclorobutadieno e pentaclorofenol, além das variações na concentração dos isômeros de tetraclorobenzeno. Não se observou aumento na concentração de íons cloro nos biorreatores controles. No entanto, é evidente a atuação de outros microrganismos na degradação dos outros compostos clorados nesses biorreatores.

As variações da toxicidade aguda do solo dos biorreatores parece ter se correlacionado muito bem com as variações da concentração dos organoclorados que sofreram a ação biótica nos biorreatores. No mesmo período em que foram maiores as concentrações de tetraclobenzeno, hexaclorobutadieno assim como dos TPNI e dos íons cloro nos seis biorreatores, a toxicidade do solo também foi maior. Entretanto, o perfil da toxicidade do solo nos biorreatores com *L. crinitus* foi muito parecido ao observado nos biorreatores controle, o que é mais uma evidência do baixo desenvolvimento de *L. crinitus* no solo dos biorreatores.

A degradação de poluentes persistentes por consórcio de microrganismos vem sendo muito bem vista para aplicação em processos de biorremediação em larga escala (Schroll *et al.* 2004, Marzorati *et al.* 2005, Rein *et al.* 2007, Field & Sierra-Alvarez 2008), já que bactérias podem atuar nos produtos de degradação de compostos recalcitrantes resultantes da ação fúngica (Atagana *et al.* 2001, Di Toro *et al.* 2006, D'Annibale *et al.* 2006). Esse é um aspecto muito interessante para aplicação da biorremediação em escala industrial, quando é financeiramente inviável adotar métodos de esterilização de solo (Lamar & White 2001).

A ação de outros microrganismos no solo dos biorreatores controles foi muito evidente. Muito provavelmente deve ter havido uma interação entre a ação dos microrganismos oportunistas juntamente com *L. crinitus*. Entretanto, mesmo tendo sido pequena, a degradação de hexaclorobutadieno ocorrida nos biorreatores com *L. crinitus* evidencia o desenvolvimento desse fungo.

A associação de tratamentos físicos e químicos vem sendo estudada para desalogenação de poluentes químicos halogenados (Chang *et al.* 1998, Kaštánek & Kaštánek

2005, Kulik *et al* 2006, Salvi 2008). No presente trabalho também foi avaliada a associação do tratamento químico do solo para desalogenação dos compostos clorados com a biorremediação dos solos pelo fungo *Trametes villosa*, e verificou-se o prévio tratamento químico de desalogenação promoveu diminuição significativa na concentração de hexaclorobenzeno (HCB) e pentaclorobenzeno (PeCB) no solo, mas resultando principalmente na formação de dois novos produtos, tetraclorodietoxibenzeno e triclorotrietoxibenzeno, os quais promoveram aumento da toxicidade aguda do solo. A formação de radicais etóxi se deu pela utilização de etanol nas reações de oxidação do HCB. Tais reações consistiram na quebra dos átomos de cloro do HCB pelas moléculas de NaOH, resultando possivelmente em um glicol éter e/ou um composto hidroxilado, além de um sal de metal alcalino, os quais são muito solúveis em água (Arruda 2005). O objetivo da utilização do etanol como reagente foi para diminuir a quantidade de polietilenoglicol-400 (PEG-400) a ser usada, a fim de adequar os custos do tratamento, visando uma aplicação em escala industrial (De Nadai, *dados não publicados*). Entretanto, a utilização do etanol nas reações proporcionou a formação de compostos com radicais etoxi (C₂H₅O).

Devido à maior toxicidade do solo pela formação dos compostos etoxi-clorados e do sal, Silva & Matheus (*dados não publicados*) avaliaram que a mistura do solo submetido à tratamento de desalogenação química com igual proporção de solo sem contaminação seria necessária a fim de minimizar os efeitos tóxicos do solo para melhor desenvolvimento de *Trametes villosa*.

A formação do tetracloroetoxibenzeno se deu provavelmente pela substituição do primeiro e quarto átomos de cloro por dois radicais etoxi, como foi discutido por Salvi (2008). Entretanto, a autora realizou os testes de degradação e mineralização de ¹⁴C-HCB em microcosmos de apenas 30g de solo.

As porcentagens de redução de HCB pelo tratamento químico do solo obtidas aqui foram equivalentes às obtidas por Salvi (2008). No entanto, após o tratamento biológico do

solo nos biorreatores com *T. villosa* não foram observadas reduções significativas na concentração do HCB residual após 224 dias de incubação.

Ao que parece, o desenvolvimento de *Trametes villosa* no solo dos biorreatores não foi satisfatório. As quantidades de ergosterol detectadas no solo dos biorreatores com esse fungo foram menores das encontradas no solo dos biorreatores controles, tendo sido observado o inverso a partir dos 84 dias de incubação, até quando foi possível recuperar o basidiomicetos em apenas uma das amostras de um biorreator. A umidade do solo nos biorreatores diminuiu até 84 dias, quando foi necessária a correção da umidade do solo dos biorreatores com *T. villosa*. Nesse mesmo período a umidade do solo nos biorreatores controles não foi menor à determinada inicialmente não sendo necessária a correção.

O pH do solo diminuiu drasticamente após a inoculação de *T. villosa* no solo, o que pode estar associado à presença de ácidos orgânicos do inóculo fúngico que foram incubados por 21 dias. A partir de então o pH não variou significativamente durante o período experimental, exceto entre 7 e 28 dias de incubação, quando foram pouco maiores que o pH inicial posterior a inoculação. O pH do solo tratado quimicamente nos biorreatores controles diminuiu significativamente até 224 dias. Entretanto, é necessário salientar que o pH inicial do solo nos biorreatores com *T. villosa* foram bem menores que o observado nos controles. Porém, o pH inicial no solo dos biorreatores com *T. villosa* foi superior ao pH ótimo para atividade ligninolítica de basidiomicetos, conforme descrito por Yamanaka *et al.* (2008).

As temperaturas do solo nos biorreatores com *T. villosa* foram maiores em relação aos biorreatores controles entre os 28 e 84 dias de incubação. No entanto, foi necessário ajustar o fluxo de ar para diminuir a temperatura do solo desses biorreatores para próxima à temperatura ótima de *T. villosa*, principalmente após a correção da umidade do solo nos biorreatores com esse fungo.

Não foi observada diferença entre a degradação do material orgânico do solo entre os biorreatores com *T. villosa* e os controles. As atividades de lacases e outras fenoloxidasas

foram menos intensas do que as apresentadas por outros basidiomicetos (Matheus *et al.* 2003) em solo sem contaminação. Por outro lado, foi detectada atividade de peroxidases dependentes do manganês no solo dos biorreatores com *T. villosa*, embora tais atividades tinham sido muito baixas em relação às apresentadas por esse fungo em outras condições de cultivo (Yamanaka *et al.* 2008).

Efeito muito significativo na diminuição da toxicidade aguda do solo foi observado logo após a inoculação de *Trametes villosa*, o mesmo efeito não sendo observado nos biorreatores controles. Esse efeito pode estar relacionado a adsorção dos compostos clorados no material orgânico inserido no solo, ou às mudanças físico-químicas do solo provocada pelos metabólitos presentes no inóculo colonizados por 21 dias pelo *T. villosa*.

Embora não se tenham observado diminuições significativas na concentração de HCB e PeCB no solo dos biorreatores, a concentração dos outros organoclorados sofreu ação biótica tanto nos biorreatores com *T. villosa* quanto nos biorreatores controles durante o período experimental. Foi observada a formação dos isômeros de tetraclorobenzeno aos 14 e 28 dias de tratamento nos quatro biorreatores estudados, os quais não desapareceram entre 56 e 224 dias. A partir dos 14 dias de incubação, foi observado aumento expressivo da concentração de tetraclorodietoxibenzeno nos quatro biorreatores, diminuindo significativamente a partir de então até os 224 dias de incubação nos quatro biorreatores. Também houve expressiva formação de triclorodietoxibenzeno nos quatro biorreatores estudados, não havendo distinção do perfil da concentração desse composto entre eles.

Mais uma vez ficou evidenciada a eficiência dos basidiomicetos na remoção de hexaclorobutadieno, uma vez que houve a expressiva formação desse composto aos 56 dias de incubação e sua total remoção nos dois biorreatores com essa espécie a partir do 112 dias de incubação. Por outro lado, foi observada a formação de hexaclorobutadieno em menor concentração nos biorreatores controles, não sendo mais detectado aos 224 dias de incubação. A formação de pentacloroanizol se deve à degradação de pentaclorofenol (Machado *et al.*

2005b), ou pela metilação de um benzeno pentaclorado (Salvi 2008) como aconteceu após o tratamento químico no solo. Entretanto, esse composto não foi mais detectado nos biorreatores a partir dos 14 dias de incubação. Walter *et al.* (2005) relatam que pentacloroanizol pode não ser um subproduto da biodegradação de pentaclorofenol, uma vez que eles não detectaram a formação desse composto pela degradação de pentaclorofenol por *Trametes versicolor*, o que também já foi confirmado em outras ocasiões (Tuomela *et al.* 1999, Ullah *et al.* 2000, Walter *et al.* 2004).

A concentração dos TPNI aumentou no solo dos biorreatores no mesmo período em que foram observadas as reduções da concentração de hexaclorobutadieno e de tetraclorobenzeno, não tendo sido observadas diferenças significativas entre os biorreatores com o fungo utilizado estudados e os controles. Ao contrário do esperado, a concentração de íons cloreto no solo dos biorreatores com *T. villosa* diminuiu aos 224 dias de incubação, não sendo observado mesmo efeito nos controles.

Foi utilizado óleo vegetal no sistema de cultivo para melhorar as taxas de degradação dos organoclorados e a atividade enzimática no solo. A presença de óleo vegetal no cultivo de basidiomicetos pode alterar a composição fosfolipídica da membrana celular de células fúngicas, aumentando sua permeabilidade e facilitando as trocas entre a célula e o meio externo e, conseqüentemente, a ação das enzimas ligninolíticas secretadas pelos basidiomicetos (Asther *et al.* 1988, Lęstan *et al.* 1990, Lęstan & Lamar 1996). Segundo Matheus & Bononi (2002) a adição de óleo vegetal (5% da quantidade de solo) melhorou as taxas de degradação de organoclorados, assim como a atividade de enzimas ligninolíticas, e atribuem tais benefícios à presença de ácidos graxos insaturados presentes no óleo vegetal utilizado por eles. Segundo esses autores o óleo vegetal pode favorecer as reações de peroxidação lipídica, além de poder alterar a permeabilidade da membrana plasmática de fungos, e que essas são características de cada espécie. Além disso, a presença de óleo vegetal no sistema de cultivo pode aumentar a solubilidade dos compostos clorados no solo (Bogan &

Lamar 2000), facilitando de certa forma a ligação desses compostos ao material orgânico incorporado ao solo no processo de biorremediação (Matheus 2003).

As reações de ligações das partículas de solo com compostos podem dificultar a ação metabólica dos microrganismos na biodegradação de poluentes (D'Annibale *et al.* 2005). O solo estudado aqui foi acondicionado em “*Big Bags*” em área construída para contenção de solo contaminado por organoclorados – “Estação de Espera” – desde meados da década de 80, portanto, por mais de 20 anos. O tempo em que os contaminantes permaneceram no solo utilizado no presente estudo, muito provavelmente, contribuiu para que não houvesse redução na concentração de HCB pela ação dos fungos estudados aqui. A aplicação de processos de biorremediação de resíduos de combustíveis e óleo vem sortindo bons resultados, principalmente com aplicação de técnicas de compostagem e consórcio de microrganismos com ou sem suplementação no solo (Jorgensen *et al.* 2000, Namkoong *et al.* 2001, Gallego *et al.* 2007). A degradação de cerca de 70% de resíduos de óleo mineral utilizado como lubrificantes de máquinas e de diesel combustível foi observada por Jorgensen *et al.* (2000), quando realizaram a suplementação sem a inoculação de microrganismos, apenas ativando a microbiota autóctone. Gallego *et al.* (2007) também obtiveram bons resultados utilizando consórcio de espécies de bactérias e leveduras para a degradação de resíduos de hidrocarbonetos de fundo de tanque de refinaria de petróleo. Entretanto, resíduos de organohalogenados são extremamente recalcitrantes no meio ambiente, e por essa razão, exigem estudos mais aprofundados para aplicação de técnicas de remediação dos substratos onde estão presentes (Alexander 1999).

Apesar de serem muitas as evidências verificadas em laboratório da capacidade dos basidiomicetos em degradar poluentes orgânicos persistentes (Aust 1990, Sander *et al.* 1991, Okeke *et al.* 1997, Matheus *et al.* 2000, Matheus 2003, Machado *et al.* 2005, Hirano *et al.* 2007, Asgher *et al.* 2008, Rigas *et al.* 2008), mudanças na escala de estudos de biorremediação requerem cuidadoso estudo para adaptação dos microrganismos em maiores

quantidades de solo, visando a melhor técnica de biorremediação a ser aplicada, seleção de microrganismos capazes de promover redução dos contaminantes (caso seja determinada a bioaugmentação) e as melhores condições de cultivo desses microrganismos (Alexander 1999, Dupont *et al.* 1998). Entretanto, como descrito por Lamar & White (2001), um número pequeno de trabalhos avalia a eficiência da biorremediação de solo contaminado com poluentes orgânicos persistentes em maiores escalas de tratamento, provavelmente porque é necessário maior investimento e mão de obra para aplicação dos conceitos obtidos em laboratório em uma maior escala, principalmente no que se refere ao crescimento dos microrganismos no solo e a avaliação do processo de degradação dos poluentes por tempo maior que um ano. Segundo eles, maior empenho das indústrias e interesse dos governos em financiar e acompanhar todo o processo de desenvolvimento da técnica de biorremediação poderia ajudar grandemente a evidenciar maior sucesso da aplicação dessa técnica em maior escala de tratamento.

A mistura dos organoclorados no solo estudado aqui foi um dos fatores que dificultou a bioremediação do solo, uma vez que cada uma das substâncias pode ter influenciado diferentemente o desenvolvimento dos fungos. Lamar & Dietrich (1990) constataram cerca de 80% de degradação de pentaclorofenol por linhagens de *Phanerochaete* em larga escala de solo.

Durante o desenvolvimento do presente projeto constatou-se que a fragmentação do inóculo fúngico antes de sua incorporação no solo, a fim de facilitar sua homogeneização, prejudicou a viabilidade do fungo nos estágios iniciais de desenvolvimento. Esse prejuízo associado à presença de organoclorados no solo, dificultou a colonização inicial dos fungos, principalmente de *T. villosa* em solo submetido a prévio tratamento químico de oxidação de HCB no solo.

Lamar *et al.* (1994) avaliaram a biorremediação *ex-situ* de grandes quantidades de solo contaminados com pentaclorofenol por *Phanerochaete sordida* e recomendaram a

biorremediação desses solos desde que sejam estudadas a otimização para a produção do inóculo, a fim melhorar a colonização inicial desse basidiomiceto no solo. A aplicação da micorremediação também foi avaliada por Holroyd & Caunt (1995) que observaram o bom desempenho de *Phanerochaete chrysosporium* em larga escala de solo contaminado por clorofenóis. Segundo esses autores, esse fungo foi avaliado em laboratório e depois aplicado em escala de campo (6000 m³ de solo contaminado) e mostrou capacidade em reduzir em 80% a concentração dos clorofenóis em solo. Mas, os autores relatam que foram necessários estudos para adequar as condições de crescimento do fungo em grandes quantidades de solo com esses poluentes, principalmente na melhoria da produção de inóculo para aplicação em campo.

As condições de cultivo de *Trametes versicolor* para biorremediação de solo contaminado por pentaclorofenol aplicada por Walter *et al.* (2005) foram muito semelhantes às empregadas aqui. No entanto, eles descrevem boa colonização do basidiomiceto no solo imobilizado em substrato com formulação diferente à utilizada aqui.

É importante salientar que a maior parte dos trabalhos de biorremediação de solo descrevem concentrações de organoclorados muito inferiores às que estão presente no solo estudado aqui. Segundo Boopathy (2000), a concentração dos poluentes é um dos fatores que devem ser avaliados na decisão das técnicas de biorremediação a serem aplicadas. É de fundamental importância a determinação da concentração máxima dos poluentes tolerada pelos microrganismos utilizados em biorremediação de solo (Dupont *et al.* 1998, Alexander 1999, Field & Sierra-Alvarez 2008). As três espécies aqui estudadas toleraram concentrações superiores de hexaclorobenzeno em relação às estudadas aqui (Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005b); no entanto, não se tem conhecimento de estudos que avaliem a degradação desse poluente em solo com concentrações equivalentes às aqui estudadas.

Lamar & White (2001) chamam atenção para a necessidade de estudos visando a otimização da biorremediação de solo em maior escala, principalmente no que diz respeito à

produção de inóculo e aeração do solo. Além disso, eles também evidenciam a necessidade de se empregar técnicas para reintrodução de nutrientes ajustando a relação C:N do solo para os níveis ideais para um melhor desempenho dos fungos. Entretanto, eles indicam a necessidade de mais estudos para avaliar tais aspectos em longos períodos de experimentação, o que muitas vezes não é compreendido por órgãos de fomento à pesquisa e por indústrias patrocinadoras, que buscam por resultados rápidos ou com grande impacto quanto às reduções de contaminantes. O presente trabalho evidenciou a necessidade em se estudar a degradação de organoclorados por tempo superior a 60 dias, uma vez que nesse período foram observadas reduções da concentração de HCB no solo dos biorreatores onde foram incubados *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella*. Entretanto, após 224 dias a concentração desse organoclorado não diferiu em relação à concentração determinada inicialmente. Isso porque aos 56 dias muito provavelmente pode ter ocorrido adsorção dos compostos clorados à matriz sólida do solo e posteriormente, esses compostos terem se despreendido do solo, muito provavelmente pela ação de outros microrganismos.

Também ficou evidenciado no presente estudo que a presença de outros microrganismos concomitantemente com o crescimento dos basidiomicetos estudados pode ser um aspecto positivo para a biorremediação de solo contaminado por organoclorados, desde que esses não dificultem a colonização inicial dos basidiomicetos aplicados ao solo. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar a colonização dos basidiomicetos aqui estudados em solo contaminado com organoclorados não esterilizados quimicamente, o que seria muito vantajoso para aplicação da biorremediação do solo estudado aqui em escala industrial.

Estudos em laboratório vêm sendo realizados para adequar a formulação de substrato a base de bagaço de cana-de-açúcar em forma de peletes para produção de inóculo, considerando os aspectos descritos por Balaminit & Matheus (2007) para adequação das condições de cultivo dos fungos estudados aqui. A utilização de uma escala intermediária

entre a utilizada aqui e a de microcosmos poderia facilitar o desenvolvimento das condições de cultivo para aplicação do inóculo, reproduzindo as taxas de degradação de hexaclorobenzeno obtidas em estudos laboratoriais pelos basidiomicetos estudados aqui.

6. Conclusões gerais

- As espécies *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella* promoveram reduções significativas na concentração de hexaclorobutadieno, dos isômeros de tetraclorobenzeno, pentaclorofenol e de outros compostos clorados não identificados, concordando com o aumento na quantidade de cloretos nos bioreatores desses fungos;
- Mesmo tendo sido observada redução de mais de 80% na concentração de HCB, o prévio tratamento químico do solo para oxidação de HCB não se mostrou uma técnica viável, uma vez que resultou na formação de outros compostos mais tóxicos no solo e tornando o processo mais caro, o que é indesejável para a aplicação da aplicação em maior escala de solo.
- As condições de cultivo não foram satisfatórias para o desenvolvimento de *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella* em solo contaminado por HCB e nem para o desenvolvimento de *Trametes villosa* no solo submetido à prévio tratamento químico de desalogenação, apesar dos mesmos terem bom desenvolvimento em biorreatores com solos não contaminados.
- A formação de compostos etóxi, detectados a partir da oxidação química do HCB no solo, contribuiu para que a toxicidade aguda do solo aumentasse, embora ela tenha diminuído drasticamente após a inoculação de *Trametes villosa* no solo. Entretanto, tais compostos etoxi formados durante o tratamento químico do solo pareceram ser muito persistentes durante os 224 dias;
- A formulação de substrato lignocelulósico em forma de peletes para imobilização de *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella* pode ser uma alternativa para garantir a viabilidade do inóculo fúngico, proporcionando maior proteção ao inóculo durante o período de aclimação, tornando os fungos mais competitivos perante a microbiota autóctone e menos suscetíveis à ação tóxica dos compostos clorados no solo.

- O crescimento de fungos e bactérias oportunistas durante o tratamento de micorremediação por basidiomicetos pode contribuir para a biodegradação de organoclorados desde que os organismos oportunistas não sejam mais competitivos que os basidiomicetos.
- A oxigenação do solo é parâmetro que deve ser monitorado a fim de identificar regiões com baixa disponibilidade de oxigênio devido a formação de caminhos preferenciais do fluxo de ar. Uma alternativa para a formação desses caminhos preferenciais é o aumento da pressão interna em biorreatores.
- Contudo, estudos são necessários para melhorar as condições de cultivo de *Lentinus crinitos* e *Psilocybe castanella* em “scale up” de processos de biorremediação de solo nos biorreatores estudados aqui, favorecendo assim a reprodução das taxas de degradação de hexaclorobezeno e outros organoclorados observadas em microcosmos.
- Todos os parâmetros utilizados para monitorar o processo de biorremediação mostraram-se extremamente adequados para avaliação do processo.

7. Referências bibliográficas

- Ahtiainen, J., Valo, R., JaK rvinen, M., Joutti, A.** 2002. Microbial toxicity tests and chemical analysis as monitoring parameters at composting of creosote-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53: 323-329.
- Aiken, B.S. & Logan, B.E.** 1996. Degradation of pentachloophenol by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown in ammonium lignosulphonate media. *Biodegradation*. 7: 175-182.
- Alexander, M.** Biodegradation and Bioremediation. New York: Ed. Academic Press, 1999. 453p.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W, Blackwell, M.** 1996. *Introductory Mycology*. 4^a ed. NewYork: John Wiley e Sons.
- Almeida, F.V., Caetano, A.J., Bisinoti, M.C., Jardim, W.F.** 2007. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. *Química Nova*, 30 (8): 1976-1985.
- Arantes, V., Milagres, A.M.F.** 2007. The effect of a catecholate chelator as a redox agent in Fenton-based reactions on degradation of lignin-model substrates and on COD removal from effluent of an ECF kraf pulp mill. *Journal of Hazardous Materials* 141: 273-279.
- Arruda, T. L.** 2005. Uso de processos oxidativas avançados e ferro elementar na remediação de água subterrânea contendo compostos organoclorados. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 172p. *apud* Salvi, M.B. 2008. Degradação química e biológica de 14CHexaclorobenzeno por polietilenoglicol/hidróxido de sódio e *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 150p.

- Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M., Legge, R.L.** 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. Biodegradation.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas - NBR 12713.** 2004. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustácea).
- Asther, M., Lesage, L., Drapron, R., Corrieu, G., Odier, E.** 1988. Phospholipid and fatty acid enrichment of *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 in relation to ligninase production. Applied Microbiology and Biotechnology, v.27, p.393-398.
- Atagana, H.I., Haynes, R.J., Wallis, F.M.** 2006. Fungal bioremediation of creosote-contaminated soil: A laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. Water, Air, and Soil Pollution 172: 201–219.
- Atterby, H., Smith, N., Chaudhry, Q., Stead, D.** 2002. Exploiting microbes and plants to clean up pesticide contaminated environments. Pesticide Outlook, February, 9-13.
- Aust, S.D.** 1990. Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. Microbial Ecology 20 (1): 197-209.
- Ballaminut, N.** 2007. Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB 274 empregado em biorremediação de solo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 150p.
- Ballaminut, N., & Matheus, D. R.** 2007. Characterization of fungal inoculum used in soil remediation. Brazilian Journal of Microbiology 38: 248-252.
- Barajas-Aceves, M., Hassan, M., Yinoco, R., Vazquez-Duhalt, R.** 2002. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. Journal of Microbiological Methods 50: 227-236.

- Barbeau, C., Deschenes, L., Karamanev, D., Comeau, Y., Samson, R.** 1997. Bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 745-752.
- Barber, J.L., Sweetman, A.J., van Wijk, D., Jones, K.C.** 2005. Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes. *Science of the Total Environment* 349: 1-44.
- Barr, D. P. & Aust, S. D.** 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology* 28 (2): 78-87.
- Behalová, B., Bláhová, M., Behal, V.** 1994. Regulation of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiologica* 39: 4 287-290.
- Bernardes Jr, C. & Cleary, W.R.** 1987. Contaminação de águas subterrâneas por poluentes orgânicos tóxicos e cancerígenos – um estudo de caso. São Paulo: CETESB, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, 10p.
- Bogan, B.W. & Lamar, R.T.** 1996. One-Electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (7): 2631- 2635.
- Booker, R.S., Pavlostathis, S.G.** 2000. Microbial reductive dechlorination of hexachloro-1,3-butadiene in a methanogenic enrichment culture. *Water Research* 34: (18) 4437–4445.
- Boopathy, R.** 2000. Review: Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 74: 63-67.
- Bourbonnais, R. & Paice, M.G.** 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*. 267: 99-102.

- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E. & Bornemann, S.** 1996. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4627-4632.
- Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D., Aust, S.D.** 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by white-rot fungus. *Science* 228 (4706): 1434-1436.
- Bumpus, J.A. & Aust, S.D.** 1987. Biodegradation of chlorinated organic compounds by *Phanerochaete chrysosporium*, a wood-rotting fungus. *In: Exner, J.H. (Ed.). Solvent Hazardous waste problems: learning from dioxins.* Washington DC: American Chemistry Society 340-349.
- Caesar-TonThat, T.C., Cochran, V.L.** 2001. Role of a saprophytic basidiomycete soil fungus in aggregate stabilization. *In: Stott, D.E., Mahtar, R.H., Steinhardt, G.C.* 1999. *Suitaining the Global Farm.* 10th International Soil Conservation Organization Meeting held. France, Purdue University and the USDA-ARS National Soil Erosion Research Laboratory.
- Camarero, S., Ruiz-Duenas, F.J., Sarkar, S., Martinez, M.J., Martinez, A.T.** 2000. The cloning of a new peroxidase found in lignocellulose cultures of *Pleurotus eryngii* and sequence comparison with other fungal peroxidases. *FEMS Microbiology Letters*. 191: 37-43. *apud* Moreira-Neto, S. L. 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.
- Cerezine, P.C., Nahas, E., Banzatto, D.A.** 1988. Soluble phosphate accumulation by *Aspergillus niger* from fluorapatite. *Applied Microbiology Biotechnology* 29: 501-505.
- Chang, B.V., Su, C., Yuan, S.Y.** 1998. Microbial hexachlorobenzene dechlorination under three reducing conditions. *Chemosphere* 36: (13) 2721-2730.

- Chu, W., Hunt, J. R. & Jafvert, C. T.** 2002. Modeling the sequential photodechlorination of hexachlorobenzene in surfactant micelles. *Water Research* 36: 843-850.
- Chung, N. & Aust, S.D.** 1995. Degradation of pentachlorophenol in soil by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials* 41: 177-183.
- Coelho, G.D.** 2007. Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB 444 durante o crescimento em solo. Tese de doutorado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.
- Compart, L. C. A., Machado, K. M. G., Matheus, D. R. & Cardoso, A. V.** 2007. Immobilization of *Psilocybe castanella* on ceramic (slate) supports and its potential for soil bioremediation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23 (10): 1479-1483.
- Corden, C, Kakareka, S, Weem,** 2006. A.P. Track B Review for the UNECE LRTAP Task Force on Persistent Organic Pollutants.
- D'Annibale, A., Ricci, M., Leonardi, V., Quarantino, D., Mincione, E., Petruccioli, M.** 2005. Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. *Biotechnology and Bioengineering* 90: 6 723-731.
- D'Annibale, A., Rosetto, F., Leonardi, V., Federici, F., Petruccioli, M.** 2006. Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 72:1 28-36.
- Dagley, S.** 1978. Microbial catabolism, the carbon cycle and environmental pollution. *Naturwissenschaften* 65: 85-95. *apud* Matheus, D.R. 1998. Biorremediação de solos contaminados com compostos orgânicos e biodegradação de hexaclorobenzeno por basidiomicetos brasileiros. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista-UNESP, Rio Claro, 166p.

- Davis, M.W. & Lamar, R.T.** 1992. Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass. *Soil Biology & Biochemistry* 24 (3): 189-198.
- Davis, M.W., Glaser, J.A., Evans, J.W., Lamar, R.T.** 1993. Field Evaluation of Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete sordida* to treat Creosote-Contaminated Soil. *Environmental Science Technology* 54: (6) 1207-1217.
- Di Toro, S., Zanaroli, G., Fava, F.** 2006. Intensification of the aerobic bioremediation of an actual site soil historically contaminated by polychlorinated biphenyls (PCBs) through bioaugmentation with a non acclimated, complex source of microorganisms. *Microbial Cell Factories* 5: (11) 1-10.
- Durán, N. & Esposito, E.** 1997. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. *In: Melo, I. S., Azevedo, J. L. (Eds), Microbiologia Ambiental. Embrapa/CNPMA, , p.292.*
- Dupont, R.R., Bruell, C.J., Marley, M.C., Downey, D.C., Norris, R.D., Hulling, S.G. & Pivets, B.** 1998. Bioremediation. Annapolis: American Academy of Environmental Engineers and USEPA. 596p.
- Eggen, T. & Sveum, P.** 2001. DDT degradation by chemical oxidation and white rot fungi. *In: Ex situ biological treatment technologies. Magar, V.S., von Fahnestock, F.M., Leeson, A. (eds.). Columbus: Battelle Press 157-164.*
- Fathpure, B.Z. & Vogel, T.M.** 1991. Complete degradation of polychlorinated hydrocarbons by two-stage biofilm reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (12): 3418-3422.
- Field, J.A. & Sierra-Alvarez, R.** 2008. Microbial degradation of chlorinated benzenes. *Biodegradation* 19: 463-480.

- Field, J.A.** 2001. Review of scientific literature on microbial dechlorination and chlorination of key chlorinated compounds. Department of Chemical & Environmental Engineering University of Arizona, 37p.
- Gallego, J.L.R., García-Martínez, M.J., Llamas, J.F., Belloch, C., Peláez, A.I., Sánchez, J.** 2007. Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia. *Biodegradation* 18: 269–281.
- Gallaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B. & Haltrich, D.** 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 529-536.
- Guerin, T.F.** 2008. Ex-situ bioremediation of chlorobenzenes in soil. *Journal of Hazardous Materials* 154: 9-20.
- Hammel, K.E., Kapich, A.N., Jensen Jr., K.A., Ryan, Z.C.** 2002. Reactive oxygen as agents of wood decay by fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, v.30, p.445-453.
- Hatakka, A.** 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 125-135.
- Heerenklage, H.,K., Woyczehowski, H., Bollow, S., Stegmann, R.** 1998. Influence of oxygen on the degradation of Diesel Fuel in Soil Bioreactors. *Acta Biotechnology* 2: 109-122.
- Herculano, S.** 2002. Exposição a riscos químicos e desigualdade social: o caso do HCH (hexaclorociclohexano) na Cidade dos Meninos, RJ. *Revista de Desenvolvimento e Meio Ambiente: riscos coletivos – ambiente e saúde* 5: 61-71.
- Higuchi, T.** 2004. Biosynthesis and biodegradation of wood components. San Diego: Academic Press,. cap.21, p.579-605. *apud* Matheus, D. R. 2003. Otimização da

biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.

Hirano, T., Ishida, T., Oh, K. & Sudo, R. 2007. Biodegradation of chlordane and hexachlorobenzene in river sediment. *Chemosphere* 67: 428-434.

Hofrichter M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 454-466.

Holroyd, M.L. & Caunt, P. 1995. Large-scale soil bioremediation using white-rot fungi. *In: Bioaugmentation for Site Remediation*. Hinchee, R., Fredrickson, J., Alleman, B.C. (eds.). Columbus: Battelle Press 181-187.

Itoh, K., Fujita, M., Kumano, K., Suyama, K., Yamamoto, H. 2000. Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 85-91.

Jacques, R.J.S., Bento, F.M., Antonioli, Z.I., Camargo, F.A.O. 2007. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural* 37: (4) 1192-1201.

Jarosz-Wilkoazka, A. & Graz, M. 2006. Organic acids production by white rot Basidiomycetes in the presence of metallic oxides. *Canadian Journal Microbiology* 52: 779-785.

Jiang, X., Zeng, G., Huang, D., Chen, Y., Liu, F., Huang, G., Li, J., Xi, B. Liu, H. 2006. Remediation of pentachlorophenol-contaminated soil by composting with immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22: 909-913.

- Jong, E. & Field, J.A.** 1997. Sulfur tuft and turkey tail: Biosynthesis and biodegradation of organohalogens by basidiomycetes. *Annual Review Microbiology* 51: 375-414.
- Jørgensen, K.S., Puustinen, J., Suortti, A.-M.** 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution* 107: 245-254.
- Kao, C.M., Chai, C.T., Liu, J.K., Yeh, T.Y., Chea, K.F., Chen, S.C.** 2004. Evaluation of natural and enhanced PCP biodegradation at a former pesticide manufacturing plant. *Water Research* 38: 663–672.
- Kaštánek, F. & Kaštánek, P.** 2005. Combined decontamination processes for wastes containing PCBs. *Journal of Hazardous Materials B117*: 185-205.
- Kiehl, E. J.** 1985. *Fertilizantes orgânicos*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 492p.
- Kirk, T.K., Schultz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F. & Zeikus, J.G.** 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*. 117: 277-285.
- Kirk, T. K. & Farrell, R. L.** 1987. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41: 465-505.
- Kirk, T.K. & Shimada, M.** 1985. Lignin biodegradation: The microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi. *In*: Higuchi, T. (Ed.). *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. San Diego: Academic Press., cap.21, p.579-605. *apud* Matheus, D. R. 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.

- Kulik, N., Goi, A., Trapido, M., Tuhkanen, T.** 2006. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *Journal of Environmental Management* 78: 382-391.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A.** 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*. 169: 247-250.
- Lamar, R.T. & Dietrich, D.M.** 1990. In situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 3093-3100.
- Lamar, R.T. & Scholze, R.J.** 1992. White-rot fungi biodegradation of PCP-treated ammunition boxes. *In: Proceedings of R&D 92 National research & development conference on the control of hazardous materials, San Francisco – California.*
- Lamar, R.T. Davis, M.W, Dietrich, D.M., Glaser, J.A.** 1994. Treatment of a pentachlorophenol and creosote contaminated soil using the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida*: A Field demonstration. *Soil Biology Biochemistry* 26: (12) 1603-1611.
- Lamar, R.T. & White, R.B.** 2001. Mycoremediation – Commercial status and recent developments. *In: Magar, V.S., von Fahnestock, F.M., Leeson, A. (Eds). Ex Situ Biological Treatment Technologies. Columbus: Battelle Press* 157-164.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtás-Wasilewska, M., Cho, N. & Hofrichter, M.** 1999. Review: Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27:175-185.

- Leštan, D., Strancar, A. & Perdih, A.** 1990. Influence of some oils and surfactants on ligninolytic activity, growth and lipid fatty acids of *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology and Biotechnology 34: 426-428.
- Leštan, D., Lamar, R.T.** 1996. Development of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. Applied Environmental Microbiology 62:(6) 2045-2052.
- Li, MT., Hao, L.L., Sheng, L.X., Xu, J.B.** 2008. Identification and degradation characterization of hexachlorobutadiene degrading strain *Serratia marcescens* HL1. Bioresource Technology 99: 6878-6884.
- Lima, M.A.B., Nascimento, A.E., Souza, W., Fukushima, K., Campos-Takaki, G.M.** 2003. Effects of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. Brazilian Journal of Microbiology 34: 363-372.
- Litchfield, C.** 2005. Thirty years and counting: bioremediation in its prime?. BioScience 55 (3): 273- 279.
- Loomis, A.K., Childress, A.M., Daigle, D., Bennett, J.W.** 1997. Alginate encapsulation of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Current Microbiology 34: 127–130.
- Lopes, A.P.M.** 2003. Impactos ambientais causados pelas indústrias na década de 80 até os dias atuais na cidade de Cuatão. Monografia (Especialização). Universidade Estadual Paulista, São Vicente, 60p.
- Ma, X., Zheng, M., Liu, W., Qian, Y., Zhao, X. & Zhang, B.** 2005. Synergic effect of calcium oxide and iron (III) oxide on the dechlorination of hexachlorobenzene. Chemosphere 60: 796-801.

- Machado, K.M.G.** 1998. Biodegradação de pentaclofenol por fungos basidiomicetos lignocelulolíticos em solo contaminado com resíduos industriais. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 172 p.
- Machado, C.F.** 2003. Influência do nitrogênio e do óleo de soja na atividade ligninolítica de *Trametes villosa* e *Psilocybe castanella*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 172 p.
- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R., Bononi, V. L. R.** 2005a. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* 36: 246-252.
- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R., Bononi, V. L. R.** 2005b. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 297-301.
- Marsolek, M.D., Jo Kirisits, M., Rittmann, B.E.** 2007. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenol by aerobic microbial communities: biorecalcitrance, inhibition, and adaptation. *Biodegradation* 18: 351–358.
- Martin, J.P.** 1950. Use of rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science* 69: 215-232.
- Martínez, A.T.** 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 425-444. *apud* Moreira-Neto, S. L. 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.

- Marzorati, M., Borin, S., Brusetti, L., Daffonchio, D., Marsilli, C., Carpani, G., Ferra, F.** 2005. Response of 1,2-dichloroethane-adapted microbial communities to ex-situ biostimulation of polluted groundwater. *Biodegradation*.
- Matheus, D. R.** 1998. Biorremediação de solos contaminados com compostos organoclorados e biodegradação de hexaclorobenzeno por basidiomicetos brasileiros. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.
- Matheus, D. R. & Okino, L. K.** 1998. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. *In: Bononi, V. L. R. e Grandi, R. A. P. (eds.). 1998. Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas.* São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente. 184p.
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G.** 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16 (5): 415-421.
- Matheus, D. R. & Bononi, V. L. R.** 2002. C/N Ratio and vegetable oil to mineralize ¹⁴C hexachlorobenzene by white-rot-fungi. *In: Gavaskar, A. R., Chen, A. S. C. (eds.). Remediation of chlorinated and recalcitrant compounds.* Monterey, CA, Paper 2B-10.
- Matheus, D. R.** 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.
- Matheus, D.R., Bononi, V.L.R., Machado, K.M.G., Silva, R.R., Rodrigues, T.A.** 2003. Basidiomycetes growth in bioreactors to applied in HCB soil biorremediation. Proceedings do simpósio The Seventh International Symposium In Situ and On-Site Biorremediation, Battelle Press, Orlando, Paper G5.

- Mayer, A.M. & Staples, R.C.** 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, v.60, p.551-565. *In*: Matheus, D. R. 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.
- McErlean, C., Marchant, R., Banat, I.M.** 2006. An evaluation of soil colonisation potential of selected fungi and their production of ligninolytic enzymes for use in soil bioremediations. *Antonie van Leeuwenhoek* 90: 147-158.
- McGratha, R. & Singleton, I.** 2000. Pentachlorophenol transformation in soil: a toxicological assessment. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 1311-1314.
- Meijer, S.N., Ockenden, W.A., Sweetman, A., Breivik, K., Grimalt, J.O., Jones, K.C.** 2003. Global Distribution and Budget of PCBs and HCB in Background Surface Soils: Implications for Sources and Environmental Processes. *Environmental Science Technology* 37: (4) 667 - 672.
- Miller, C., M. Valentine, R. L, Roehl, M. E., Pedro, J. J. A.** 1996. Chemical and microbiological assessment of pendimethanlin-contaminated soil after treatment with Fenton's reagent. *Water Research* 30: 2579-2586.
- Miyoshi, K., Nishio, T., Yasuhara, A., Morita, M. & Shibamoto, T.** 2004. Detoxification of hexachlorobenzene by dechlorination with potassium-sodium alloy. *Chemosphere* 55: 1439-1446.
- Mohammadia, A. & Nasernejad, B.** 2009. Enzymatic degradation of anthracene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse. *Journal of Hazardous Materials* 161: 534-537.

- Moreira-Neto, S. L.** 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.
- Moreira-Neto, Matheus, D.R, Machado, K.M.G.** 2009. Influence of pH on the growth and production of the ligninolytic system of tropical basidiomycetes. Brazilian Archives of Biology and Technology, “*in press*”.
- Nakagawa, L. E. & Andréa, M. M.** 2005. Volatilização e lixiviação de 14C-hexaclorobenzeno em solo contaminado. Arquivos do Instituto Biológico 72 (2): 255-260.
- Nakagawa, L.E., & Andréa, M.M.** 2006. Efeito de alterações nas características do solo sobre a degradação de hexaclorobenzeno. Revista Brasileira de Ciência do Solo 30: 575-582.
- Namkoong, W., Hwang, E.Y., Park, J.S., Choi, J.Y.** 2002. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. Environmental Pollution 119: 23-31.
- Nascimento, N.R., Nicola, S.M.C., Rezende, M.O.O., Oliveira, T.A., Oberg, G.** 2004. Pollution by hexachlorobenzene and pentachlorophenol in the coastal plain of São Paulo state, Brazil. Geoderma 121: 221-232.
- Novotny, C., Svobodova, K., Kasinath, A., Erbanova, P.** 2004. Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. International Biodeterioration & Biodegradation 54: 215 – 223.
- Okeke, B.C., Smith, J.E., Paterson, A., Watson-Craik, I.A.** 1996. Influence of environmental parameters on pentachlorophenol biotransformation in soil by *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiol Biotechnology 45: 263-266.

- Okeke, B.C., Paterson, A., Smith, J.E., Watson-Craik, I.A.** 1997. Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of *Lentinula edodes*. *Applied Microbiol Biotechnology* 48: 563-569.
- Pacyna, J.M.** 1999. Environmental cycling of selected persistent organic pollutants (POPs) in the Baltic region. Technical Report of Environmental and climate research programme (No.ENV4-CT96-0214). *apud* Moreira-Neto, S. L. 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.
- Pazarlioglu, N, Urekb, R.O., Ergunc, F.Urekb, R.O., Ergunc, F.** 2005. Biodecolourization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry* 40: 1923–1929.
- Pointing, S. B.** 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 20–33.
- Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V. & Vasilchenko, L.G.** 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 40 (1): 1-17.
- Rahuman, M.S.M., Pistone, L., Trifiró, F., Miertus, S.** 2000. Destruction technologies for polychlorinated biphenyls (PCBs). *In: Annals of Expert Group Meetings on POPs and Pesticides Contamination : Remediation Technologies*, International Centre for Science and High Technology United Nations Industrial Development Organization (ICS-UNIDO), 55p.
- Reddy, G. V. B., Gelpke, M. D. S., Gold, M. H.** 1998. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of Reductive Dechlorination. *Journal of Bacteriology* 180 (19): 5159–5164.

- Reddy, G.V.B & Gold, M. H.** 2000. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiology* 146: 405–413.
- Rein, A., Fernqvist, M.M., Mayer, P., Trapp, S., Bittens, M., Karlson, U.G.** 2007. Degradation of PCB congeners by bacterial strains. *Applied Microbiology Biotechnology* 77: 469–481.
- Rigas, F., Papadopoulou, K., Philippoussis, A., Papadopoulou, M., Chatzipavlidis, J.** 2008. Bioremediation of Lindane Contaminated Soil by *Pleurotus ostreatus* in Non Sterile Conditions Using Multilevel Factorial Design. *Water Air Soil Pollut.*
- Rippen G, Frank R.** 1986. Estimation of hexachlorobenzene pathways from the technosphere into the environment. *In: Barber, J.L., Sweetmana, A.J., van Wijkb, D., Jonesa, K.C.* 2005. Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes. *Science of the Total Environment* 349: 1-44.
- Robles-Hernández, L., Franco, A.C.G., Donald L. Crawford, D.L., Chun, W.W.C.** 2008. Review of environmental organopollutants degradation by white-rot basidiomycete mushrooms - Revisión de degradación de contaminantes ambientales por basidiomicetos de la pudrición Blanca. *TecnoCiência Chihuahua* 2 (1): 32-40 .
- Rodrigues, N.L.V.B.** 2005. Testes de toxicidade aguda através de bioensaios no extrato solubilizado dos resíduos classe II A – não inertes e classe II B – inertes. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 122p.
- Salvi, M.B.** 2008. Degradação química e biológica de ¹⁴C-Hexaclorobenzeno por polietilenoglicol/hidróxido de sódio e *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 150p.

- Sander, P., Wittich, R.M., Fortnagel, P., Wilkes, H., Francke, W.** 1991. Degradation of 1,2,4-Trichloro- and 1,2,4,5-Tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains. Applied and Environmental Microbiology 57: 5 1430-1440.
- Sawyer, N.A., Chambers, S.M., Cairney, J.W.G.** 2003. Utilisation of inorganic and organic phosphorus sources by isolates of *Amanita muscaria* and *Amanita* species native to temperate eastern Australia. Australian Journal of Botany 51: 151-158.
- Schroll, R., Brahusi, F., Dörfler, U., Kühn, S., Fekete, J., Munch, J.C.** 2004. Biomineralisation of 1,2,4-trichlorobenzene in soils by na adapted microbial population. Environmental Pollution 127: 395–401.
- Schumacher, B.A.** 2002. Methods for the determination of Total Organic Carbon (TOC) in soils and sediments. EPA NCEA-C-1282, EMASC-001. 23p.
- Sedarati, M.R., Keshavarz, T., Leontievsky, A.A., Evans, C.S.** 2003. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. Electronic Journal of Biotechnology 6: (2) 103-114.
- Shih,Y., Chenb, Y., Chenb,M., Tai,Y., Tsob, C.** 2009. Dechlorination of hexachlorobenzene by using nanoscale Fe and nanoscale Pd/Fe bimetallic particles. Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineer Aspects 322: 84-89.
- Shim, S. S. & Kawamoto, K.** 2002. Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. Water Research 36: 4445–4454.
- Silva, R. R.** 2004. Ergosterol para a determinação de biomassa de fungos *Lentinus crinitus* Berk e *Psilocybe castanella* Peck em biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 108p.

- Sparovek, G., Anisimova, M.A., Kolb, M., Bahadir, M., Wehage, H., Schnug, E.** 2001. Organochlorine Compounds in a Brazilian Watershed with Sugarcane and Intense Sediment Redistribution. *Journal of Environmental Quality* 30: 2006–2010.
- Srinivasan, U., Glaser, J.A.** 1999. The validity of ergosterol-based fungal biomass estimate in biorremediation, *In: Alleman, B.C., Leeson, A.* 1999. *Bioreactor and Ex Situ biological Treatment Technologies*. San Diego, California: Battelle Press, p.103-109.
- Swoboda-Coldeberg, N.G.** 1995. Chemical contamination of the environmet: sources, types, and fate of syntetic organic chemicals. *In: Young, L.Y. & Cerniglia, C.E.* (Eds.). *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*, New York: Wiley-Liss, p. 27-74. *apud* Moreira-Neto, S. L. 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.
- Targa, H.J., Klockow, D.** 1997. Air pollution and vegetation damage in the tropics – the Serra do Mar as an example. *In: Klockow, D., Targa, H.J., Vautz, W.* ed. São Paulo.
- Tekere, M., Mswaka, A.Y., Zvauya, R., Read, J.S.** 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 420–426.
- Toledo, H. H. B.** 2002. Hexaclorobenzeno. *In: Poluentes Orgânicos Persistentes*. Fernícola, N. A. G. G., Oliveira, S. S.– Salvador: CRA, v.13, cap.10, pág.385-416, 2002 (Série Caderno de Referência Ambiental).
- Tortella, G. R., Diez, M. C. & Durán, N.** 2005. Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants. *Critical Reviews in Microbiology* 31: 197–212.
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I., Le Borgne, S.** 2003. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental* 46: 1-15.

- Tuomela, M., Lyytikäinen, M., Oivanen, P., Hatakka, A.** 1999. Mineralization and conversion of pentachlorophenol (PCP) in soil inoculated with the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 65 – 74.
- Ullah, M. A., Kadhim, H., Rastall, R. A. & Evans, C. S.** 2000. Evaluation of solid substrates for enzyme production by *Coriolus versicolor*, for use in bioremediation of chlorophenols in aqueous effluents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54:832-837.
- Van Hamme, J.D., Wong, E.T., Dettman, H. Gray, M.R., Pickard, M.A.** 2003. Dibenzyl Sulfide Metabolism by White Rot Fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 69 : (2) 1320–1324.
- Verschueren, K.** 1983. *Handbook of Environmental data on Organic Chemical*. New York, 363p., *apud*. Matheus, D. R. 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.
- Vitali, V. M. V.** 2004. Biodegradação de hexaclorobenzeno por *Eupenicillium* spp. e *Psilocybe castanella* em solos contaminados com organoclorados. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 116p.
- Vitali, V. M. V., Machado, K. M. G., Andrea, M. M., Bononi, V. L. R.** 2006. Screening mitosporic fungi for organochlorides degradation. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 256-261.
- Walter, M., Boyd-Wilson, K. B., Boul, L, Ford, C., McFadden, D., Chong, B., Pinfeld, J.** 2005. Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 56: 51–57.

- Wells, J.M., Hughes, C., Boddy, L.** 1990. The fate of soil-derived phosphorus in ycelial cord systems of *Phanerochaete velutina* and *Phallus impudicus*. *New Phytologist* 141: 595-606.
- Wells, J.M., Boddy, L., Donnelly, D.P.** 1998. Wood decay and phosphorus translocation by the cord-forming basidiomycete *Phanerochaete velutina*: the significance of local nutrient supply. *New Phytologist* 138: 607-617.
- Yamanaka, R., Soares, C. F., Matheus, D. R., Machado, K. M. G.** 2008. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 78-84.
- Yuan, S., Tian, M., Lu, X.** 2006. Electrokinetic movement of hexachlorobenzene in clayed soils enhanced by Tween 80 and β -cyclodextrin. *Journal of Hazardous Materials* 137 (2): 1218-1225.
- Yuan, S., Shu, Z., Wan, J., Lu, X.** 2007. Enhanced desorption of hexachlorobenzene from kaolin by single and mixed surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* 314 (1): 167-175.
- Zago, A., Pereira, L.A.A., Braga, A.L.F., Bousquat, A.** 2005. Mortalidade por câncer de mama em mulheres na Baixada Santista, 1980 a 1999. *Revista de Saúde Pública* 39: (4) 641-645.
- Zang, S., Li, P., Li, W., Zhang, D. & Hamilton, A.** 2007. Degradation mechanisms of benzo[a]pyrene and its accumulated metabolites by biodegradation combined with chemical oxidation. *Chemosphere* 67: 1368-1374.
- Zeng, Y., Hong, P.K.A., Wavrek, D.A.** 2000. Chemical-biological treatment of pyrene. *Water Research* 34: (4) 1157-1172.

Zilouei, H., Soares, A., Murto, M., Guieysse, B., Mattiasson, B. 2006. Influence of temperature on process efficiency and microbial community response during the biological removal of chlorophenols in a packed-bed bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 591-599.

8. Resumo

Casos de contaminação por organoclorados têm sido uma preocupação mundial. No Brasil existem muitos casos de contaminação de solos por organoclorados, dentre eles o hexaclorobenzeno (HCB) cuja biodegradação é extremamente difícil porque sua molécula é muito estável quimicamente. Os basidiomicetos *Lentinus crinitus*, *Psilocybe castanella* e *Trametes villosa* foram selecionadas como bons degradadores de organoclorados, incluindo HCB, a serem aplicados para descontaminação de solo. A associação de tratamentos químicos e biológicos também vem sendo estudados a fim de promover a desalogenação da molécula de HCB e facilitar a ação dos fungos na degradação dos organoclorados. Esse trabalho teve como metas: avaliar a biorremediação de solo contaminado com HCB por *Lentinus crinitus* CCB274 e *Psilocybe castanella* CCB 444 em biorreatores, bem como a associação de tratamento químico e a biorremediação do mesmo solo por *Trametes villosa* em biorreatores. Lotes de 400 kg de solo contaminado com 25000 mg de HCB kg⁻¹ de solo foram transferidos para biorreatores dotados de sistema de injeção de ar, e esterilizados com brometo de metila por 72 h. No tratamento químico, o solo foi misturado com hidróxido de sódio (10%), polietilenoglicol 400 (4%) e etanol (3,5%) por 30 dias e posterior neutralização com H₂SO₄ antes da esterilização e inoculação do *T. villosa*. Os fungos foram cultivados em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farinha de soja (C:N 90) a 28° C, durante 21 dias e inoculados nos biorreatores em duplicata. Aos 0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias foi avaliado o desenvolvimento dos fungos por quantificação de ergosterol, re-isolamento dos basidiomicetos, determinação das atividades enzimáticas, da umidade e do pH do solo, bem como quantificadas as concentrações de organoclorados e íons cloreto no solo. Carbono orgânico total, nitrogênio e fósforo e microrganismos foram quantificados aos 0 e 224 dias. A toxicidade aguda do lixiviado do solo foi medida aos 0, 56 e 224 dias e a temperatura do solo diariamente. Tanto *L. crinitus* como *P. castanella* removeram totalmente o

hexaclorobutadieno e o pentaclorofenol. Maiores concentrações de compostos intermediários clorados não identificados e íons cloreto foram observadas a partir dos 84. Tanto *Lentinus crinitus* quanto *P. castanella* reduziram as concentrações dos compostos não identificados até os 224 dias de incubação. Não foram observadas reduções significativas na concentração de pentaclorobenzeno, dos tetraclorobenzenos, nem se reproduziram as taxas de degradação de HCB obtidas por *L. crinitus* e *P. castanella* em microcosmos. Em todos os tratamentos houve aumento e posterior diminuição da toxicidade do lixiviado do solo. Os crescimentos de *L. crinitus* e de *P. castanella* no solo se mantiveram estáveis até 112 dias. O crescimento de *T. villosa* no solo submetido a tratamento químico foi observado até 84 dias. O tratamento químico do solo promoveu redução de cerca de 90% da concentração de HCB e PeCB, resultando principalmente na formação de tetraclorodietoxibenzeno (TCDTB) e triclorodietoxibenzeno (TriCEB). Após os 224 dias de incubação de *T. villosa* no solo dos biorreatores não foram observadas diminuições significativas dos resíduos de HCB e PeCB. Durante a incubação houve a formação e completa remoção de 1,2,3,4 e 1,2,4,5 tetraclorobenzeno. Observou-se aumento de TCDTB e TriCEB durante a incubação com posterior degradação parcial do TCDTB e total remoção de HCBU e PCA aos 224 dias. Embora o tratamento químico tenha diminuído drasticamente a concentração de HCB no solo a toxicidade foi aumentada e posteriormente reduzida pelo tratamento biológico.

Palavras chaves: hexaclorobenzeno, larga escala, *Lentinus crinitus*, *Psilocybe castanella*, PEG-400, oxidação química.

Abstract

Cases of contamination by organochlorates have been a world-wide concern. Many situations of soil contamination by organochlorates occur in Brazil. This includes hexachlorobenzene (HCB), which is chemically very stable and thus has an extremely difficult biodegradation. The application of basidiomycetous fungi has been experimented for the biodegradation of organochlorates, including HCB, and soil decontamination. *Lentinus crinitus*, *Psilocybe castanella* and *Trametes villosa* were selected as good degraders of organochlorates. The association of chemical and biological treatments are being studied in order to promote the desallogenation of the HCB molecule and facilitate the activity of fungi in the degradation of organochlorates. The aims of the present study were to (i) evaluate the bioremediation of contaminated soil with HCB through the use of *Lentinus crinitus* CCB274 and *Psilocybe castanella* CCB 444 in bioreactors and (ii) associate the chemical treatment and bioremediation of the same soil by *Trametes villosa* in bioreactors. 400 kg portions of soil contaminated with organochlorates (25000 mg of HCB kg⁻¹ of soil) were transferred to bioreactors equipped with a system of air injection and sterilised with methyl bromete for 72 h. The chemical treatment consisted of mixing the soil with NaOH (10%), PEG-400 (4%) and ethanol (3,5%) during 30 days, and neutralise it with H₂SO₄ before the sterilisation and the inoculation with *T. villosa*. The fungi were grown at 28°C during 21 days on sugar-cane bagasse supplemented with soybean flour (C:N 90) and inoculated in the bioreactors in duplicate. The development of the fungi was evaluated at 0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 and 224 days, by quantification of ergosterol, the re-isolating of the basidiomycetes, the enzymatic activities, the soil humidity and pH, as well as the concentration of organochlorates and chlorate ions in the soil. COT, N and P and micro-organisms were quantified at 0 and 224 days. The acute toxicity of the soil was measured at 0, 56 and 224 days and the soil temperature daily. Both *L. crinitus* and *P. castanella* totally removed the hexachlorobutadiene and pentachlorophenol. Larger concentrations of intermediary chlorated non-identified

compounds and chlorate ions were observed from 84 days. Both *L. crinitus* and *P. castanella* reduced the concentrations of the non-identified compounds until 224 days of incubation. Significant decreases in the concentration of pentachlorobenzene and of the tetrachlorobenzenes were not observed. The taxa of degradation of HCB obtained by *L. crinitus* and *P. castanella* in microcosm also did not reproduce themselves. An increase and posterior decrease of the toxicity of the soil lixivium occurred in all treatments. The growth of *L. crinitus* and *P. castanella* in the soil remained stable until 112 days. The growth of *T. villosa* in the soil submitted to chemical treatment was observed up to 84 days. The chemical treatment of the soil promoted a reduction of circa 90% of the HCB and a concentration of PeCB, resulting mainly in the formation of tetrachlorodietoxibenzene (TCDTB) and trichlorodietoxibenzene (TriCEB). No significant decreases of the HCB and PeCB residues were observed after 224 days of *T. villosa* incubation in the soil of the bioreactors. During the incubation occurred the formation and complete removal of TCB isomers. An increase of TCDTB and TriCEB was observed during the incubation, with posterior partial degradation of TCDTB and a total removal of HCBU and PCA at 224 days. Although the chemical treatment has drastically diminished the concentration of HCB in the soil, the toxicity increased and later decreased as a result of the biological treatment.

Keywords: hexachlorobenzene, scale up, *Lentinus crinitus*, *Psilocybe castanella*, PEG-400, chemical oxidation.

9. Anexos

Anexo 1

Estação de tratamento de biorremediação de solo. Galpão construído no local, com sistema de coleta de água e sólidos.



Anexo 2

Peneira mecânica utilizada para remoção de galhos e pedras no preparo do solo para utilização nos biorreatores



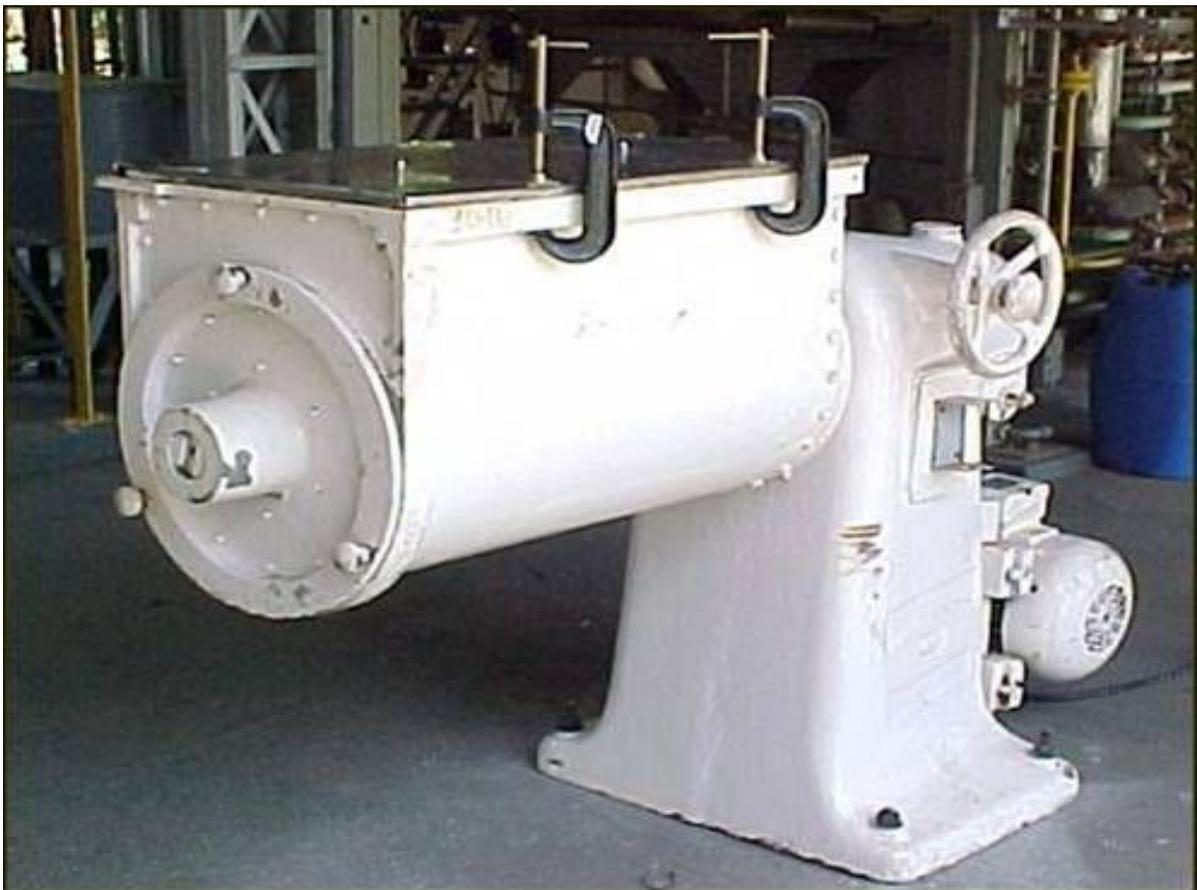
Anexo 3

Moinho de bolas, utilizado para triturar torrões de solo e de organoclorados durante o preparo do solo a serem utilizados nos biorreatores



Anexo 4

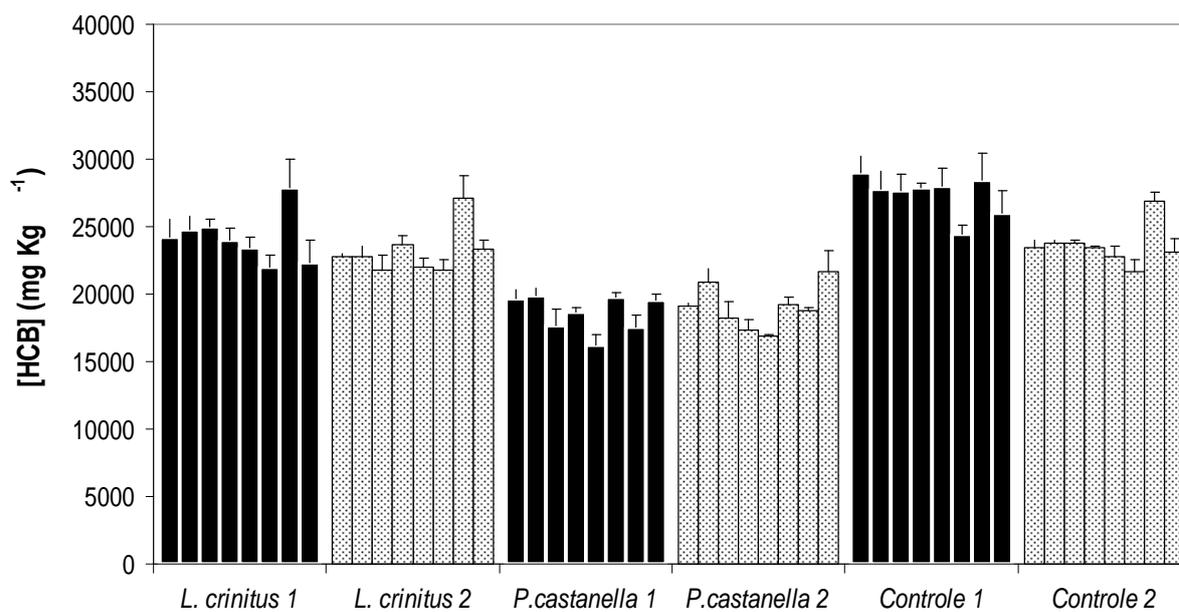
Misturador de solo, utilizado para homogeneizar os lotes de solo para adequação da concentração inicial de HCB (25000 mg Kg^{-1} de solo) e incorporação de gesso comercial - 5% da massa de solo (ver material e método preparo do solo capítulo 1 e 2).



Anexo 5

Concentração de hexaclorobenzeno (HCB) no solo dos biorreatores.

Ver capítulo 1, página 59.



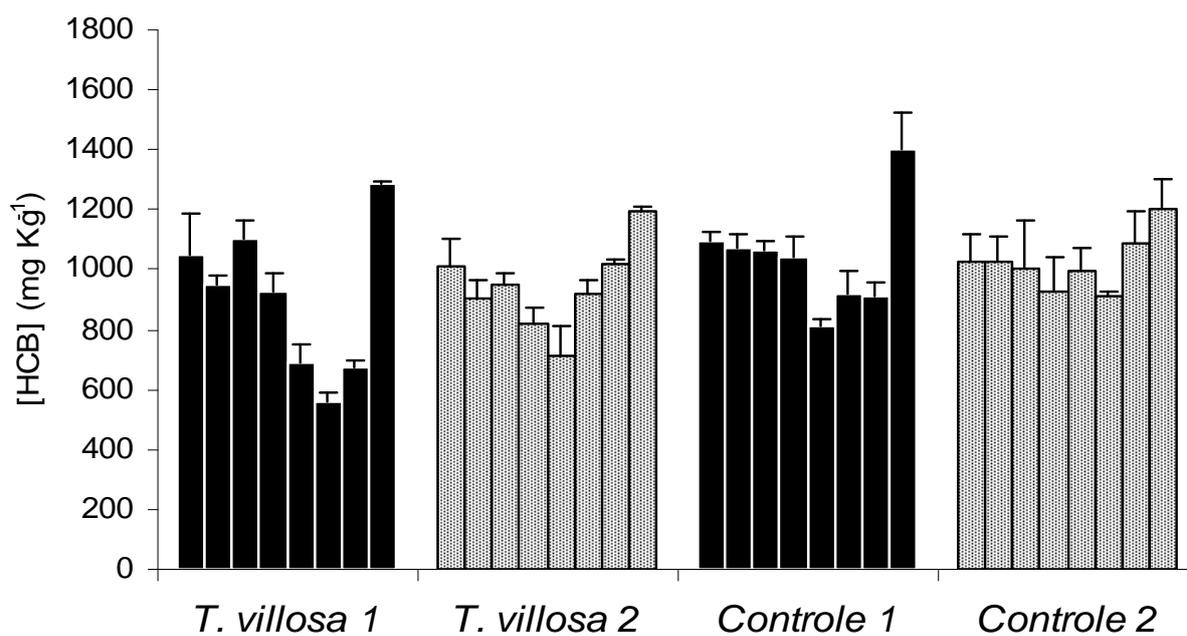
As colunas correspondem aos dias de amostragem após inoculação do fungo no solo

(0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)

Anexo 6

Concentração de hexaclorobenzeno (HCB) no solo dos biorreatores.

Ver capítulo 2, página 108.



As colunas correspondem aos dias de amostragem após inoculação do fungo no solo (0, 7, 14, 28, 56, 84, 112 e 224 dias de incubação)