

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Agrárias
Departamento de Solos e Engenharia Agrícola
Pós-Graduação em Ciência do Solo

ANA PAULA APARECIDA DUARTE

**MUDANÇAS FÍSICAS, QUÍMICAS E NAS FORMAS DE Pb E Mn APÓS A
PASSAGEM DO SOLO ATRAVÉS DO TRATO INTESTINAL DE *Pontoscolex
corethrurus* (OLIGOCHAETA: ANNELIDA)**

**CURITIBA
2010**

ANA PAULA APARECIDA DUARTE

MUDANÇAS FÍSICAS, QUÍMICAS E NAS FORMAS DE Pb E Mn APÓS A PASSAGEM DO SOLO ATRAVÉS DO TRATO INTESTINAL DE *Pontoscolex corethrurus* (OLIGOCHAETA: ANNELIDA)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência do Solo – Área de concentração em Qualidade e Sustentabilidade Ambiental – Linha de pesquisa: Poluição do Solo e Recuperação de Áreas Degradadas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Vander de Freitas Melo.

**CURITIBA
2010**



UFPR

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DEPARTAMENTO DE SOLOS E ENGENHARIA AGRÍCOLA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO(MESTRADO)

Rua dos Funcionários, 1540-Curitiba/PR-80035-050-Fone/Fax 41-3350-5648

Página: www.pgcisolo.agrarias.ufpr.br/

E-mail: pgcisolo@ufpr.br

P A R E C E R

Os Membros da Comissão Examinadora, designados pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado, apresentada pela candidata **ANA PAULA APARECIDA DUARTE**, sob o título: "**Mudanças físicas, químicas e nas formas de Pb e Mn após a passagem do solo através do trato intestinal de *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta: Annelida)**", requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência do Solo – Área de Concentração: Qualidade e Sustentabilidade Ambiental, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, após haverem analisado o referido trabalho e argüido a candidata, são de Parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação, completando assim, os requisitos necessários para receber o diploma de **Mestre em Ciência do Solo - Área de Concentração: "Qualidade e Sustentabilidade Ambiental"**.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, em Curitiba, 19 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Vander de Freitas Melo, Presidente.

Prof. Dr. Luis Reynaldo Ferraciu Alleoni, Iº. Examinador.

Prof. Dr. Klaus Dieter Sautter, IIº. Examinador.

"Não sabendo que era impossível, foi lá e fez."

Jean Cocteau

Aos meus pais e ao meu grande amor, Giorgio
Augusto Souza.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me concedido força e garra para realizar este trabalho e por colocar em minha vida pessoas muito especiais que me auxiliaram na realização deste sonho.

Ao prof. Dr. Vander de Freitas Melo, admirável profissional e ser humano, um amigo que carregarei para o resto da vida com o orgulho de ter sido sua orientada.

Ao prof. PhD. George Gardner Brown pelo auxílio na montagem e condução do experimento e ajuda ao longo do trabalho.

Ao Conselho de Apoio à Pesquisa e Ensino Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos durante a realização do Mestrado.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciência do Solo e Engenharia Agrícola, em especial ao Gerson e a Maria. Esta, companheira de laboratório e de todas as horas. Sua doçura e seriedade no trabalho foram uma lição de vida.

Aos familiares pelo incentivo, especialmente aos tios Luis, Mauro, Magda e Carla.

À família Souza, em especial ao Seu Amaro e a D. Maria, pelo amparo e incentivo nas horas difíceis e alegres.

Aos amigos que me acompanharam nesta luta diária, em especial ao Jairo, Julian, Tales e Jonatas, para quem eu recorria nas horas boas e nos apuros. Aos que me davam força de longe, os de Joinville, especialmente a amiga Juliane, pelas experiências vividas juntas na vinda para Curitiba.

À família Hiendlmayer pelo apoio e acolhida durante a concretização de mais este sonho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1	4
1.1 INTRODUÇÃO GERAL	4
1.2 OBJETIVO GERAL	6
1.3 LITERATURA CITADA	7
CAPÍTULO 2 - MUDANÇAS NA FERTILIDADE E EM CARACTERÍSTICAS FÍSICAS COM A PASSAGEM DO SOLO ATRAVÉS DO TRATO INTESTINAL DE <i>PONTOSCOLEX CORETHRURUS</i> (OLIGOCHAETA: ANNELIDA)	8
2.1 INTRODUÇÃO	8
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	14
2.4 CONCLUSÕES	18
2.5 LITERATURA CITADA	18
CAPÍTULO 3 – MUDANÇAS NAS FORMAS DE METAIS PESADOS COM A PASSAGEM DO SOLO ATRAVÉS DO TRATO INTESTINAL DE <i>PONTOSCOLEX CORETHRURUS</i> (OLIGOCHAETA: ANNELIDA).....	21
3.1 INTRODUÇÃO	22
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
3.4 CONCLUSÕES	41
3.5 LITERATURA CITADA	42

RESUMO GERAL

No município de Adrianópolis, PR, foram realizadas atividades de mineração e metalurgia de Pb por cerca de 50 anos. A empresa deixou pilhas de rejeitos, escórias do processo de metalurgia, espalhadas pelo pátio da fábrica e na área de mineração sem cuidado algum com a contaminação do ambiente. Em estudos prévios, foram constatados altos níveis de contaminação pela análise do sangue de crianças que viviam próximas da empresa. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da passagem de solos de área de mineração e metalurgia de Pb pelo trato intestinal de minhocas (*Pontoscolex corethrurus*) sobre as formas de Pb e Mn (transformação das formas lábeis em formas mais estáveis), utilizando a técnica de extração sequencial. Adicionalmente, determinaram-se as diferenças químicas (parâmetros da fertilidade), granulometria e argila dispersa em água na matriz do solo e nos coprólitos. Foram coletadas amostras em duas profundidades (0-10 e 20-40 cm) de cinco perfis de solos, sendo um deles considerado referência (solo 1 - sob mata nativa), tendo em vista a distância das fontes de contaminação. Os demais solos foram submetidos a diferentes formas de contaminação: solo 2 - incorporação de resíduos da metalurgia de metais pesados aos perfis; solos 3 e 6 - potencial de adição de Pb particulado via chaminés da fábrica; solo 8 - potencial de contaminação por passagem da água pluvial pela fábrica desativada, que escorre em direção ao rio Ribeira. Para as avaliações dos parâmetros da fertilidade e das características físicas (argila dispersa em água e granulometria) consideraram-se apenas as amostras do solo de referência e dos solos 1, 2 e 6. A terra fina seca ao ar foi depositada em recipiente plástico, colocando-se uma fina camada de aproximadamente 1,5 cm de espessura, para facilitar o recolhimento dos coprólitos na superfície. As minhocas foram colocadas nas devidas unidades experimentais (cinco indivíduos por recipiente) e as duas primeiras coletas de coprólitos foram descartadas. Após quatro meses de incubação das minhocas e recolhimento de coprólitos, as análises foram realizadas nessa porção e no solo natural ou controle. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste Tukey ($p < 0,05$). Observou-se que as minhocas possuem a capacidade de selecionar as frações do solo para se alimentar, com aumento da areia fina e silte e, conseqüente diminuição da areia total. Os anelídeos também alteraram a fertilidade do solo, com o aumento nos valores de pH e de CTC total e dos teores de P, K^+ e $Ca^{2+}+Mg^{2+}$. Ainda, aumentaram os teores de carbono orgânico total no solo mais pobre (solo 6 - Neossolo Quartzarênico). O único efeito indesejável foi o aumento da argila dispersa em água, que pode aumentar a erodibilidade do solo. Com relação às avaliações de metais pesados, os teores de Pb e Mn também foram determinados no solo natural ou controle e nos coprólitos: teores totais e teores em extrações sequenciais de várias fases - solúvel → trocável → associado aos carbonatos → ligado especificamente à matéria orgânica → ligado

especificamente aos óxidos de Fe, Al e Mn de baixa cristalinidade → ligado especificamente aos aluminossilicatos de baixa cristalinidade → residual. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste Tukey ($p < 0,05$). Houve baixa seletividade do extrator acetato de Na (associados a carbonatos), que também extraiu Pb e Mn ligados à matéria orgânica, dificultando a avaliação do efeito da passagem do solo pelo trato intestinal das minhocas sobre essa forma de metais. Os anelídeos reduziram a quantidade de Pb nas frações solúvel e trocável do solo, consideradas mais biodisponíveis ambientalmente. Houve incremento de Pb na forma de óxidos de Fe, Al e Mn de baixa cristalinidade nos coprólitos (adsorção específica), que seria desejável em estudos de remediação. Os teores totais de Mn foram pouco influenciados pela atividade de mineração e metalurgia na área. As minhocas produziram casulos apenas no solo referência (sob mata nativa e distante das atividades de metalurgia de Pb) e absorveram maior quantidade de Pb em seus tecidos no solo mais contaminado e naquele mais arenoso e com menor CTC.

Termos de indexação: minhocas, coprólito, contaminação do solo, extração sequencial de metais pesados, alterações físicas e químicas do solo.

ABSTRACT

*For nearly 50 years, lead mining and metallurgy activities took place in the city of Adrianópolis-PR. The company left piles of debris and scoria from the metallurgy process, spread throughout the factory's floor and mining area without any care with environmental contamination. In previous studies, high levels of contamination were found through the children's blood count who lived in the factory's vicinity. The purpose of this study is to evaluate the effect of the passage of soils from around the lead mining and metallurgy activities through earthworms the intestinal tract (*Pontoscolex corethrurus*) in the forms of Pb and Mn (transformation of labile forms into more stable ones), using the sequential extraction technique. Additionally, chemical differences in the soil matrix and coprolites were determined (fertility parameter), granulometry and water dispersed clay. Samples were collected in two different depths (0-10 and 20-40 cm) of five soil profiles, one of them taken as reference (soil 1 – under native forest), considering the distance from the contamination sources. The other soils were submitted to different forms of contamination: soil 2 – incorporation of metallurgy residues of heavy metals to the profiles; soils 3 and 6 – potential of addition of suspended Pb via factory's chimneys; soil 8 – potential of contamination by means of pluvial water passage through the deactivated factory, which takes place toward the Ribeira river.*

For the evaluation of fertility parameters and physical characteristics (water dispersed clay and granulometry) only the samples from reference soils 1, 2 and 6 are considered. The fine air-dried soil was deposited in plastic recipients, putting a fine layer of approximately 1.5 cm of thickness to facilitate the collection of coprolites on the surface. The earthworms were placed in specific experimental units (five individuals per recipient) and the two first collections of coprolites were discarded. After four months of the earthworms' incubation and collection of coprolites, the analysis were done in this portion and in the natural or control soil. The results were submitted to variance analysis and the means were compared with Tukey Test ($p < 0.05$). It was noticed that the earthworms have the ability of selecting the fractions of soil to feed on, with increase of fine sand and silt, and consequent decrease of total sand. The annelids also altered the soil fertility, with the increase of pH values and total CTC, and the tenors of P, K^+ and $Ca^{2+}+Mg^{2+}$. On top, they increased the tenors of total organic carbon in poorer soils (soil 6 – Psamment). The only undesired effect was the increase of water dispersed clay, which may increase soil erodibility. In relation to the heavy metal evaluations, the tenors of Pb and Mn were also determined in the natural or control soil and in the coprolites: total tenors and sequential extraction tenors of several phases – soluble → exchangeable → carbonate-associated → bound specifically to the organic matter → bound specifically to low crystallinity Fe, Al and Mn oxides → bound specifically to low crystallinity aluminosilicates → residual. The results were submitted to the variance analysis and the means were compared to the Tukey Test ($p < 0.05$). There was low selectivity of the Na acetate extractor (associated to carbonates), which also extracted Pb and Mn bound to organic matter, hindering the evaluation of the effect in soil passage through the earthworms' intestinal tract upon this form of metals. The annelids reduced the amount of Pb in soluble and exchangeable soil fractions, considered more environmentally bioavailable. There was an increase of Pb in the form of low crystallinity Fe, Al and Mn oxides in coprolites (specific absorption), which would be desirable in remediation studies. The total Mn tenors were little influenced by mining and metallurgy activities in the area. The earthworms produced cocoons only in the reference soil (under native forest and away from Pb metallurgy activities) and absorbed greater amounts of Pb in their tissues in the more heavily contaminated soil as well as in the sandier one with lesser CTC.

Index terms: earthworms, coprolite, soil contamination, heavy metal sequential extraction, soil chemical and physical alterations.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

As minhocas fazem parte da macrofauna do solo, são amplamente distribuídas e possuem alto grau de adaptabilidade às condições edáficas. Normalmente, promovem modificações nos locais em que vivem, em especial no solo: participam da ciclagem de nutrientes, misturam os horizontes, melhoram a aeração e, conseqüentemente, a infiltração da água. As minhocas cavam túneis extensos e liberam muco através da sua epiderme que sela as paredes desses canais. Trabalham na desestruturação e reestruturação do solo, permitindo que a matéria orgânica, antes protegida no interior do agregado, seja reciclada e vice-versa. Com a movimentação vertical, podem levar a matéria orgânica presente na parte mais superficial para camadas mais profundas, modificando as condições dos locais em que estão presentes.

Esses anelídeos são conhecidos por apresentarem estratificação vertical no perfil do solo. A *Pontoscolex corethrurus* é uma espécie que prefere profundidades intermediárias. Características como o prostômio, o tamanho e a pigmentação variam de acordo com essa distribuição vertical. O local que ocupam no perfil do solo ainda pode variar de acordo com algumas características do ambiente, como a disponibilidade de matéria orgânica (MO), a umidade e o pH. A qualidade e quantidade da MO disponível influencia a abundância das minhocas. A *P. corethrurus* tem preferência pela MO particulada (fração leve), ou por folhas parcialmente degradadas. Na maioria das vezes, o processo de digestão de folhas, galhos e raízes é iniciado por fungos e bactérias. As minhocas auxiliam essa degradação com enzimas próprias, mas também possuem relação mutualística com esses organismos para digestão da MO. Os anelídeos possuem ainda a capacidade de assimilar fácil e eficientemente a MO do solo, inclusive de solos pobres, o que possibilita colonização de habitats diversos.

A macrofauna desempenha papel importante na pedogênese e na melhoria da fertilidade do solo, através de modificações físico-químicas induzidas por sua atividade, por exemplo, na passagem do solo pelo trato intestinal dos anelídeos. As minhocas: possuem capacidade de selecionar as frações do solo para ingeri-las e de quebrar agregados, promovem a ciclagem de nutrientes e assimilam diferentes compostos químicos do solo.

A concentração total natural de metais pesados em solos depende principalmente do material de origem, dos processos de formação e da composição e proporção dos componentes da fase sólida do solo.

As atividades de mineração e industrialização de metais pesados representam perigosas fontes poluidoras ambientais. A disposição inadequada de resíduos aumenta significativamente os teores e transfere esses poluentes para formas mais facilmente assimiláveis às plantas e animais, podendo criar formas mais móveis no solo. Uma das graves conseqüências à poluição causada pelos metais pesados é a bioacumulação, processo que pode ser descrito como a elevação constante de seus níveis em organismos vivos, já que esses elementos não podem ser degradados metabolicamente.

No município de Adrianópolis, às margens do rio Ribeira, Estado do Paraná, Brasil, foram desenvolvidas por 50 anos atividades de mineração e metalurgia de primeira fusão de Pb. Em 1995 a mineradora encerrou suas atividades deixando a céu aberto, sem nenhuma proteção, cerca de 177 Gg de resíduos de beneficiamento, principalmente, da galena (PbS) (Eysink, 1988; Cassiano, 2001). Eysink (1988) demonstrou que os sedimentos do rio Ribeira apresentavam elevados teores de metais pesados, principalmente Pb, em locais próximos à fábrica. Estudos mais recentes demonstraram que os efeitos da mineração e metalurgia de Pb ainda se faziam presentes. Cunha (2003) avaliou o sangue de 335 crianças em idade escolar (7 a 14 anos), que moravam no entorno da antiga área de mineração (Vila Mota), e constatou que 70% das crianças apresentaram teores de Pb três vezes superiores aos limites preconizados pelo U.S. Center for Disease Control (CDC) e Organização Mundial de Saúde (OMS). Kummer (2008) determinou as características químicas e mineralógicas e promoveram a especiação de Pb e Zn dos solos por meio de extrações sequenciais. A contaminação por Pb dos solos argilosos próximos à fábrica e ao rio Ribeira por materiais particulados das chaminés mostrou-se mais prejudicial ao ambiente em virtude dos maiores teores totais ($19.434,0 \text{ mg kg}^{-1}$) e de formas de maior solubilidade (troçável - extraído com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ - $903,6 \text{ mg kg}^{-1}$). A alta percentagem de Pb associado aos carbonatos torna esse ambiente com grandes riscos ambientais, caso haja uma acidificação do solo. O Zn apresentou-se em formas mais insolúveis, aumentando a participação da fração residual nos teores totais. Barros (2008) gerou indicadores de qualidade dos solos por meio de avaliações físico-químicas, microbiológicas, da mesofauna e de plantas nativas: o maior número de bactérias esporuláveis no solo mais poluído foi interpretado como um mecanismo de resistência desses organismos aos elevados teores de Pb. Observou-se também que a maioria das plantas nativas estudadas apresentou toxidez de Pb, sendo encontrados os maiores teores desses metais nas raízes das plantas (máximo de $939,9 \text{ mg kg}^{-1}$).

Devido à gravidade da contaminação dessa área com metais pesados, tornam-se, então, de grande importância, estudos de remediação ambiental, visando a reduzir os teores totais e a biodisponibilidade de metais pesados no solo e a contaminação de águas superficiais e subterrâneas. O potencial de periculosidade de Pb se agrava quando o metal torna-se disponível à absorção pelas plantas e animais e quando sua quantidade excede a máxima capacidade de retenção pelo solo, tornando-se potencialmente lixiviável, com conseqüente aporte em corpos d'água. Espera-se efeito positivo da passagem dos metais através do trato digestivo das minhocas, com transformação das formas lábeis em formas mais estáveis, associadas principalmente aos compostos húmicos. Em glebas restritas da área, onde houver efeito positivo dos anelídeos, tanto na química como na redução da contaminação com metais pesados, esses organismos podem ser introduzidos ao solo como técnica isolada ou em associação, por exemplo, com a fitorremediação, visando reduzir os impactos prejudiciais das atividades de mineração. Andrade et al., (2009) concluíram que o girassol foi a espécie com maior potencial de fitorremediação dos solos da área.

1.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da passagem de solos de área de mineração e metalurgia de Pb pelo trato intestinal de minhocas (*Pontoscolex corethrurus*) sobre as formas de Pb e Zn (transformação das formas lábeis em formas mais estáveis), utilizando a técnica de extração seqüencial. Adicionalmente, determinaram-se as diferenças químicas (parâmetros da fertilidade), granulometria e argila dispersa em água na matriz do solo e nos coprólitos.

1.3 LITERATURA CITADA

ANDRADE, M.G.; MELO, V.F.; GABARDO, J.; SOUZA, L.C.P & REISMANN, C.B. Metais pesados em solos de área de mineração e metalurgia de chumbo: I - Fitoextração. R. Bras. Ci. Solo, 33:1879-1888, 2009.

BARROS, Y.J. Indicadores biológicos de qualidade de solos de área de mineração e processamento de chumbo, no município de Adrianópolis (PR). Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2008. 82p. (Dissertação de Mestrado).

CASSIANO, A.M. Fontes de contaminação por metais pesados na bacia do rio Ribeira (SP-PR): estratégias para remediação de uma área de disposição de rejeitos de mineração de Pb-Ag. São Carlos, Universidade Estadual de São Paulo, 2001. 159p. (Tese de Doutorado).

CUNHA, F.G. Contaminação Humana e Ambiental por Chumbo no Vale do Ribeira, nos Estados de São Paulo e Paraná, Brasil. Campinas, Universidade Estadual de Campinas, 2003. 125p. (Tese de Doutorado).

EYSINK, G.G.J. Metais pesados no Vale do Ribeira e em Igunde-Cananéia. Revista CETESB de Tecnologia, 2:6-13, 1988.

KUMMER, L. Mineralogia e fracionamento de metais pesados em solos de área de mineração e processamento de Pb, Adrianópolis-PR. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2008. 140p. (Dissertação de Mestrado).

CAPÍTULO 2 - MUDANÇAS EM CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FÍSICAS COM A PASSAGEM DO SOLO PELO TRATO INTESTINAL DE *PONTOSCOLEX CORETHRURUS* (OLIGOCHAETA: ANNELIDA)

RESUMO

Alguns grupos de organismos maiores de invertebrados edáficos, como as minhocas, devem promover alterações físicas e químicas nos solos, após ingestão de partículas orgânicas e minerais. Com o objetivo de verificar essas mudanças foram coletadas amostras de três solos (Neossolo Litólico, Cambissolo Háplico e Neossolo Quartzarênico), em duas profundidades (0-10 e 20-40 cm), no município de Adrianópolis (PR). As minhocas (*Pontoscolex corethrurus*) foram incubadas e as análises realizadas no solo natural ou controle e no coprólito. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste Tukey ($p < 0,05$). Observou-se que as minhocas possuem a capacidade de selecionar as frações do solo para se alimentar, com aumento da areia fina e silte e, conseqüente diminuição da areia total. Os anelídeos também alteraram a fertilidade do solo, com o aumento nos valores de pH e de CTC total e dos teores de P, K⁺ e Ca²⁺+Mg²⁺. Ainda, aumentaram os teores de carbono orgânico total no solo mais pobre (Neossolo Quartzarênico). O único efeito indesejável foi o aumento da argila dispersa em água, que pode aumentar a erodibilidade do solo.

Termos de indexação: minhocas; alterações físicas; alterações químicas; matéria orgânica.

SUMMARY: CHANGES IN PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS WITH THE PASSAGE OF SOIL THROUGH THE *PONTOSCOLEX CORETHRURUS*' INTESTINAL TRACT (OLIGOCHAETA: ANNELIDA)

Some groups of larger edaphic invertebrate organisms, such as earthworms, must foster chemical and physical changes in soils after the ingestion of organic and mineral particles. With the purpose of verifying these changes, samples of three soils were collected (Litolic Neosol, Haplic Cambisol and Psamment), in two different depths (0-10 and 20-40cm), in the city of Adrianópolis-PR. The earthworms (*Pontoscolex corethrurus*) were incubated (four months) and analysis was made in the natural or control soil and in the coprolite. The results were submitted to variance analysis and the means were compared by Tukey Test ($p < 0.05$). It was noticed that the earthworms have the ability of selecting soil fractions to feed on, with an increase of fine sand and silt, and consequent total sand decrease. The annelids also changed the fertility of the soil, with the increase in pH values and total CEC, and tenors of P, K⁺ and Ca²⁺+Mg²⁺. Furthermore, they increased the tenors of total organic carbon in poorer soils (Psammen Neosol). The only undesired effect was the increase of water dispersed clay, which may increase the soil erodibility.

Index terms: earthworms, soil physical alterations; soil chemical alterations; organic matter.

2.1 INTRODUÇÃO

O solo é considerado um ambiente de difícil movimentação para organismos maiores da macrofauna. Contudo, as minhocas e outros poucos grupos de organismos maiores de

invertebrados possuem a habilidade de ingerir o solo e se movimentar livremente, independentemente da falta de conexão entre os poros no solo, criando caminhos e galerias, enquanto se alimentam e se reproduzem (Lavelle & Spain, 2006).

As espécies de minhocas podem ser classificadas em categorias ecológicas (Bouché, 1977): epigeicas, anécicas e endogeicas. A *Pontoscolex corethrurus* é endogeica e este grupo não apresenta pigmentação e raramente deixa o solo. A família Glossoscolecidae é endêmica na Região Neotropical e a *P. corethrurus* é uma das poucas espécies peregrinas desta família (Hamoui, 1991). A *P. corethrurus* foi descrita por um naturalista alemão, Fritz Muller, em 1857, entre indivíduos coletados em Itajaí, no estado de Santa Catarina, que registrou o seguinte comentário: “é a minhoca mais comum neste país,... pode ser encontrada em quase todos os torrões de terra arável” (Brown et al., 2006).

Minhocas peregrinas são nativas de um país, mas que colonizaram locais fora da sua área de distribuição natural. Já as espécies invasoras são aquelas introduzidas deliberadamente ou não intencionalmente (normalmente transportadas pelos homens), fora do seu habitat natural, que se estabelecem sucessivamente num local, competindo com as minhocas nativas, se presentes. A *P. corethrurus* pode ser considerada peregrina e invasora, tendo em vista que é encontrada fora do seu centro presumível de origem (Brown et al., 2006). Mesmo dentro de uma área de ocorrência natural, a *P. corethrurus* pode ter preferência por certos tipos de solos e de manejo. Em estudo que avaliou os efeitos de três sistemas de cultivos nas propriedades químicas, nas comunidades de minhocas e na taxa de decomposição da matéria orgânica dos solos no México tropical, a espécie *P. corethrurus* só foi encontrada em dois deles: na plantação de bananas e no sistema agro-florestal. Nenhum exemplar desta espécie foi encontrado na floresta, terceiro sistema avaliado (Geissen et al., 2009).

Esses anelídeos são engenheiros edáficos que constroem estruturas e que permitem a manutenção adequada das condições para o seu crescimento (Jouquet et al., 2006). No entanto, algumas espécies endogeicas podem ser consideradas engenheiras acidentais, já que seu trabalho no solo aparentemente não tem reflexo direto no seu crescimento. Parece ser o caso das minhocas que comem pequenos agregados e excretam coprólitos maiores, e que posteriormente não podem ser reingeridos. Uma vez exaurido o estoque de pequenos agregados, elas sofrerão extinção e/ou se deslocarão para os arredores que possuem agregados menores (Rossi, 2003).

A dieta das minhocas consiste principalmente em material orgânico em vários estágios de decomposição (Lee, 1985). A mistura matéria orgânica e mineral, em variadas proporções, passa pelo trato intestinal e é excretada na forma de coprólitos, modificando a agregação do solo e contribuindo para disponibilidade de nutrientes. Hernández-Castellanos et al. (2010) cultivaram *P. corethrurus* em laboratório e observaram que a produção de coprólitos foi maior nos solos com menor teor de matéria orgânica.

Em solo intensamente povoado por *P. corethrurus* pode-se chegar a ingestão anual de 400 Mg de solo seco por hectare (Barois et al., 1993). Estes autores estudaram a estrutura do solo antes e após a ingestão por esta espécie de minhocas usando microscopia eletrônica de varredura e de transmissão e observaram que a desagregação que ocorria no tubo digestivo era acompanhada por um acréscimo de água e polissacarídeos livres (muco intestinal). Esta estratégia tem como objetivo facilitar a multiplicação dos microrganismos presentes no solo, que através da produção de enzimas, promovem a degradação da matéria orgânica. As substâncias mais simples formadas a partir da ação da microbiológica são assimiladas pela minhoca, que não produz as enzimas necessárias para degradar os materiais mais recalcitrantes.

Bartz et al. (2010) realizaram estudo com *P. corethrurus* em diferentes sistemas de manejos (mata nativa, dois agroecossistemas de plantio direto e uma pastagem) e constataram que houve aumento nos valores de pH e os coprólitos produzidos foram significativamente enriquecidos por cátions trocáveis, carbono orgânico total (COT), P e S, comparados com o solo controle. Além do efeito direto da passagem do solo pelo trato intestinal das minhocas, a colonização dos coprólitos por vários organismos pode alterar suas características químicas após sua excreção. Os coprólitos da maioria das espécies de minhocas são excretados com diversos microrganismos (nematóides, protozoários, fungos, bactérias) e variáveis proporções de restos vegetais, dependendo do hábito alimentar. Conforme os coprólitos envelhecem e se estabilizam, a dominância de diferentes organismos também pode mudar (Brown, 1995), embora a importância destas mudanças para os atributos químicos e função dos coprólitos ainda seja desconhecida (Bartz et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as possíveis mudanças em características químicas e físicas com a passagem do solo no trato intestinal de minhocas (*Pontoscolex corethrurus*).

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Montagem e condução do experimento

Foram coletadas amostras em três tipos de solos, um Neossolo Litólico (RL), um Cambissolo Háptico (CX), e um Neossolo Quartzarênico (RQ) (Quadro 1), em novembro de 2007, no município de Adrianópolis (PR), Região Metropolitana de Curitiba, vale do rio Ribeira, divisa com o estado de São Paulo. Coletou-se cerca de 10 kg de cada solo, nas profundidades de 0 a 10 e 20 a 40 cm. O solo foi seco ao ar, macerado e passado em peneiras de malha de 2 mm para obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA).

Quadro 1. Localização, classificação e material de origem dos solos

Classe de Solo	Símbolo	UTM (22J)		Altitude	Material de origem
		N-S (m) Latitude	E-W (m) Longitude		
Neossolo Litólico	NL	7267313 S	711502 W	546 m	Rochas carbonáticas/ granitos e gnaisses
Cambissolo Háptico	CX	7268164	711513	326 m	Rochas carbonáticas/ granitos e gnaisses
Neossolo Quartzarênico	RQ	7268671	711572	202 m	Quartzitos

As minhocas foram coletadas na Fazenda Experimental do Canguiri, da Universidade Federal do Paraná, em Pinhais (PR), Região Metropolitana de Curitiba.

As unidades experimentais foram constituídas por um recipiente plástico com tampa, com aproximadamente 300 cm³ de solo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições: 3 solos x 2 profundidades x 2 densidades populacionais de minhocas (com e sem minhocas) x 3 repetições, completando 36 unidades experimentais. A TFSA foi depositada no recipiente plástico, colocando-se uma fina camada de solo de aproximadamente 1,5 cm de espessura, para facilitar o recolhimento dos coprólitos na superfície.

O expurgo do solo original, para garantir a limpeza do trato intestinal dos anelídeos e para não contaminar o solo das unidades experimentais, foi realizado em duas etapas: i) minhocas adultas, identificadas pelo clitelo, foram colocadas em recipiente plástico revestido com papel toalha umedecido. Os anelídeos ficaram nesta condição por cerca de dois dias; ii) as minhocas foram colocadas nas devidas unidades experimentais (cinco indivíduos por recipientes) e as duas primeiras coletas de coprólitos foram descartadas.

O solo foi irrigado com 70% da sua capacidade de campo (umidade que foi mantida durante todo o experimento) e os anelídeos permaneceram em local escuro e em temperatura ambiente. As coletas de coprólitos foram realizadas na superfície do solo, a cada dois dias, com o auxílio de uma pinça. Em seguida, as amostras foram secas em estufa por 48 h a 40 °C e armazenadas para a realização das análises. Os coprólitos foram facilmente identificados porque eram mais alongados, compactos e apresentavam a superfície externa lisa quando comparados aos agregados do solo natural, menores que 2 mm. Nos coprólitos havia sempre uma diferença de contraste entre a superfície externa e o material interno, que tinha a mesma coloração do solo natural, assim como observado por Barois et al. (1993).

As minhocas foram mantidas nessas condições até a obtenção de quantidade suficiente de coprólitos para as análises físicas e químicas: período de incubação próximo a 4 meses (de março a julho de 2008). As minhocas que morreram durante a condução do experimento foram repostas por minhocas vivas que passaram pelo mesmo processo de expurgo do solo original.

Ao final, o experimento foi desmontado e as amostras de solo que não receberam as minhocas (18 unidades) foram secas por 48h a 60°C e passadas em peneira de malha de 2 mm (Terra Fina Seca em Estufa - TFSE) (amostras controle). Já o solo do restante das unidades experimentais (18 unidades) foi descartado, pois nessa condição, consideraram-se apenas os coprólitos previamente coletados e secos em estufa, que também foram moídos e passados em peneiras de 2 mm.

Análises químicas

Amostras de TFSE, em suas duas fases (sem minhocas ou controle e coprólitos) foram analisadas conforme metodologia descrita em Embrapa (1997): pH em água, na relação solo/solução 1:2,5; acidez potencial não trocável (H), extraída com solução de acetato de Ca 0,5 mol L⁻¹ a pH 7,0; teores trocáveis de Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺, extraídos com KCl 1 mol L⁻¹ e teores disponíveis de P e K⁺, extraídos com solução de H₂SO₄ 0,05 mol L⁻¹ e HCl 0,025 mol L⁻¹ (Mehlich-1).

Para a determinação do carbono orgânico total (COT) pesou-se 0,015 g de solo previamente seco em estufa a 40° C e passado em peneira de malha de 0,25 mm. Em seguida, as amostras foram colocadas em barcaças de estanho e dobradas de modo a formarem pequenas cápsulas quadradas. Posteriormente, as concentrações de carbono total foram

medidas por combustão no analisador de CNHS elementar, modelo Vario EL III (Elementar, Hanau, Alemanha).

O nitrogênio total (NT) foi analisado através do método adaptado de Kjeldahl, em que 1 g de TFSE foi digerido em tubos com capacidade para 80 mL com pastilha de 1 g de CuSO_4 e K_2SO_4 combinados, como catalisador, e 7,5 mL de H_2SO_4 concentrado. A temperatura do bloco digestor foi elevada na taxa de 50 °C por hora até 350 °C, na qual permaneceu até que a amostra apresentasse coloração clara ou esverdeada, e a mistura, após resfriamento, foi transferida para balão de 100 mL. Foi retirada uma alíquota de 10 mL do extrato digerido, a qual foram adicionadas 2 gotas de vermelho de metila, 10 mL de H_2SO_4 0,125 mol L⁻¹ e 10 mL de NaOH 10 mol L⁻¹. Tal mistura foi destilada e titulada com NaOH para obtenção do teor de NT do solo (Jackson, 1970).

Análises físicas do solo

A análise textural (controle e coprólito) foi realizada pelo método da pipeta, após remoção prévia da matéria orgânica com H_2O_2 30% (v/v), segundo procedimento da Embrapa (1997).

Para determinação de argila dispersa em água e grau de floculação (Embrapa, 1997, com modificações), colocaram-se 5 g de TFSE em recipiente plástico e adicionaram-se 12,5 mL de água. A suspensão foi agitada com bastão de vidro e deixada em repouso por uma noite. Em seguida, a suspensão foi agitada em agitador elétrico tipo “stirrer” por 2,5 minutos. Passou-se o conteúdo através de peneira de malha de 0,053 mm, colocada sobre funil apoiado em um suporte, tendo logo abaixo uma proveta de 250 mL, para coleta das frações argila e silte. Completou-se o volume da proveta até 100 mL, agitou-se por cerca de 20 segundos e mediu-se a temperatura. Deixou-se a suspensão em repouso por 3 horas e 28 minutos e pipetou-se uma alíquota de 20 mL, introduzindo a pipeta a uma profundidade de 5 cm. O líquido foi colocado em um béquer previamente tarado e identificado. O conteúdo foi seco em estufa a 105° C.

Análise estatística

Consideraram-se os tratamentos como dispostos em delineamentos inteiramente casualizados, com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância usando o “software” SAS (1990) e as médias foram comparadas pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características químicas e a textura dos solos (Quadros 2, 3 e 4) foram determinadas pelo material de origem do local (Quadro 1). Os altos teores de silte (Quadro 3) são compatíveis com o reduzido grau de intemperismo dos solos (Neossolos e Cambissolo), determinado pelo relevo forte ondulado/montanhoso da região. Os solos RL e CX apresentaram textura argilosa, formados por granitos/gnaisses e rochas carbonáticas. Já o solo RQ representou a área de solos arenosos, originados do intemperismo de quartzitos.

A associação de rochas carbonáticas ao material de origem dos solos RL e CX definiu os altos valores de pH e de $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ das amostras (Quadro 4). Os altos teores de argila, associados com a grande ocorrência de esmectita (Kummer, 2008), determinaram elevados valores de capacidade de troca catiônica (CTC pH 7,0) dos solos (Quadro 2).

Os teores de P e K^+ foram significativamente maiores nos coprólitos em relação ao solo que não passou pelo trato intestinal das minhocas (Quadro 2). A elevação da quantidade desses macronutrientes no solo na presença desta espécie de minhoca também foi observada por outros autores (Lee, 1985; Basker et al., 1992; Lagenbach et al., 2002; Bartz et al., 2010). Nos coprólitos, as excreções e secreções liberadas pelas minhocas podem ocasionar alterações nos atributos químicos do solo, uma vez que os teores de nutrientes em forma solúvel são diferentes dos teores no solo adjacente (De Vleeschauwer & Lal, 1981). Os aumentos nos teores de P e K^+ no coprólito podem ser devido a liberação destes nutrientes por materiais orgânicos durante a digestão (Bartz et al., 2010), pois o solo na porção anterior do intestino das minhocas é um meio menos compactado que o solo natural, em que os materiais orgânicos e minerais são dispersos (Barois et al., 1993).

Quadro 2. Teores de P, K^+ e valores de CTC pH 7,0 em função da passagem (coprólito) ou não (controle) dos solos pelo trato intestinal das minhocas

	P (mg kg^{-1})	K^+ ($\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$)	CTC ($\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$)
Coprólito	12,89a	0,23a	25,44a
Controle	8,73b	0,20b	24,88b
CV (%)	23,69	11,76	3,23

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O aumento nos teores de Mg^{2+} nos coprólitos ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$, Quadro 4) compensou a maior retenção de Ca^{2+} nos tecidos das minhocas e menor liberação deste nutriente nos coprólitos (Quadro 3). Como resultado, verificou-se também efeito expressivo das minhocas na soma de bases ($S = \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{K}^+$) dos solos. O pH foi facilmente alterado pela atividade dos anelídeos, algo já observado em outros ensaios (Barois & Lavelle, 1986; Hu et

al. 1998; Cheng & Wong, 2002; Lagenbach et al., 2002). O aumento do pH, de maneira geral tendendo à neutralidade (Quadro 4), trata-se de uma regulação interna da minhoca, que pode ser atribuído à excreção de NH_3 no intestino ou pela excreção de CaCO_3 das glândulas calcíferas presentes na faringe quando o solo é ingerido (Kale & Krishnamoorthy, 1980; Lee 1985; Bartz et al., 2010; Hernández-Castellanos et al., 2010). Para isso, possivelmente, a minhoca absorveu maior quantidade de Ca (Quadro 3), para produzir CaCO_3 e elevar o pH do coprólito (Quadro 4). Como o extrator $\text{KCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ não apresenta propriedades ácidas e tamponantes, o Ca^{2+} liberado na forma de carbonato possivelmente não foi solubilizado. Já em solos com menores teores de Ca^{2+} trocável (abaixo de $5,0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$), Bartz et al. (2010) observaram incremento do nutriente no coprólito. Na amostra em profundidade no solo arenoso (RQ), os teores de $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ aumentaram de 2,00 para $3,87 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ($p < 0,05$) (Quadro 4). Esse comportamento pode ser importante em solos mais pobres pela concentração de nutrientes nos coprólitos, o que pode favorecer a absorção das raízes que crescem nos canais deixados pelas minhocas. A *P. corethrurus* é uma espécie muito bem adaptada a diferentes manejos em agroecossistemas, tolerante a grandes variações de fatores ambientais e/ou edáficos, entre eles suporta concentrações muito baixas de nutrientes, matéria orgânica e nitrogênio do solo (Fragoso et al., 1999).

Não houveram diferenças significativas nos teores de nitrogênio total (NT) para a maioria das amostras (Quadro 4). Mesmo comportamento foi observado por Bartz et al. (2010). Barois et al. (1999) observaram que as espécies nativas de minhocas possuem maior capacidade de assimilação do N quando comparadas com espécies exóticas, como a *P. corethrurus*. No entanto, Hernández-Castellanos et al. (2010) observaram aumento dos teores de NT nos coprólitos da mesma espécie usada no presente estudo e o associou com a ação dos nefrídeos e a atividade microbiana intensa no intestino das minhocas. Curry & Schmidt (2007) verificaram que existe assimilação preferencial do N da liteira pelas minhocas anécicas quando comparadas com as espécies endogeicas, e a maioria dos indivíduos de todos os grupos ecológicos utilizam a liteira, matéria orgânica da superfície, como fonte de C e N.

Para o carbono orgânico total (COT) na camada superficial verificou-se efeito positivo da passagem do solo pelo trato intestinal das minhocas apenas no solo arenoso (RQ) (Quadro 4). Nesse mesmo solo, na camada de 20 a 40 cm, mesmo ingerindo mais matéria orgânica, devido aos baixos teores naturais, a diferença não foi significativa. Possivelmente, dada à pobreza do ambiente, as minhocas promoveram a ingestão seletiva de resíduos orgânicos

nesse solo. Fato já observado em estudo no qual a ingestão de solo e produção de coprólitos foi inversamente relacionada ao teor de matéria orgânica em três tipos de solos, como uma forma de compensação para o baixo estado nutricional destes ambientes (Hernández-Castellanos et al., 2010). Minhocas endogeicas parecem ser capazes de reconhecer microregiões dentro do solo com altos teores de C (Barois et al. 1999).

Quadro 3. Valores de atributos físicos e químicos em função da passagem (coprólito) ou não (controle) do solo pelo trato intestinal das minhocas (interação dupla solo e coprólito)

	Solo ⁽¹⁾			Solo ⁽¹⁾		
	RL	CX	RQ	RL	CX	RQ
	Ca (cmol _c kg ⁻¹)			Soma de bases (cmol _c kg ⁻¹)		
Coprólito	14,67b	28,93b	1,33a	24,71a	40,06a	2,74a
Controle	16,93a	34,07a	1,40a	23,63b	38,96b	3,18a
CV (%)	7,87			3,71		
	Areia total (g kg ⁻¹)			Areia grossa (g kg ⁻¹)		
Coprólito	134,15a	69,10a	615,13b	41,10a	29,28a	385,26b
Controle	134,93a	64,58a	675,63a	61,21a	34,03a	503,88a
CV (%)	7,25			11,55		
	Areia fina (g kg ⁻¹)			Silte (g kg ⁻¹)		
Coprólito	93,06a	39,81a	229,86a	395,17a	497,14a	222,47a
Controle	73,71b	30,56a	171,76b	339,82b	519,91a	148,60b
CV (%)	9,09			8,73		
	Argila (g kg ⁻¹)			Grau de floculação (g kg ⁻¹)		
Coprólito	470,68b	433,76a	162,40a	745,4b	895,5a	628,8b
Controle	525,26a	415,51a	175,77a	919,1a	925,7a	844,1a
CV (%)	7,37			6,03		

⁽¹⁾ RL – Neossolo litólico; CX – Cambissolo háplico; RQ – Neossolo quartzarênico. Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A areia fina e o silte aumentaram nos coprólitos das minhocas (Quadro 3), dados que ressaltam o efeito de ingestão seletiva destes organismos. No Neossolo quartzarênico (RQ), as minhocas ingeriram preferencialmente as partículas de tamanho intermediário, o que resultou na redução dos teores de areia grossa nos coprólitos. A presença de grãos de areia facilita a assimilação de nutrientes da matéria orgânica, no caso de minhocas que comem a liteira,

provavelmente pelo reforço da função de moagem da moela (Marhan & Scheu, 2005). Este processo pode também contribuir para a quebra das partículas minerais ingeridas (Suzuki et al., 2003). No RQ, a redução nos teores de areia total foi compensada pelo expressivo aumento no teor de silte nos coprólitos. A ingestão seletiva das frações de solo também foi observada por Barois et al. (1993); Bossuyt et al. (2005) e Hernández-Castellanos et al. (2010). Devido à menor opção de ingestão de argila no solo mais arenoso, as minhocas preferiram à ingestão de areia fina e silte no RQ.

Quadro 4. Valores de atributos químicos em função da passagem (coprólito) ou não (controle) do solo pelo trato intestinal das minhocas (interação tripla solo, profundidade e coprólito)

Profundidade (cm)	RL		Solo ⁽¹⁾ CX		RQ	
	0-10	20-40	0-10	20-40	0-10	20-40
	Ca²⁺+Mg²⁺ (cmol_c kg⁻¹)					
Coprólito	25,20a	23,60a	41,07a	38,27a	3,87a	3,87a
Controle	24,00a	22,67a	39,02b	38,00a	4,00a	2,00b
CV (%)	3,74					
	pH					
Coprólito	6,46a	6,48a	7,02a	7,81a	6,13a	6,43a
Controle	6,14b	6,11b	6,85b	7,64b	5,42b	5,30b
CV (%)	0,96					
	Nitrogênio total (g kg⁻¹)					
Coprólito	4,99a	3,56b	5,07a	2,98b	0,85a	0,73a
Controle	5,04a	4,99a	4,84a	3,66a	0,99a	0,88a
CV (%)	8,20					
	Carbono orgânico total (g kg⁻¹)					
Coprólito	48,0a	31,6a	58,8b	43,7b	10,7a	4,1a
Controle	49,8a	29,0b	61,0a	45,2a	8,5b	3,4a
CV (%)	3,52					
	Argila dispersa em água (g kg⁻¹)					
Coprólito	108,97a	130,75a	74,06a	14,22a	59,22a	59,22a
Controle	29,63b	57,20b	34,28a	28,09a	27,21b	25,23b
CV (%)	22,40					

⁽¹⁾ RL – Neossolo litólico; CX – Cambissolo háplico; RQ – Neossolo quatzarênico. Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As minhocas possuem a capacidade de desestruturar os agregados do solo, ao ingeri-los, e por isso aumentaram a quantidade de argila dispersa em água (Quadro 4) e, conseqüentemente diminuíram o grau de floculação (Quadro 3). Este é um dos importantes papéis desempenhado por esses organismos e pode apresentar alguns efeitos negativos no solo. Quando o agregado é quebrado, as partículas menores formadas tendem a se acumular

nos macro e microporos do solo, podendo facilitar o processo erosivo. A destruição dos agregados ocorre pela trituração do solo na moela e depois, na parte anterior do intestino, pelo aumento do conteúdo de água e polissacarídeos que funcionam como um agente de diluição (Barois et al., 1993). Mesmo com menor importância, a elevação do pH e redução no teor de Ca, em relação ao de Mg (Quadros 3 e 4), devem ser considerados no aumento da argila dispersa em água nos coprólitos. O Ca, por seu menor raio iônico hidratado, possui maior poder flocculante que o Mg e a elevação do pH favorece a formação de maior número de cargas negativas nos colóides, levando a dispersão do solo (Alleoni et al., 2009).

2.4 CONCLUSÕES

1. As minhocas aumentaram os teores de P, K⁺ e Mg²⁺ e os valores de pH e CTC total nos coprólitos em relação ao solo natural. Este efeito torna-se ainda mais importante em solos pobres, facilitando a assimilação de nutrientes pelas plantas.

2. No solo mais arenoso (argila < 176 g kg⁻¹) ficou mais evidente a ingestão seletiva de partículas do solo pelos anelídeos: aumento nos teores de carbono orgânico, redução nos teores de areia total (sendo o balanço favorável à ingestão de areia fina) e aumento nos teores de silte nos coprólitos.

3. A única mudança indesejável foi o aumento da argila dispersa em água nos coprólitos, o que pode favorecer a maior erodibilidade dos solos.

2.5 LITERATURA CITADA

ALLEONI, L.R.F.; MELLO, J.W.V. & ROCHA, W.S.D. Eletroquímica, adsorção e troca iônica no solo. In: MELO, V.F. & ALLEONI, L.R.F., eds. Química e mineralogia do solo (Parte II – Aplicações). Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.2., p. 69-129, 2009.

BAROIS, I. & LAVELLE, P. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). Soil Biol. Biochem. 18:539-541, 1986.

BAROIS, I.; LAVELLE, P.; BROSSARD, M.; TONDOH, J.; MARTINEZ, M.; ROSSI, J.; SENAPATI, B.; ANGELES, A.; FRAGOSO, C.; JIMENEZ, J.; DECAËNS, T.; LATTAUD, C.; KANONYO, J.; BLANCHART, E.; CHAPUIS, L.; BROWN, G.G. & MORENO A.G. Ecology of earthworms species with large environmental tolerance and or extended distributions. In: LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L. & HENDRIX P., eds. Earthworms management in tropical agroecosystems. CABI International, Wallingford, UK. p. 57-85, 1999.

- BAROIS, I.; VILLEMIN, G.; LAVELLE, P. & TOUTAIN, F. Transformation of the soil structure through *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta) intestinal tract. *Geoderma*, 56: 57-66, 1993.
- BARTZ, M.L.C.; COSTA, A.C.S.; TORMENA, C.A.; SOUZA JUNIOR, I.G. & BROWN, G.G. Supervivencia, producción y atributos químicos de turrículos de lombrices de tierra producidas em laboratorio en un Latosol rojo distroférico (Oxisol) bajo en diferentes sistemas de manejo. *Acta Zoologica Mexicana (nueva serie)*, No. especial 2. 2010, 2010, no prelo.
- BASKER A.; KIRKMAN, J.H. & MACGREGOR, A.N. The availability of potassium in soil: an incubation experiment. *Biol. Fert. Soil*, 14: 300-303, 1992.
- BOSSUYT, H.; SIX, J.; HENDRIX, P. Protection of soil carbon by microaggregates with earthworm casts. *Soil Biol. Bioch.*, 37: 251-258, 2005.
- BOUCHÉ, M.B. Strategies Lombriennes. *Ecol. Bull.*, 25: 122-132, 1977.
- BROWN, G.G. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant and Soil*, 170: 209-231, 1995.
- BROWN, G.G.; JAMES, S.W.; PASINI, A.; NUNES, D.H.; BENITO, N.; MARTINS, P.T. & SAUTTER, K.D. Exotic, peregrine, and invasive earthworms in Brazil: diversity, distribution, and effects on soils and plants. *Caribbean J. Sci.*, 42: 339-358, 2006.
- CHENG, J. & WONG, H.M. Effects of earthworms on Zn fractionation in soils. *Biol. Fert. Soils*, 36: 72-78. 2002.
- CURRY, J.P. & SCHIMIDT, O. The feeding ecology of earthworms – A review. *Pedobiologia*, 50: 463-477, 2007.
- DE VLEESCHAUWER, D. & LAL, R. Properties of worm casts under secondary tropical forest regrowth. *Soil Sci.*, 132: 175-181, 1981.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro: Embrapa - CNPS, 2 ed., 1997. 209 p.
- FRAGOSO, C.; LAVELLE, P.; BLANCHART, E.; SENAPATI, B.; JIMENEZ, J.; MARTINEZ, M.; DECAËNS, T. & TONDOH, J. Earthworms communities of tropical agroecosystems: origin, structure and influence of management practices. In: Lavelle, P., Brussaard L. & Hendrix P., eds. *Earthworm management in tropical agroecosystems*. CABI International, Wallingford, UK, 1999. p.27-56.
- GEISSEN, V.; PEÑA-PEÑA, K. & HUERTA, E. Effects of different land use on soil chemical properties, decomposition rate and earthworm communities in tropical México. *Pedobiologia*, 53: 75-86, 2009.

HAMOUI, V. Life-cycle and growth of *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) (Oligochaeta, Glossoscolecidae) in the laboratory. R. Écol. Biol. Sol, 28: 469-478, 1991.

HERNÁNDEZ-CASTELLANOS, B.; BAROIS, I.; BROWN, G.G. & GARCÍA-PÉREZ, J.A. Modificaciones químicas inducidas por dos espécies de lombrices geófagas em suelos de Veracruz, México. Acta Zoologica Mexicana (nueva serie), No. especial 2. 2010, 2010, no prelo.

HU, F.; WU, X.Q.; LI, H.X.; WU, S.M. Effects of earthworms and ants on the properties of a red soil. In: Research on the red soil ecosystem. China Agricultural Science and Technology Publishing House, Beijing. p. 276-285, 1998.

JACKSON, M.L. Análisis químico de suelos. 2.ed. Barcelona, Ediciones Omega, 1970. p. 254-267.

JOUQUET, P.; LAGERLOF, D.J.; LAVELLE, P. & LEPAGE, M. Soil invertebrates as ecosystem engineers: Intended and accidental effects on soil and feedback loops. Applied Soil Ecology, 32: 153–164, 2006.

KALE, R.D. & KRISHNAMOORTHY R.V. The calcium content of the body tissues and castings of earthworm *Pontoscolex corethrurus*. Pedobiologia, 20: 309-315, 1980.

KUMMER, L. Mineralogia e fracionamento de metais pesados em solos de área de mineração e processamento de Pb, Adrianópolis-PR. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2008. 140p. (Dissertação de Mestrado).

LAGENBACH, T.; INACIO, M.V.S.; AQUINO, A.M. & BRUNNINGER, B. Influência da minhoca *Pontoscolex corethrurus* na distribuição do acaricida dicofol em um argissolo. Pesq. Agropec. Bras., 37: 1663-1668, 2002.

LAVELLE, P. & SPAIN, A.V. Soil Ecology, ed 2. Amsterdam, Kluwer Scientific Publications, 2006.

LEE, K. E. Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use. London: Academic, 1985. 411 p.

MARHAN, S. & SCHEU, S. Effects of sand and litter availability on organic matter decomposition in soil and in casts of *Lumbricus terrestris* L. Geoderma, 128: 155-166, 2005.

ROSSI, J.P. The spatiotemporal pattern of a tropical earthworm species assemblage and its relationship with soil structure. Pedobiologia, 47: 497–503, 2003.

SAS Institute. Statistical Analysis System. SAS/STAT use's guide (Version 6.0) 3.ed. Carry, 1990. 705p.

SUZUKI, Y.; MATSUBARA, T. & HOSHINO, M. Breakdown of mineral grains by earthworms and beetle larvae. Geoderma, 112: 131-142, 2003.

CAPÍTULO 3 – MUDANÇAS NAS FORMAS DE CHUMBO E MANGANÊS COM A PASSAGEM DO SOLO ATRAVÉS DO TRATO INTESTINAL DE *PONTOSCOLEX CORETHRURUS* (OLIGOCHAETA: ANNELIDA)

RESUMO

Atividades de mineração e industrialização de metais pesados representam perigosas fontes poluidoras do meio ambiente. Nessas condições, animais edáficos, como as minhocas, podem ser usadas como bioindicadores da contaminação do solo e são fáceis de serem coletadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da passagem de solos, de área de mineração e metalurgia de chumbo, pelo trato intestinal de minhocas (*Pontoscolex corethrurus*) sobre as formas de metais pesados (transformação das formas lábeis em formas mais estáveis), utilizando a técnica de extração seqüencial. Foram coletados cinco solos, em duas profundidades, no município de Adrianópolis, PR. As minhocas foram incubadas (quatro meses) e os teores de Pb e Mn foram determinados no solo natural ou controle e nos coprólitos: teores totais e teores em extrações seqüenciais de várias fases - solúvel → trocável → associado aos carbonatos → ligado especificamente à matéria orgânica → ligado especificamente aos óxidos de Fe, Al e Mn de baixa cristalinidade → ligado especificamente aos aluminossilicatos de baixa cristalinidade → residual. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste Tukey ($p < 0,05$). Houve baixa seletividade do extrator acetato de Na (associados a carbonatos), que também extraiu Pb e Mn ligados à matéria orgânica, dificultando a avaliação do efeito da passagem do solo pelo trato intestinal das minhocas sobre essa forma de metais. Os anelídeos reduziram a quantidade de Pb nas frações solúvel e trocável do solo, consideradas mais biodisponíveis ambientalmente. Houve incremento de Pb na forma de óxidos de Fe, Al e Mn de baixa cristalinidade nos coprólitos (adsorção específica), que seria desejável em estudos de remediação. Os teores totais de Mn foram pouco influenciados pela atividade de mineração e metalurgia na área. As minhocas produziram casulos apenas no solo referência (sob mata nativa e distante das atividades de metalurgia de Pb) e absorveram maior quantidade de Pb em seus tecidos no solo mais contaminado e naquele mais arenoso e com menor CTC.

Termos de indexação: minhocas, coprólito, contaminação do solo, extração seqüencial de metais pesados.

SUMMARY: CHANGES IN FORMS OF LEAD AND MANGANESE WITH PASSAGE OF SOIL THROUGH THE *PONTOSCOLEX CORETHRURUS*' INTESTINAL TRACT (OLIGOCHAETA: ANNELIDA)

Mining and industrialization of heavy metals pose dangerous sources of pollution to the environment, especially with regard to the addition of metals to organisms living in the soil. Worms can be used as bioindicators of soil contamination, they are easy to be collected and their addition in the soil is economically viable. The objective of this study was to evaluate the effect of the passage of soil, mining and metallurgy of lead through the intestinal tract of earthworms (*Pontoscolex corethrurus*, the transformation of labile forms to more stable forms, using the sequential extraction technique. We collected five soils in the municipality of Adrianópolis-PR. The earthworms were incubated and analysis were performed on natural soil or control and the earthworm. We analyzed the Pb and Mn. The results were submitted to variance analysis using the software SAS and means were compared by Tukey Test ($p < 0.05$). There was a low selectivity extractor acetate which also drew in Pb and Mn associated with organic matter, making it difficult to evaluate the effect of soil passage through the intestinal tract of earthworms on this form of metal. The earthworms were able to reduce the amounts of Pb in

soluble and exchangeable soil, the most environmentally bioavailable. There was an increase of Pb in the form of Fe, Al and Mn oxides in the amorphous coprolites (specific adsorption). The total contents of Mn were little influenced by the activity of mining and metallurgy in the area. The worms produced cocoons only in the reference soil and adsorbed larger amount of Pb in their tissues in the contaminated soil and than in sandier ones containing less CEC.

Index terms: earthworms, soil contamination, sequential extraction.

3.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as atividades de mineração e industrialização de metais pesados representam perigosas fontes poluidoras do meio ambiente, principalmente no que diz respeito à contaminação dos organismos que vivem no solo. Dentre estes, as minhocas merecem destaque pelo papel que desempenham com o revolvimento do solo, transformação da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes.

Grande parte dos metais pesados lançados no meio ambiente são depositados na camada superficial do solo e se ligam, principalmente, à matéria orgânica (Welch & Lund, 1989; Kabata Pendias & Pendias, 2001; Zhang et al., 2005). Estas ligações tendem a reduzir a mobilidade e a biodisponibilidade desses compostos no ambiente, mas, por outro lado, podem ser absorvidos pelas minhocas na ingestão de solo e degradação da matéria orgânica. Os efeitos da contaminação por esses poluentes nos organismos do solo, relacionados com os processos de decomposição da matéria orgânica, se estendem por vários anos (Lukkari et al., 2004).

A contaminação de solos por metais pesados é geralmente medida pelo teor total desses poluentes (Allen, 2002). Apesar de ser um indicador útil do nível geral de contaminação do solo, teores totais, não correspondem ao metal biodisponível e, assim, à real toxicidade do poluente aos organismos e ao potencial de contaminação das águas superficiais e subterrâneas (Ure et al., 1993; Alloway, 1995; Lukkari et al., 2004). A distribuição dos metais nos diversos sítios de adsorção das partículas reativas do solo pode ser usada para estimar a sua biodisponibilidade ou prever contaminação ambiental (Bosso & Enzweiler, 2008; Casali et al., 2008). Este tipo de estudo pode ser realizado com o uso da técnica de extração seqüencial, também chamada de fracionamento químico de metais (Tessier et al., 1979; Shuman, 1979; Sposito et al., 1982; Mattiazzo et al., 2001). A extração seqüencial permite obter informações mais detalhadas sobre a origem, o modo de ocorrência, disponibilidade biológica e físico-química, mobilização e transporte dos metais em ambientes naturais (Tessier et al., 1979).

Na extração seqüencial, a mesma amostra é tratada com uma sucessão de reagentes, chamados extratores, com a intenção específica de dissolver suas diferentes fases e assim caracterizar concentrações de metais pesados em cada fração (Pickering, 1981; Lima et al., 2001). Cada extrator seqüencialmente adicionado tem uma ação química mais drástica e de diferente natureza que a anterior (Lima et al., 2001; Nachitigall et al., 2007). A progressão tem início utilizando-se um extrator fraco, como água, e termina com um extrator forte, como um ácido concentrado (Kotas & Stasicka, 2000). O tempo de extração e a relação solo-solução permitem solubilizar a fração específica do elemento da fase sólida, minimizando a interferência nas demais frações (Casali et al., 2008). A seleção de esquema de especiação adequado para cada problemática ambiental constitui, na atualidade, um dos temas fundamentais de estudo neste campo da especiação analítica.

A macrofauna invertebrada do solo desempenha papel chave no funcionamento do ecossistema, pois ocupa diversos níveis tróficos dentro da cadeia alimentar do solo e afeta a produção primária de maneira direta e indireta. Altera, por exemplo, as populações e atividade de microrganismos responsáveis pelos processos de mineralização e humificação da matéria orgânica (Decäens et al., 2003). Diferentes categorias ecológicas de minhocas ingerem várias frações biológicas de solo, entre elas a liteira, microrganismos, húmus, além das frações minerais (argila, silte, areia fina) e resíduos vegetais (Ernst et al., 2008).

Os anelídeos podem ser expostos pelo contato dermal direto aos metais pesados presentes na solução do solo ou pela ingestão da água presente nos poros, partículas de solo e/ou alimentos contaminados (Lanno et al., 2004). Dados na literatura indicam que as concentrações de metais solúveis são os melhores indicadores da contaminação de metais em minhocas (Spurgeon & Hopkin, 1996; Peijnenburg et al., 1999).

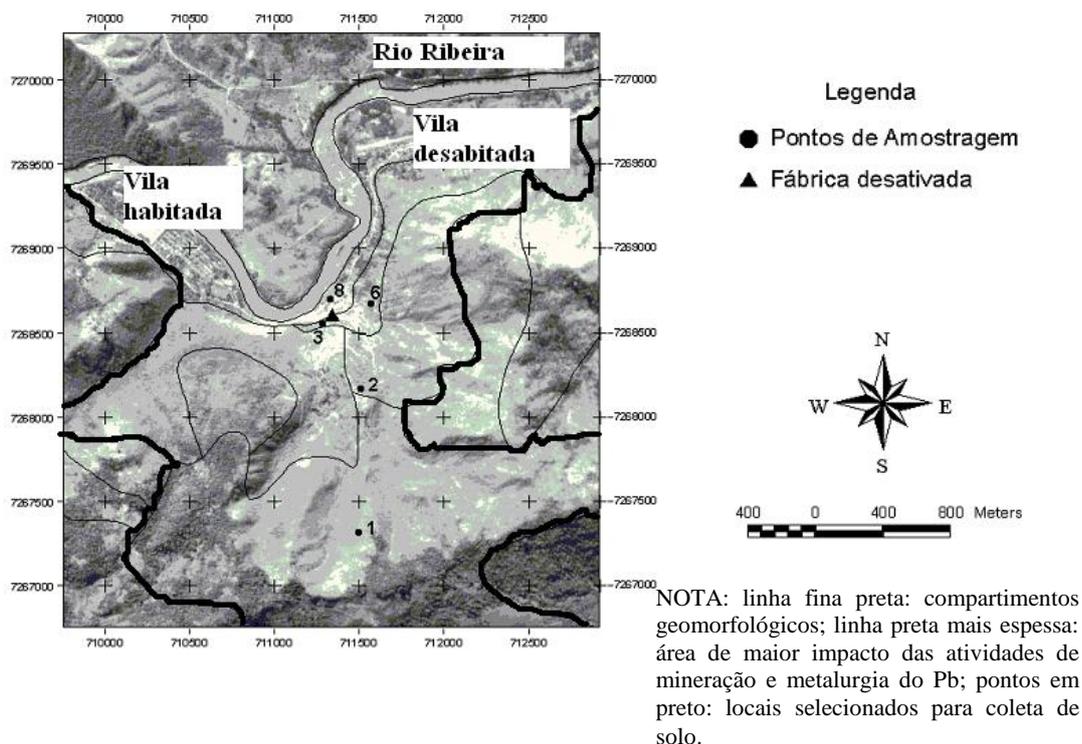
Minhocas podem ser usadas como bioindicadores da contaminação do solo, já que são relativamente fáceis de serem coletadas (Bustos-Obregón & Goicochea, 2002). Além de terem efeitos fundamentais na estrutura do solo, na fertilidade e no crescimento de plantas, ainda influenciam a mobilidade de metais no solo através de suas atividades de escavação e alimentação. A mistura e quebra dos agregados do solo, materiais húmicos e detritos no intestino das minhocas aumentam a imobilização dos metais (Wong & Ma, 2008). Baseado na sua importância ecológica e contínua exposição ao solo, a resposta das minhocas ao longo prazo de contaminação por metais pesados poderia fornecer importantes informações para a avaliação de risco de contaminação ambiental (Lukkari et al., 2004).

Portanto, o presente trabalho foi realizado para avaliar o efeito da passagem de solo de área de mineração e metalurgia de Pb pelo trato intestinal de minhocas (*Pontoscolex corethrurus*) sobre as formas de Pb e Zn (transformação das formas lábeis em formas mais estáveis), utilizando a técnica de extração seqüencial.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo e coleta de amostras de solo

O estudo foi desenvolvido a partir de cinco perfis de solos de diferentes locais dentro de uma área de mineração e metalurgia de Pb (Figura 1 e Quadro 1), no município de Adrianópolis (PR), Região Metropolitana de Curitiba, vale do rio Ribeira, divisa com o estado de São Paulo. Após 50 anos de atividades de mineração e metalurgia de primeira fusão de Pb, a partir de veios de galena (PbS), em 1995, a mineradora encerrou suas atividades deixando a céu aberto, sem nenhuma proteção, cerca de 177 Gg de resíduos de beneficiamento (Eysink, 1988; Cassiano, 2001).



Base cartográfica: Carta de Apiaí, IBGE, Secretaria de Planejamento da Presidência da República.
Sistema de Projeção: Universal Transversa de Mercator. Datum: SAD-69.

Figura 1. Foto aérea georeferenciada com os compartimentos geomorfológicos, a localização da fábrica desativada e os solos amostrados.

Na área foi evidente a grande degradação do ambiente, com ocorrência de intenso processo erosivo, facilitado pelo relevo acidentado, com extensas áreas onde as escórias e os rejeitos sólidos foram espalhados sobre o solo, grande número de bocas de túneis de mineração e estradas abandonadas, antes usadas para o transporte de minérios. A fábrica desativada encontrava-se em avançado processo de sucateamento, com grande ocorrência de resíduos sólidos, líquidos e particulados (poeiras) oriundos do processo industrial. O risco de contaminação ambiental da área é potencializado pela proximidade desses rejeitos com o leito do rio Ribeira (Figura 1).

A quadrícula de Adrianópolis apresenta geologia complexa, com as seguintes formações e litologias, em ordem decrescente de ocorrência (Oliveira et al., 2002): 1) complexos granitóides (Três Córregos e Cunhaporanga); 2) dolomitos e carbonatos com baixo grau metamórfico; 3) rochas vulcano-sedimentar, com domínio de rochas psamo-pelíticas; 4) carbonatos e rochas psamo-pelíticas; 5) gnaisses variados, xistos e quartzitos de baixo a médio grau metamórfico e; 6) metabrechas, metaconglomerados e metapelitos.

No Quadro 2 são apresentadas as características químicas e texturais do solo e mineralogia da argila realizadas por Kummer (2008), que coletou amostras nos mesmos pontos do presente estudo.

Quadro 1. Localização, classificação dos solos e características dos locais de amostragem identificadas a campo

Solo	UTM (22J)		Altitude (m)		Observações
	N-S (m) Latitude	E-W (m) Longitude			
1	7267313 S	711502 W	546	Neossolo Litólico	Solo de referência sob mata nativa. Graças a grande distância (1.560 m) altitude do local em relação à fábrica (diferença de cota de 380 m), não havia evidências da influência direta das atividades de mineração no solo. Material de origem: rochas carbonáticas/complexos granitóides.
2	7268164	711513	326	Cambissolo Háplico	Posição intermediária da encosta, com evidência de deposição de colúvio mais rejeitos da metalurgia vindo das partes mais altas. Cobertura vegetal composta por grama batatais (<i>Paspalum notatum</i>) na maior parte da sua extensão. Material de origem: rochas carbonáticas/complexos granitóides.
3	7268555	711287	165	Neossolo Litólico	Próximo à fábrica (Figura 1), com os horizontes do solo preservados e sem incorporação de rejeitos sólidos da metalurgia. Perfil na base da encosta. Solo com potencial (proximidade da fábrica e localizado no sentido de caminhamento dos ventos) de adição de Pb particulado, por meio da emissão de fumaça pelas chaminés. Cobertura vegetal composta por árvores da família das leguminosas (<i>Leucaena sp.</i>) Material de origem: rochas carbonáticas/complexos granitóides.
6	7268671	711572	202	Neossolo Quartzarênico	Idem solo 3, exceto pelo material de origem que é quartzito e pela cobertura vegetal: mata secundária e samambaias (<i>Pteridium aquilinum</i>).
8	7268701	711331	157	Neossolo Flúvico	Faixa entre a fábrica e o rio Ribeira e relevo praticamente plano. Solo com potencial de contaminação pela passagem da água pluvial pela fábrica, que escorre em direção ao rio Ribeira. Pouca cobertura vegetal (algumas plantas da família das Poaceae). Material de origem: sedimentos arenosos (fluviais).

⁽¹⁾ resíduo de mineração e metalurgia de chumbo intimamente misturados ao solo; devido a falta de horizontes pedogenéticos, não foi possível classificar os perfis de solos.

Quadro 2. Análises químicas e textural da TFSA e mineralógicas da fração argila das amostras dos solos⁽¹⁾

Amostra	pH H ₂ O	CTC pH 7,0	CO	Areia	Argila	Ct	Gb	Hm	Gt	Amorfo	ES	EHE
		cmol _c dm ⁻³	g dm ⁻³	g kg ⁻¹								
1 (0-10 cm)	6,7	31,7	45,0	162	477	537	36	20	8	56	nq	nq
1 (20-40 cm)	6,8	31,2	26,9	170	516	534	33	19	4	50	nq	nq
2 (0-10 cm)	6,6	34,7	37,7	98	441	439	51	10	21	58	nq	nq
2 (20-40 cm)	7,7	30,5	19,0	89	440	442	40	11	32	45	nq	nq
3 (0-10 cm)	6,9	29,2	45,6	204	434	534	44	14	12	54	nq	-
3 (20-40 cm)	6,8	28,9	37,7	188	424	519	41	22	18	26	nq	-
6 (0-10 cm)	4,9	7,5	11,8	730	124	526	21	0	41	58	-	-
6 (20-40 cm)	4,6	3,5	6,3	777	64	494	24	0	41	75	-	-
8 (0-10 cm)	8,3	13,3	20,8	586	149	502	32	0	39	72	nq	nq
8 (20-40 cm)	8,2	21,9	17,8	353	318	538	22	8	35	80	nq	nq

⁽¹⁾ CO - carbono orgânico; Ct – caulinita; Gb – gibbsita; Hm – hematita; Gt – goethita; Material amorfo - extração com oxalato de amônio 0,2 mol L⁻¹; ES – esmectita; EHE - EHE - esmectita com hidróxi-Al entrecamadas. nq - mineral apenas identificado por DRX (análise qualitativa). - ausência de reflexão por DRX.

Fonte: Modificado de Kummer (2008).

Montagem e condução do experimento

Coletou-se cerca de 10 kg de cada solo, nas profundidades de 0 a 10 e de 20 a 40 cm. O solo foi seco ao ar, macerado e passado em peneiras de malha de 2 mm para obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA).

As minhocas (*Pontoscolex corethrurus*) foram coletadas na Fazenda Experimental do Canguiri, da Universidade Federal do Paraná, em Pinhais (PR), Região Metropolitana de Curitiba. Foram coletados cerca de 220 exemplares da espécie, sendo que 150 foram imediatamente utilizados no experimento e o restante foi incubado em bandeja com solo para reposição das minhocas mortas durante o experimento.

As unidades experimentais foram constituídas por um recipiente plástico com tampa, com aproximadamente 300 cm³ de solo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições: 5 solos x 2 profundidades x 2 densidades populacionais de minhocas (com e sem minhocas) x 3 repetições, totalizando 60 unidades experimentais. A TFSA foi depositada no recipiente plástico, colocando-se uma fina camada de solo de aproximadamente 1,5 cm de espessura, para facilitar o recolhimento dos coprólitos na superfície.

O expurgo do solo original, para garantir a limpeza do trato intestinal dos anelídeos e para não contaminar o solo das unidades experimentais, foi realizado em duas etapas: i) minhocas adultas, identificadas pelo clitelo, foram colocadas em recipiente plástico revestido com papel toalha umedecido. Os anelídeos ficaram nesta condição por cerca de dois dias; ii) as minhocas

foram colocadas nas devidas unidades experimentais (cinco indivíduos por recipientes) e as duas primeiras coletas de coprólitos foram descartadas.

O solo foi irrigado com 70% da sua capacidade de campo (umidade que foi mantida durante todo o experimento) e os anelídeos permaneceram em local escuro e em temperatura ambiente. As coletas de coprólitos foram realizadas na superfície do solo, a cada dois dias, com o auxílio de uma pinça. Em seguida, as amostras foram secas em estufa por 48 h a 40 °C e armazenadas para a realização das análises. Os coprólitos foram facilmente identificados porque eram mais alongados, compactos e apresentavam a superfície externa lisa quando comparados aos agregados do solo natural, menores que 2 mm. Nos coprólitos havia sempre uma diferença de contraste entre a superfície externa e o material interno, que tinha a mesma coloração do solo natural como observado por Barois et al. (1993). Os casulos produzidos na superfície dos solos também foram coletados.

As minhocas foram mantidas nessas condições até a obtenção de quantidade suficiente de coprólitos para as análises físicas e químicas: período de incubação próximo a 4 meses (de março a julho de 2008). As minhocas que morreram durante a condução do experimento foram repostas por minhocas vivas que passaram pelo mesmo processo de expurgo do solo original.

Ao final, o experimento foi desmontado e as amostras de solo que não receberam as minhocas (30 unidades) foram secas por 48 h a 40 °C e passadas em peneira de 2 mm (Terra Fina Seca em Estufa - TFSE) (amostras controle). Já o solo do restante das unidades experimentais (30 unidades) foi descartado, pois nessa condição consideraram-se apenas os coprólitos previamente coletados e secos em estufa, que também foram moídos e passados em peneiras de 2 mm.

As minhocas sobreviventes foram quantificadas e novamente colocadas em potes plásticos com tampa e papéis úmidos por cerca de dois dias, para o expurgo do intestino. Em seguida, os anelídeos foram mortos em solução de água e álcool, secos a 105 °C por 24 h, pesados e moídos para determinação dos teores de metais pesados nos tecidos. Nesta etapa consideraram-se apenas as minhocas que estavam vivas ao final do experimento.

Análises de Pb e Mn

Os teores de metais pesados, em diferentes formas, foram determinados nas amostras de solo (TFSE), em suas duas formas (controle ou sem minhoca e coprólitos).

Teores totais de Pb e Mn no solo e nos tecidos das minhocas

A digestão das amostras de TFSE foi realizada em forno de microondas (Milestone Ethos Plus), colocando-se aproximadamente 0,2 g de amostra, na presença de 4 mL de HNO₃, 3 mL de HF concentrados e 1 mL de H₂O₂ 30% (v/v) (Lim & Jackson, 1986, com modificações). Os frascos

foram submetidos a aquecimento por 10 min a uma potência de 1.000 W até atingir a temperatura de 200 ± 2 °C, a qual foi mantida por mais 20 min. Após 30 min de resfriamento das amostras no interior do aparelho, a suspensão foi filtrada para separar possível material residual refratário (p.ex. óxidos de titânio). Aferiu-se a massa do extrato para aproximadamente 15 g com água deionizada. O volume foi determinado com base na massa e densidade do líquido. Os teores de Pb e Mn foram determinados nos extratos por espectroscopia de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES). No momento da leitura dos extratos que utilizaram HF na extração, adicionou-se ácido bórico para eliminar o excesso deste ácido, etapa obrigatória caso a detecção seja feita por alguma fonte de plasma, uma vez que o tubo de quartzo, onde é gerada a tocha, é extremamente sensível ao HF. Para determinação dos teores de Pb e Mn nos tecidos das minhocas seguiram-se as mesmas condições de aquecimento, coleta de extrato e leitura dos metais pesados, digerindo-se 0,2 g de amostra seca a 105 °C por 24 h e moída, com 25 mL de HNO₃ concentrado.

Fracionamento de Pb e Mn nos diferentes constituintes do solo

Os procedimentos adotados para a extração seqüencial estão apresentados, resumidamente, no Quadro 3. A extração seqüencial foi baseada no método descrito por Mann e Ritchie (1993) e Gomes et al. (1997).

Após cada extração, os metais foram determinados conforme já descrito anteriormente (ICP-AES). Outros procedimentos comuns às extrações seqüenciais foram: a) a massa das amostras foi tomada em balança de precisão com quatro dígitos; b) antes das pesagens, para a obtenção da massa seca inicial (antes da extração) e da massa final (após a extração), as amostras foram secas em estufa a 40 °C por 12 h. O controle de redução de massa nas extrações, que normalmente não é considerado nos estudos de extração seqüencial (Tessier et al., 1979; Sposito et al., 1982; Miller et al., 1986), é importante para estimativa correta dos teores de Pb e Mn nas etapas seqüenciais. Tomando apenas a massa inicial de todo o procedimento (1 g), Kummer (2008) observou que os teores de Pb foram subestimados em até 13% na etapa de remoção de carbonatos; c) durante as extrações e lavagens da amostra, a suspensão foi centrifugada a 3500 rpm por 10 min; d) lavagens do resíduo da extração (exceto a fração solúvel) com 10 mL de solução de (NH₄)₂CO₃ 0,5 mol L⁻¹ seguida de 10mL de água deionizada; e) acidificação dos extratos com HNO₃ concentrado (3% de ácido) para evitar a sua deteriorização; f) extratos estocados em frascos de polietileno, para evitar a adsorção dos metais às paredes dos frascos, como alertado por Kim e Hill (1993).

Quadro 3. Procedimento da extração seqüencial para determinação das formas de metais no solo

Fração ⁽¹⁾	Extrator	Solo:Solução ⁽²⁾ (g:mL)	Condições de Extração
Solúvel	H ₂ O destilada e deionizada	1:10	Agitação por 30 min; centrifugação; lavagem do resíduo
Trocável	Ba(NO ₃) ₂ 0,5 mol L ⁻¹	1:10	Agitação por 1h; centrifugação; lavagem do resíduo
Carbonatos	Acetato de sódio 1,0 mol L ⁻¹ a pH 5	1:10	Agitação por 5h; centrifugação; lavagem do resíduo
Matéria Orgânica	Hipoclorito de Sódio 0,7 mol L ⁻¹	1:6	Banho-maria a 90°C por 30 min; centrifugação; lavagem do resíduo
Óxidos de Fe, Al e Mn de baixa cristalinidade	C ₂ H ₈ N ₂ O ₄ 0,2 mol L ⁻¹ + C ₂ H ₂ O ₄ 0,2 mol L ⁻¹ + C ₆ H ₈ O ₆ 0,1 mol L ⁻¹	1:20	Agitação por 4h no escuro; Centrifugação; lavagem do resíduo
Aluminossilicatos de baixa cristalinidade	NaOH 1,25 mol L ⁻¹	1:20	Banho-maria a 75°C por 1h; centrifugação; lavagem do resíduo
Residual	HF conc + HNO ₃ conc + H ₂ O ₂ 30%	0,2:8	Digestão em microondas a 200°C

⁽¹⁾ Fração solúvel; Fração trocável; Fração associada aos carbonatos; Fração orgânica; Fração de metais ocluídos ou fortemente adsorvidos nos óxidos de Fe, Al e Mn de baixa cristalinidade; Fração de metais ocluídos ou fortemente adsorvidos aos aluminossilicatos de baixa cristalinidade; Fração residual. ⁽²⁾ Da etapa de carbonatos até aluminossilicatos a massa do resíduo foi inferior a 1g devido a remoção de amostra com a respectiva extração, o que tornou a relação solo:solução um pouco mais ampla.

Os detalhes metodológicos da análise seqüencial são apresentados a seguir:

Fração solúvel: alíquotas de aproximadamente 1g de TFSE foram colocadas em tubos de centrífuga com capacidade de 100 mL. Em seguida, foram transferidos 10 mL de água destilada e deionizada em cada tubo e procedeu-se agitação em agitador horizontal a 180 rpm por 30 minutos.

Fração trocável: 10 mL de solução de Ba(NO₃)₂ 0,3 mol L⁻¹ foi adicionado a cada tubo contendo o resíduo da etapa anterior e procedeu-se agitação em agitador horizontal a 180 rpm por 60 minutos.

Fração ligada aos carbonatos: 10 mL de solução de acetato de sódio 1,0 mol L⁻¹, pH 5 (ajustado com ácido acético), foram adicionados ao resíduo da extração anterior, que foi ressuspenso, e procedeu-se agitação em agitador horizontal a 180 rpm por 5 horas.

Fração ligada à matéria orgânica: 6 mL de solução de hipoclorito de sódio 0,7 mol L⁻¹ foram adicionados ao tubo de centrífuga e o resíduo foi ressuspenso e levado a banho-maria a 90°C por 30 min.

Fração ligada aos óxidos de Fe, Al e Mn de baixa cristalinidade: ao tubo de centrífuga contendo o resíduo da extração anterior foram adicionados 20 mL de solução mista de oxalato de amônio 0,2 mol L⁻¹ + ác.oxálico 0,2 mol L⁻¹ + ác. ascórbico 0,1 mol L⁻¹. O material sofreu agitação em agitador horizontal a 180 rpm durante 4 horas.

Fração ligada aos aluminossilicatos de baixa cristalinidade: ao mesmo tubo de centrífuga da etapa anterior foram adicionados 20 mL de NaOH 1,25 mol L⁻¹. O material foi levado a banho-maria a 75°C por 60 minutos.

Fração residual: em vasos de Teflon, foram colocados 0,2 g do resíduo da extração anterior, 3 mL de HF concentrado, 4 mL de HNO₃ concentrado e 1 mL de H₂O₂ (30%). O vaso foi fechado e o material foi digerido em equipamento de microondas conforme descrito anteriormente.

Análise estatística

Consideraram-se os tratamentos como dispostos em delineamentos inteiramente casualizados, com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância usando o “software” SAS (1990) e as médias foram comparadas pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Chumbo

Os maiores teores totais de Pb foram observados no solo 3 (Quadro 4), com acréscimo de concentração em profundidade, atribuídos à grande proximidade com a antiga fábrica (Figura 1). Os materiais particulados resultantes das chaminés depositaram neste local grande quantidade de Pb, pois as partículas emitidas tendem a cair próximas à fonte de emissão. As atividades de mineração e de processamento de minérios sulfetados de Pb produzem, além de rejeitos e escória de forno, emissões gasosas contendo SO₂ e CO e poeiras contendo partículas com 20 a 65% de Pb (Burgess, 1995). O acréscimo no teor de Pb em profundidade também foi em função da coleta do solo ter sido realizada em um barranco (corte de estrada), onde a deposição atmosférica também ocorreu lateralmente. Nos solos 1, 2 e 6 os maiores teores totais de Pb na superfície são atribuídos a sua forte interação aos colóides orgânicos do solo (Sauvé, 2002; Lukkari et al., 2004).

Com exceção do solo 1, considerado referência dos teores naturais de metais pesados na área, o solo 6 apresentou os menores teores de Pb (Quadro 4), o que pode ser atribuído ao elevado teor de areia (único solo formado de quartzito) e pequena quantidade de carbono orgânico, o que determinou baixos valores de CTC (Quadro 2). Geralmente a mobilidade dos metais é maior em solos arenosos, ácidos e com baixa CTC ou estado de oxidação mais elevado (Ross, 1994).

O solo 8, mesmo de textura arenosa/média (Quadro 2) acumulou grande quantidade de Pb (Quadro 4). Possivelmente a água pluvial que passa pela fábrica e pelo solo 8 e deságua no rio Ribeira, apresentava alto teor do metal. Em estudo preliminar (dados não publicados), o teor de Pb total dos resíduos na forma de pó no pátio da fábrica desativada foi da ordem de 200.000 mg kg⁻¹.

Não houve efeito da passagem do solo pelo trato intestinal das minhocas nos teores totais de Pb. Contudo, esse efeito foi observado nas frações de Pb determinados na análise seqüencial. O Pb solúvel no solo 3 foi menor na presença das minhocas (Quadro 5). A fração solúvel é a que melhor descreve a bioacumulação de metais em minhocas (Spurgeon & Hopkin, 1996; Peijnenburg et al., 1999; Vijver et al., 2003; Hobbelen et al., 2006), o que sugere a absorção e acúmulo dessa forma do metal no tecido desses animais.

Quadro 4. Teores totais médios (amostras de coprólito e controle) de Pb e Mn das amostras de solos

Solo	Pb		Mn	
	Profundidade (cm)		Profundidade (cm)	
	0-10	20-40	0-10	20-40
	mg kg ⁻¹			
1	252,3aB	52,1aC	2077,5aA	1811,1bA
2	4277,8aA	3084,1bB	2079,5aA	1918,1aA
3	4377,9bA	9716,1aA	894,4bB	1084,6aB
6	481,8aB	190,6aC	331,3aC	249,0aD
8	3637,0aA	3984,4aB	840,6aB	828,2aC
CV (%)	26,0		12,5	

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas correspondem as linhas e maiúsculas as colunas.

Quadro 5. Teores de Pb nas diferentes frações da extração sequencial das amostras de solos

Prof. (cm)	Fração ⁽¹⁾													
	Pb Sol ⁽²⁾		Pb Troc		Pb Carb		Pb MO		Pb Óx. Amorfo		Pb Aluminos		Pb Res	
	Copr.	Contr.	Copr.	Contr.	Copr.	Contr.	Copr.	Contr.	Copr.	Contr.	Copr.	Contr.	Copr.	Contr.
	mg kg ⁻¹													
Solo 1														
0-10	0,0aB	0,0aB	0,8aA	0,0aA	94,8aA	82,1aA	0,0aA	0,0aA	164,8aA	79,4bA	130,9aA	177,1aA	126,1aA	23,5aA
20-40			0,0aA	0,0aA	26,8aA	22,3aA	0,0aA	0,0aA	113,2aA	0,0bB	54,2aA	59,6aA	33,4aA	3,6aA
Solo 2														
0-10	0,0aB	0,0aB	2,9aA	0,0aA	1751,0aA	1958,7aA	89,1aA	78,4aA	276,1aA	144,4bA	266,2bB	1926,7aA	1450,4aA	1503,2aA
20-40			0,0aA	0,0aA	906,5aB	862,2aB	2,6aB	6,3aB	288,2aA	74,5bB	1908,9aA	2146,0aA	1239,6aA	1038,6aB
Solo 3														
0-10	8,2bA	25,7aA	57,7bB	142,4aA	3028,6bB	3684,8aB	52,7bB	94,3aB	277,2aA	73,8bA	1918,7bB	3444,9aA	1336,9aB	1344,3aB
20-40			145,6aA	111,5bB	5583,5aA	5324,9aA	197,1bA	288,9aA	234,9aA	48,3bA	6926,6aA	1118,8bB	2615,2aA	2901,3aA
Solo 6														
0-10	0,0aB	0,0aB	32,2bA	63,8aA	300,7aA	248,5aA	0,0aA	0,0aA	228,6aA	75,9bA	206,6aA	221,7aA	65,4aA	47,8aA
20-40			14,5aA	34,2aB	85,9aA	65,9aA	0,0aA	0,0aA	153,9aB	122,8aA	23,1aA	34,6aA	23,8aA	28,0aA
Solo 8														
0-10	0,5aB	2,7aB	0,2aA	0,9aA	2332,4aA	2343,5aA	0,0aA	0,0aA	167,3aA	179aA	932,1aA	844,6aA	323,7bA	1707,1aA
20-40			0,0aA	0,8aA	2311,2aA	2457,4aA	0,0aA	0,0aA	179,2aA	201,1aA	954,1aA	1096,2aA	473,0aA	580,1aB
CV (%)	74,1		54,8		10,8		24,1		21,2		16,4		21,1	

⁽¹⁾Pb sol - Pb solúvel; Pb troc - Pb trocável; Pb carb - Pb associado aos carbonatos; Pb MO - Pb ligado à matéria orgânica; Pb Óx. Amorfo - Pb ocluído ou fortemente adsorvido nos óxidos de Fe, Al e Mn de baixa cristalinidade; Pb Aluminos - Pb ocluído ou fortemente adsorvido nos aluminossilicatos de baixa cristalinidade; Pb res. - Pb residual. ⁽²⁾Para o Pb solúvel não houve efeito da profundidade sobre os teores de Pb (apresentação dos valores médios no perfil). Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas correspondem as linhas (comparação apenas das médias para a mesma forma de Pb - coprólito e controle) e maiúsculas as colunas (comparações entre profundidade para mesmo ponto de amostragem, com exceção da fração Pb sol, em que a comparação é entre os pontos de amostragem).

Em ambas as profundidades no solo 6 e na amostra coletada de 0-10 cm no solo 3 os teores de Pb trocável também reduziram no coprólito (Quadro 5). Esse efeito é desejável em termos ambientais, pois as frações solúvel e trocável de metais pesados são mais biodisponíveis e de maior potencial de contaminação das águas subterrâneas por lixiviação. Mesmo com menores teores totais (Quadro 4), a participação das formas trocáveis no Pb total foi mais expressiva nas amostras controles do solo 6 (Quadro 6), resultado de seus menores teores de argila e matéria orgânica (Quadro 2). Com a ingestão do solo pelas minhocas, a participação dos teores trocáveis no Pb total reduziram de 14,3 para 4,6% na amostra de 0-10 cm e de 10,6 a 4,4% de 20 a 40 cm (Quadro 6). Como não houve efeito dos organismos sobre os teores totais de Pb, esse comportamento evidencia a transformação do elemento para formas mais estáveis.

Quadro 6. Contribuição percentual das extrações sequenciais em relação ao Pb total dos solos

Solos	Prof. (cm)	Minhoca	Fração ⁽¹⁾						
			Sol	Troc	Carb	MO	Óx. amorfo	Aluminos.	Res
			%						
1	0-10	Contr.	0,0	0,0	24,2	0,0	27,2	38,8	9,9
1	0-10	Copr.	0,0	0,6	31,5	0,0	33,4	8,9	25,7
1	20-40	Contr.	0,0	0,0	22,5	0,0	0,0	67,6	9,9
1	20-40	Copr.	0,0	0,0	11,4	0,0	49,6	25,7	13,3
2	0-10	Contr.	0,0	0,0	35,6	1,6	1,8	23,4	37,6
2	0-10	Copr.	0,0	0,1	46,5	3,0	7,5	7,3	35,6
2	20-40	Contr.	0,0	0,0	26,8	0,5	2,1	52,0	18,6
2	20-40	Copr.	0,0	0,0	25,2	0,2	6,8	41,3	26,5
3	0-10	Contr.	0,3	1,8	41,5	1,0	0,8	40,5	14,1
3	0-10	Copr.	0,0	0,5	50,4	0,9	4,3	24,5	19,4
3	20-40	Contr.	0,4	1,1	55,7	3,0	0,4	10,5	28,9
3	20-40	Copr.	0,1	0,5	36,6	1,2	1,5	43,7	16,4
6	0-10	Contr.	0,0	14,3	40,7	0,0	10,6	27,2	7,2
6	0-10	Copr.	0,0	4,6	31,8	0,0	41,2	15,9	6,5
6	20-40	Contr.	0,0	10,6	19,9	0,0	46,7	9,1	13,7
6	20-40	Copr.	0,0	4,4	34,7	0,0	39,9	17,8	3,2
8	0-10	Contr.	0,1	0,0	50,3	0,0	3,9	15,2	30,5
8	0-10	Copr.	0,0	0,0	65,0	0,0	4,3	23,7	6,9
8	20-40	Contr.	0,1	0,0	61,3	0,0	3,5	25,9	9,2
8	20-40	Copr.	0,0	0,0	63,6	0,0	4,6	23,1	8,7

⁽¹⁾Pb sol - Pb solúvel; Pb troc - Pb trocável; Pb carb - Pb associado aos carbonatos; Pb MO - Pb ligado à matéria orgânica; Pb Óx. Amorfo - Pb ocluído ou fortemente adsorvido nos óxidos de Fe, Al e Mn de baixa cristalinidade; Pb Aluminos - Pb ocluído ou fortemente adsorvido nos aluminossilicatos de baixa cristalinidade; Pb res. - Pb residual.

O Pb trocável no solo 6 foi estabilizado por adsorção específica (esfera interna) aos óxidos de Fe, Al e Mn de baixa cristalinidade: maiores teores de Pb-Óxido Amorfo nas amostras de coprólitos (Quadro 5). A solução de acetato de Na apresentou baixa seletividade às formas precipitadas com carbonatos e promoveu também a extração de formas de Pb ligados à matéria

orgânica; apenas nos solos 2 e 3 identificou-se Pb na fração orgânica (Quadro 5). Apesar das enumeradas vantagens para o processo de extrações sequenciais, o seu emprego apresenta problemas na interpretação dos dados quando o objetivo é obter previsões exatas sobre os possíveis processos de mobilização dos elementos (Lima et al., 2001). Podem ocorrer problemas de baixa seletividade dos extratores (Shan & Chen, 1993; Shiowatana et al., 2001), redistribuição dos metais durante os processos de extração (Tu et al., 1994; Rakasasalaya et al., 1996) e dependência dos resultados das condições operacionais (Sahuquillo et al., 1999). O ácido acético usado para ajustar o pH da solução em 5,0 (Pb carbonato) dissolve hidróxidos e carbonatos de baixa cristalinidade e também pode extrair metais pesados adsorvidos especificamente à matéria orgânica (Stover, 1976; Amaral Sobrinho et al., 2009).

No solo 6 os valores de pH do coprólito foram significativamente superiores ($p < 0,05$) ao solo controle, com elevação de 5,42 para 6,13 de 0-10 cm e de 5,30 a 6,43 de 20-40 cm (Quadro 4 – Capítulo 2), o que favoreceu a precipitação de Pb na forma de carbonatos. Mesmo a diferença não sendo significativa, os teores de Pb carbonato foram superiores nos coprólitos (Quadro 5). Esse efeito também foi verificado nas amostras dos solos 1 e 2, as quais também apresentaram elevação significativa nos valores de pH com a passagem do solo pelo trato intestinal das minhocas. Acima de pH 6,36 tem-se o predomínio do íon HCO_3^- sobre o H_2CO_3 (Lindsay, 2001; Mello & Perez, 2009), o que favorece a formação de precipitado $\text{Pb}(\text{HCO}_3)_2^0$ e de complexo solúvel $(\text{PbHCO}_3)^+$ (Amaral Sobrinho et al., 2009).

No solo 8, onde os valores naturais de pH eram acima de 8,0 (Quadro 2), os teores de Pb carbonato ficaram muito próximos nos coprólitos e no controle (Quadro 5). Devido a esses elevados valores de pH nesse perfil, a participação da forma Pb carbonato nos teores totais de Pb foi expressiva e variou de 50 a 65% (Quadro 6).

Devido aos altos teores de Pb no solo, mesmo com a possível interferência da solução de acetato de Na a pH 5,0 (Pb carbonato) na fase ligada à matéria orgânica, verificou-se redução significativa nos teores de Pb MO nos coprólitos do solo 3 (Quadro 5). Possivelmente, a digestão de compostos orgânicos no trato digestivo solubilizou formas de Pb anteriormente associadas à matéria orgânica. O acréscimo de água e polissacarídeos livres (muco intestinal) no tubo digestivo favorece a multiplicação de microrganismos do solo ingerido, que por meio da produção de enzimas, promoveram a degradação da matéria orgânica (Barois et al., 1993). Estágios iniciais de degradação da matéria orgânica já seriam suficientes para liberar grande quantidade de Pb adsorvido especificamente. Ao final, o Pb solubilizado da matéria orgânica, possivelmente, foi readsorvido em formas ainda mais estáveis, como nos óxidos de Fe, Al, Mn e aluminossilicatos de baixa cristalinidade, reduzindo a extração com hipoclorito de Na (Pb MO).

O efeito mais expressivo e consistente foi o incremento de Pb na forma de óxidos de Fe, Al e Mn de baixa cristalinidade (extração com solução mista de oxalato de amônio, ácido oxálico e ácido ascórbico) nas amostras de coprólitos (Quadro 5). Como resultado, verificou-se maior participação da forma Pb-Óxido Amorfo nos teores totais do elemento (Quadro 6). Apenas no solo 8 e na amostra de 20-40 cm do ponto 6 não houve efeito nessa forma de Pb pela passagem do solo pelo trato digestivo das minhocas (Quadro 5). A adição de água, produção de muco intestinal e intensa atividade biológica deve ter causado alta demanda de oxigênio, o que favoreceu a redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} e formação dos compostos amorfos nos solos ingeridos. Os teores de materiais amorfos (óx. de Fe, Al e Mn) extraídos com oxalato de amônio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ na fração argila foram baixos e oscilaram de 26 a 80 g kg^{-1} (Quadro 2), o que evidencia a alta reatividade dessa fração coloidal nos solos (alta área superficial específica e CTC). Normalmente, essa adsorção é de natureza específica (complexos de esfera interna), o que tornou essas formas de Pb resistentes à extração com $Ba(NO_3)_2$ (Pb trocável). Possivelmente, a falta de efeito no solo 8 pode ser atribuído aos maiores valores de pH (acima de 8,0) e grande estabilização de Pb na forma de carbonatos.

Lagenbach et al. (2002), inoculando a *P. corethrurus* em um Argissolo por 112 dias, verificaram que os teores de Fe foram até cinco vezes maiores na presença das minhocas do que no solo controle. Bartz et al. (2010) trabalharam com a mesma espécie de anelídeo e também observaram incremento nos teores de Fe amorfo nos coprólitos em relação ao solo controle e atribuíram à transformação do Fe disponível (Mehlich 1) em óxidos de Fe amorfos e livres. Oyedele et al. (2006) observaram que os coprólitos das minhocas possuíam teores mais elevados de óxidos de Fe e Al pouco cristalinos, quando comparados ao horizonte A e B do solo. Esses autores atribuíam à conversão das frações mais cristalinas às formas amorfas mais ativas ao processo de moagem e mistura na moela das partículas de solo ingeridas pela minhoca.

Após as extrações prévias, as formas mais resistentes e estáveis ambientalmente (normalmente na estrutura de minerais e colóides orgânicos) foram removidas com a digestão do resíduo com HF concentrado (Pb residual). De modo geral, não se verificou efeito das minhocas sobre essa forma de Pb (Quadro 5). As menores participações da forma Pb residual nos teores totais do metal foram observadas para o solo 6 (Quadro 6), que apresentou os menores teores de argila (Quadro 2).

Manganês

Os teores totais de Mn variaram de 249,0 a $2079,5 \text{ mg kg}^{-1}$ (Quadro 4), resultado dos materiais de origem e textura dos solos. Melo (1998) também encontrou grande variação nos teores

totais de Mn (27,9 a 1220,3 mg kg⁻¹), em que os solos mais pobres eram originados de sedimentos do Grupo Barreiras e os mais ricos de rochas básicas.

Os teores totais de Mn foram pouco influenciados pela atividade de mineração e metalurgia na área (altos teores no solo 1 - referência), sendo a ocorrência do elemento relacionada, principalmente, a óxidos pedogenéticos na fração argila, como minerais amorfos e cristalinos de Mn (pirolusita, ramsdellita, nsutita, entre outros) (Kämpf et al., 2009).

Na extração seqüencial, os teores de Mn solúvel ficaram abaixo do nível de detecção do método analítico (ICP – AES) em todas as amostras, razão da omissão desses dados no Quadro 7. Por se tratar de um nutriente essencial às plantas e animais, a absorção de Mn pelas minhocas promoveu a redução em seus teores trocáveis nos coprólitos de 20-40 cm nos solos 1 e 3.

Como verificado para o Pb, devido aos altos valores de pH do solo 8, observaram-se altos teores de Mn na extração com acetato de Na (Quadro 7); cerca de 50% dos teores totais do elemento estava associado aos carbonatos (Quadro 8).

Quadro 7. Teores de Mn nas diferentes frações da extração seqüencial das amostras de solos

Prof. (cm)	Fração ⁽¹⁾									
	Mn Troc		Mn Carb ⁽²⁾	Mn MO		Mn Óx. Amorfo ⁽³⁾		Mn aluminos		Mn Res ⁽²⁾
	Copr.	Contr.		Copr.	Contr.	Copr.	Contr.	Copr.	Contr.	
	mg kg ⁻¹									
Solo 1										
0-10	176,2aB	185,6aB	222,8ΘB	0,0aA	0,0aA	2927,8aA	2205,0bA	0,0bB	11,2aA	489,3ΘA
20-40	206,7bA	290,6aA	135,7βB	0,0aA	0,0aA			13,7aA	9,1aA	460,8ΘB
Solo 2										
0-10	46,5aA	46,6aA	122,3ΘC	6,8aA	5,0aA	2373,9aB	1664,9bB	0,0aA	0,9aB	580,4ΘA
20-40	0,0aB	0,0aB	58,5βC	0,0aB	0,0aA			0,0bA	6,7aA	922,2βA
Solo 3										
0-10	64,1aA	56,7aA	80,9ΘD	0,0aB	0,0aB	2145,9aB	1501,8bB	0,0aA	0,0aA	224,9ΘB
20-40	30,9bB	63,3aA	132,8βB	21,4bA	38,5aA			0,0aA	0,0aA	247,3ΘC
Solo 6										
0-10	86,6aA	71,2aA	11,8ΘE	0,0aA	0,0aA	702,8aC	472,2aC	0,0aA	0,0aA	0,0ΘC
20-40	64,0aB	46,7bB	0,0ΘD	0,0aA	0,0aA			0,0aA	0,0aA	0,0ΘD
Solo 8										
0-10	0,0aA	0,0aA	470,8ΘA	0,0aA	0,0aA	467,9aC	341,6aC	0,0aA	0,0aA	202,7ΘB
20-40	0,0aA	0,0aA	479,4ΘA	0,0aA	0,0aA			0,0aA	0,0aA	233,3ΘC
CV (%)	14,2		14,2	97,0		14,5		156,9		31,2

⁽¹⁾Mn troc - Mn trocável; Mn carb – Mn associado aos carbonatos; Mn MO - Mn ligado à matéria orgânica; Mn Óx. Amorfo - Mn ocluído ou fortemente adsorvido nos óxidos de Fe, Al e Mn de baixa cristalinidade; Mn Aluminos - Mn ocluído ou fortemente adsorvido nos aluminossilicatos de baixa cristalinidade; Mn res. – Mn residual. ⁽²⁾Para o Mn carb e Mn res não houve efeito da ingestão do solo pelas minhocas (apresentação dos valores médios de coprólito e controle). ⁽³⁾Para o Mn óx. amorfo não houve efeito da profundidade sobre os teores de Mn (apresentação dos valores médios no perfil). Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas correspondem as linhas (comparação apenas das médias para a mesma forma de Mn – coprólito e controle) e maiúsculas as colunas (Mn troc, Mn MO e Mn aluminos comparações entre profundidade para o mesmo ponto de amostragem; Mn óx. amorfo comparações entre os pontos de amostragem; Mn carb e res: A, B, C, D e E - comparações nas profundidades de 0-10 ou 20-40 cm entre os pontos de amostragem. Θ e β – comparações entre profundidades para o mesmo ponto de amostragem).

Quadro 8. Contribuição percentual das extrações sequenciais em relação ao Mn total dos solos

Solos	Prof. (cm)	Minhoca	Fração ⁽¹⁾						
			Sol	Troc	Carb	MO	Óx. Amorfo	Aluminos	Res
			%						
1	0-10	Contr.	0,0	7,1	9,0	0,0	71,6	0,3	12,0
1	0-10	Copr.	0,0	5,2	6,2	0,0	76,3	0,0	12,4
1	20-40	Contr.	0,0	9,7	4,5	0,0	71,6	0,2	14,0
1	20-40	Copr.	0,0	5,3	4,3	0,0	77,1	0,4	12,9
2	0-10	Contr.	0,0	1,9	4,3	0,1	79,3	0,0	14,4
2	0-10	Copr.	0,0	1,6	4,0	0,1	77,3	0,0	17,0
2	20-40	Contr.	0,0	0,0	2,5	0,0	58,3	0,4	38,8
2	20-40	Copr.	0,0	0,0	2,4	0,0	68,2	0,0	29,5
3	0-10	Contr.	0,0	2,4	4,1	0,0	82,6	0,0	10,9
3	0-10	Copr.	0,0	1,7	4,1	0,0	87,1	0,0	7,1
3	20-40	Contr.	0,0	3,4	6,0	2,0	75,6	0,0	13,1
3	20-40	Copr.	0,0	2,6	5,3	0,4	80,9	0,0	10,8
6	0-10	Contr.	0,0	12,3	1,2	0,0	86,5	0,0	0,0
6	0-10	Copr.	0,0	15,0	2,2	0,0	82,8	0,0	0,0
6	20-40	Contr.	0,0	16,3	0,0	0,0	83,7	0,0	0,0
6	20-40	Copr.	0,0	8,9	0,0	0,0	91,1	0,0	0,0
8	0-10	Contr.	0,0	0,0	47,9	0,0	24,7	0,0	27,4
8	0-10	Copr.	0,0	0,0	53,9	0,0	32,5	0,0	13,6
8	20-40	Contr.	0,0	0,0	52,1	0,0	28,2	0,0	19,7
8	20-40	Copr.	0,0	0,0	47,2	0,0	44,8	0,0	8,1

⁽¹⁾Mn sol – Mn solúvel; Mn troc - Mn trocável; Mn carb – Mn associado aos carbonatos; Mn MO - Mn ligado à matéria orgânica; Mn Óx. Amorfo - Mn ocluído ou fortemente adsorvido nos óxidos de Fe, Al e Mn de baixa cristalinidade; Mn Aluminos - Mn ocluído ou fortemente adsorvido nos aluminossilicatos de baixa cristalinidade; Mn res. – Mn residual.

Para a fração Mn carbonato e Mn residual não se verificou efeito da minhoca sobre os teores do elemento (Quadro 7). Os baixos teores de Mn ligados aos compostos orgânicos também podem ser atribuídos à baixa seletividade do extrator acetato de Na a pH 5,0.

Verificou-se também aumento consistente do Mn associado aos óxidos de Fe, Al e Mn de baixa cristalinidade. O poder de complexação do ácido orgânico de baixo peso molecular usado para determinar essa fase na extração sequencial induziu a dissolução desses óxidos amorfos, o que resulta na liberação direta de Mn. Uma vez que o Mn apresenta menor potencial redox (Mello & Perez, 2009) em relação ao Fe, a sua redução pela passagem no trato digestivo é ainda mais facilitada. Esse mecanismo pode ser, por exemplo, uma adaptação das minhocas para absorção de Fe e Mn em solos pobres nesses micronutrientes. A maior absorção e incorporação de Mn nos tecidos das minhocas foi verificada no solo 6 (Quadro 9), mais pobre nesse elemento. Langenbach et al. (2002) observaram aumento nos teores de Zn, Mn e Cu disponíveis no solo na presença da *P. corethrus*, com incremento da ordem de 3, 5 e 4 vezes em relação ao solo original, respectivamente. Com exceção do solo 8, a participação da forma Mn-Óxido Amorfo nos teores totais do elemento foi muito expressiva, chegando a 91,1% na camada de 20-40 cm no solo 6 nos

coprólitos (Quadro 8). Os óxidos de Mn de maior cristalinidade que resistiram a essa extração foram dissolvidos na etapa residual.

Quadro 9. Teores de Pb e Mn nos tecidos das minhocas

Solo	Pb		Mn	
	Profundidade (cm)		Profundidade (cm)	
	0-10	20-40	0-10	20-40
	mg kg ⁻¹			
1	33,9aB	62,2aBCD	3,4aA	23,6aC
2	788,4aA	617,3aBC	11,5bA	133,1aB
3	900,6aA	1420,7aA	0,0aA	0,0aC
6	567,9bA	1956,6aA	70,0bA	444,1aA
8	760,7aA	829,6aAB	49,0aA	11,6aC
CV (%)	45,2		83,7	

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas correspondem as linhas e maiúsculas as colunas.

Aspectos gerais das minhocas

No solo 3, próximo da chaminé da fábrica (Quadro 1), com os maiores teores de totais de Pb (Quadro 4), os anelídeos apresentaram maior índice de mortalidade, reduzida massa seca das minhocas (Quadro 10) e sinais visíveis de toxidez, possivelmente por Pb (Figura 2).

Quadro 10. Índice de mortalidade e massas viva e seca (média três repetições) das minhocas ao final do experimento

Prof. (cm)	Massa Minhoca (g indivíduo ⁻¹)		Mortalidade (%)
	Viva	Seca	
Solo 1			
0-10	0,75A	0,11A	0,0C
20-40	0,77A		
Solo 2			
0-10	0,33A	0,06B	22,8AB
20-40	0,25A		
Solo 3			
0-10	0,22A	0,05BC	37,3A
20-40	0,29A		
Solo 6			
0-10	0,60A	0,04C	13,1BC
20-40	0,29B		
Solo 8			
0-10	0,36A	0,03C	15,1BC
20-40	0,31A		
C.V. (%)	9,6	19,7	57,4

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5 % de probabilidade: para massa viva a comparação deve ser feita entre profundidades para um mesmo solo (interação dupla) e para os demais parâmetros entre solos (interação simples).



Figura 2. Fotos das minhocas ao final do experimento, evidenciando as alterações morfológicas pela incubação com solo 3.

Outros autores também observaram efeitos negativos de solos contaminados por atividades de mineração e metalurgia de metais pesados sobre a morfologia, densidade populacional e biomassa de minhocas edáficas (Spurgeon & Hopkin, 1999; Lukkari et al., 2004).

No solo 1, tomado como referência, as minhocas apresentavam comportamentos comuns a sua espécie e foi o único solo em que os anelídios formaram casulos. Estes resultados corroboram os obtidos por Barros et al. (2010), que trabalharam com indicadores biológicos de qualidade de solos na mesma área, e constataram que os grupos de Pseudoescorpiones (considerados bons biodincoadores de qualidade de solos - Yamamoto et al., 1994), Mollusca e Isopoda se mostraram muito sensíveis aos altos teores de Pb, sendo encontrados apenas no solo 1, sítio que também apresentou a maior biodiversidade.

Os tecidos das minhocas apresentaram elevados teores de Pb (Quadro 9). No estudo realizado por Barros et al. (2010) os teores de Pb no grupo Formicidae, de ocorrência natural na área, mostraram-se coerentes com a quantidade deste metal nos solos. No presente estudo, a menor absorção de Pb foi no solo 1 (solo referência; Quadro 9), distante das fontes de contaminação da indústria. Por outro lado, na amostra de 20-40 cm do solo 3, que apresentou os maiores teores de Pb

total e disponível (solúvel+trocável) (Quadro 5), o acúmulo do metal nos tecidos dos anelídeos foi expressiva (Quadro 9). A toxidez das minhocas por Pb nesse ponto foi tão intensa que dificultou a absorção de Mn. Em geral, as minhocas são acumuladoras de metais do solo, levando à compartimentalização, armazenamento, ou excreção desses elementos pelos tecidos mais sensíveis. Elas, aparentemente, desenvolveram muito bem atividades de resistência como tráfico específico, vias de armazenamento e capacidade de redistribuição para regular a concentração de metais pesados nos tecidos, o que pode levar ao equilíbrio entre a ingestão e excreção (Dallinger, 1993; Morgan & Morgan, 1999). Esse processo de balanço interno deve funcionar até certo ponto, tendo em vista que em ambiente muito contaminado, como no solo 3, a toxidez por Pb teve efeitos visíveis morfológicos.

Ernst et al. (2008) mostraram que os parâmetros que mais influenciam na acumulação de Pb nas minhocas foram as concentrações do metal em diferentes fontes de alimentos (solo, liteira e raízes) e parâmetros químicos do solo (pH e CTC). No solo 6, apesar dos menores teores totais, a concentração de Pb nos tecidos dos anelídeos foi alta; o baixo valor de CTC (Quadro 2) e a ocorrência de Pb na forma trocável (Quadro 5) favoreceram o acúmulo do metal nos organismos. Outros autores também observaram que os anelídeos conseguem armazenar grande quantidade de metais pesados nos tecidos (Morgan & Morgan, 1998, 1999; Kizilkaya, 2004).

3.4 CONCLUSÕES

1. Houve intensa contaminação com Pb em decorrência das atividades de mineração e metalurgia na área, principalmente nos solos argilosos do entorno da fábrica pela deposição de material particulado das chaminés.

2. O principal problema analítico da extração seqüencial foi a baixa seletividade da solução de acetato de Na que também extraiu Pb e Mn ligados à matéria orgânica, dificultando a avaliação do efeito da passagem do solo pelo trato intestinal das minhocas sobre essa forma de metais.

3. As minhocas conseguiram reduzir os teores de Pb disponíveis (frações solúvel+trocável), principalmente nos solos 3 e 6. Por outro lado, o efeito mais expressivo e consistente foi o incremento de Pb na forma de óxidos de Fe, Al e Mn de baixa cristalinidade nos coprólitos, (adsorção específica). Esse comportamento é indicativo do efeito positivo dos anelídeos na estabilização dos metais pesados e de condições transformadoras no intestino.

4. O aumento do pH nos coprólitos favoreceu a precipitação do Pb ligados aos carbonatos (Pb carb). No solo 8, onde o pH natural do solo estava acima de 8,0, a participação da forma Pb carb. nos teores totais de Pb foi mais expressiva e variou de 50 a 65%.

5. Os teores totais de Mn foram pouco influenciados pela atividade de mineração e metalurgia na área, sendo a ocorrência do elemento relacionada, principalmente, a óxidos pedogenéticos na fração argila, como minerais amorfos e cristalinos de Mn. No solo arenoso, com os menores teores de Mn, verificou-se maior acúmulo do elemento nos tecidos dos anelídeos, o que pode ser interpretado como um mecanismo de resistência em solos pobres em micronutrientes.

6. As minhocas foram sensíveis aos teores de Pb nos solos, com forte toxidez, alto índice de mortalidade e baixa massa viva no solo argiloso do entorno da fábrica.

3.5 LITERATURA CITADA

ALLEN, H.E. Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes, and plants. SETAC, Pensacola, FL, 2002. 176p.

ALLOWAY, B. J. Heavy Metals in Soils. Glasgow, Blackie Academic & Professional, 1995. 368 p.

AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; BARRA, C.M. & LÃ, O.R. Química dos metais pesados no solo. In: MELO, V.F. & ALLEONI, L.R.F., eds. Química e mineralogia do solo (Parte II – Aplicações). Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.2., p.249- 312, 2009.

BAROIS, I.; VILLEMEN, G.; LAVELLE, P. & TOUTAIN, F. Transformation of the soil structure through *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta) intestinal tract. Geoderma, 56: 57-66, 1993.

BARROS, Y.J.; MELO, V.F.; SAUTTER, K.D.; BUSCHLE, B.; OLIVEIRA, E.B.; AZEVEDO, J.C.R. & SOUZA, L.C.P. Indicadores de qualidade de solos de área de mineração e metalurgia de chumbo: II - mesofauna e plantas. R. Bras. Ci. Solo, (aceito - no prelo) - 2010.

BARTZ, M.L.C.; COSTA, A.C.S.; TORMENA, C.A.; SOUZA JUNIOR, I.G. & BROWN, G.G. Micronutrientes y óxidos de hierro em coprolitos de lombrices producidas em um Latosol rojo distroférrico (Oxisol) bajo de diferentes sistemas de manejo. Acta Zoologica Mexicana (nueva serie), No. especial 2. 2010, 2010, no prelo.

BOSSO, S.T. & ENZWEILER, J. Ensaio para determinar a (Bio) disponibilidade de chumbo em solos contaminados: revisão. Quím. Nova, 31:394-400, 2008.

BURGESS, W.A. Recognition of health in hazards in industry: a review of materials and processes. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1995. 537 p.

BUSTOS-OBREGÓN, E. & GOICOCHEA, R. Pesticide soil contamination mainly affects earthworm male reproductive parameters. Asian J. Androl., 4:195–199, 2002.

CASALI, C. A.; MOTERLE, D.F.; RHEINHEIMER, D.S. dos; BRUNETTO, G.; CORCINI, A.L.M.; KAMINSKI, J. & MELO, G.W.B. de. Formas e dessorção de cobre em solos cultivados com videira na Serra Gaúcha do Rio Grande do Sul. R. Bras. Ci. Solo, 32:1479-1487, 2008.

- CASSIANO, A.M. Fontes de contaminação por metais pesados na bacia do rio Ribeira (SP-PR): estratégias para remediação de uma área de disposição de rejeitos de mineração de Pb-Ag. São Carlos, Universidade Estadual de São Paulo, 2001. 159p. (Tese de Doutorado).
- DALLINGER, R. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: DALLINGER, R. & RAINBOW, P.S. (eds.), *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Lewis, London, 1993. p. 246-281.
- DECÄENS, T.; LAVELLE, P.; JIMÉNEZ, J.J.; ESCOBAR, G.; RIPPSTEIN, G.; SCHNEIDMADL, J.; SANZ, J.I.; HOYOS, P. & THOMAS, R.J. Impacto del uso de la tierra en la macrofauna del suelo de los Llanos Orientales de Colombia. In: JIMÉNEZ, J.J. & THOMAS, R.J., ed., *El arado natural: las comunidades de macroinvertebrados del suelo en las savanas neotropicales de Colombia*. Colômbia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2003. p. 21-45.
- ERNST, G.; ZIMMERMANN, S.; CHRISTIE, P. & FREY, B. Mercury, cadmium and lead concentration in different ecophysiological groups of earthworms in forest soils. *Env. Pollut.*, 156:1304-1313, 2008.
- EYSINK, G.G.J. Metais pesados no Vale do Ribeira e em Igunde-Cananéia. *Revista CETESB de Tecnologia*, 2:6-13, 1988.
- GOMES, P.C.; FONTES, M.C.F.; COSTA, L.M. & MENDONÇA, G.S. Extração fracionada de metais pesados em Latossolo Vermelho Amarelo. *R. Bras. Ci. Solo*, 21:543-551, 1997.
- HOBBELEN, P.H.F.; KOOLHAAS, J.E. & VAN GESTEL, C.A.M. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total available metal concentrations in field soils. *Env. Pollut.*, 144: 639-646, 2006.
- KABATA-PENDIAS, A. & PENDIAS, H. Trace elements in soils and plants. 3.ed. Boca Raton, CRC, 2001. 413p.
- KÄMPF, N.; CURI, N. & MARQUES, J.J. Óxidos de alumínio, silício, manganês e titânio. In: MELO, V.F. & ALLEONI, L.R.F., eds. *Química e mineralogia do solo (Parte I – Conceitos básicos)*. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.1., p.573- 610, 2009.
- KIM, N.D. & HILL, S.J. Sorption of lead and thallium on borosilicate glass and polypropylene: implications for analytical chemistry and soil science. *Environ. Technol.*, 14:1015-1026, 1993.
- KIZILKAYA, R. Cu and Zn accumulation in earthworm *Lumbricus terrestris* L. in sewage sludge amended soil and fractions of Cu and Zn in casts and surrounding soil. *Ecological Engineering*, 22:141-151, 2004.
- KOTAS, J. & STASICKA, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution*, 107:263-283, 2000.
- KUMMER, L. Mineralogia e fracionamento de metais pesados em solos de área de mineração e processamento de Pb, Adrianópolis-PR. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2008. 140p. (Dissertação de Mestrado).

- LANGENBACH, T.; INÁCIO, M. V. S.; AQUINO, A. M. & BRUNNINGER, B. Effects of earthworm *Pontoscolex corethrurus* on distribution of acaricida dicofol in a Podzolic soil. *Pesq. Agropec. Bras.*, 37:1663-1668, 2002.
- LANNO, R.; WELLS, J.; CONDER, J.; BRADHAM, K. & BASTA, N. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 39-47, 2004.
- LIM, C.H. & JACKSON, M.L. Dissolution for total elemental analysis. In: PAGE, A.L. ed., *Methods of soil analysis. Parte 2: Chemical and microbiological properties*. Madison: American Society of Agronomy, 1986. p. 1-12.
- LIMA, M.C.; GIACOMELLI, M.B.O.; STÜPP, V.; ROBERGE, F.D.; BARRERA, P.B. Especificação de Cobre e Chumbo em Sedimento do Rio Tubarão (SC) pelo Método Tessier. *Quim. Nova*, 24: 734-742, 2001.
- LINDSAY, W.L. *Chemical equilibria in soils*. New Jersey, Blackburn, 2001. 449p.
- LUKKARI, T.; TAAVITSAINEN, M.; VÄISÄNEN, A. & HAIMI, J. Effects of heavy metals on earthworms along contamination gradients in organic rich soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59: 340-348, 2004.
- MANN, S.S. & RITCHIE, G.S. The influence of pH on the forms of cadmium in four west australian soils. *Aust. J. Soil Res.*, 31:255-270, 1993.
- MATTIAZZO, M.E.; BERTON, R.S. & CRUZ, M.C.P. Disponibilidade e avaliação de metais pesados potencialmente tóxicos. In: FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P.; RAIJ, B. van & ABREU, C.A., ed. *Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura*. Jaboticabal, CNPq; Fapesp; Potafos, 2001. p. 222.
- MELLO, J.W.V. & PEREZ, D.V. Equilíbrio químico das reações no solo. In: MELO, V.F. & ALLEONI, L.R.F., eds. *Química e mineralogia do solo (Parte I – Conceitos básicos)*. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.1., p.151-249, 2009.
- MELO, V.F. Potássio e magnésio em minerais de solos e relação entre propriedades da caulinita com formas não trocáveis destes nutrientes, Universidade Federal de Viçosa, 1998. 205p. (Tese de doutorado).
- MORGAN, J.E. & A.J. MORGAN. The accumulation of metals (Cd, Cu, Pb, Zn and Ca) by two ecologically contrasting earthworm species (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*): Implications for ecotoxicological testing. *Appl. Soil Ecol.*, 13: 9-20, 1999.
- MORGAN, J.E. & A.J. MORGAN. The distribution and intracellular compartmentation of metals in the endogeic earthworm *Aporrectodea caliginosa* sampled from an unpolluted and metal-contaminated site. *Env. Pollut.*, 99:167-175, 1998.
- MILLER, W.P.; MARTENS, D.C. & ZELAZNY, L.W. Effect of sequence in extraction of trace metals from soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 50:598-601, 1986.
- NACHITIGALL, G.R.; NOGUEIROL, R.C. & ALLEONI, L.R.F. Formas de cobre em solos de vinhedos em função do pH e da adição de cama-de-frango. *Pesq. Agropec. Bras.*, 42:427-434, 2007.

OLIVEIRA, M.A.F.; MANIESI, V.; TEIXEIRA, W. & DAITX, E.C. Caracterização Isotópica de Metabasitos e Anfibolitos dos Grupos Açungui e Setuva na Porção Sul da Faixa Ribeira. Geol. USP Sér. Cient., 2:161-170, 2002

OYEDELE, D.J.; SCHJØNNING, P. & AMUSAN, A.A. Physicochemical properties of earthworm casts and uningested parent soil from selected sites in southwestern Nigeria. Ecological Engineering, 28:106-113, 2006.

PEIJNENBURG, W.J.G.M.; BAERSELMAN, R.; DE GROOT, A.C.; JAGER, T.; POSTHUMA, L. & VAN VEEN, R.P.M. Relating environmental availability to bioavailability: soil-type-dependent metal accumulation in the oligochaete *Eisenia Andrei*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 44: 294-310, 1999.

PICKERING, W.F. Selective chemical extraction of soil components and bound metal species. Crit. Rev. Anal. Chem., 12:233-266, 1981.

RAKASASALAYA, M.; LANGDON, A.G. & KIM, N.D. Assessment of the extend of lead distribution during sequential extraction by two different methods. Anal. Chim. Acta, 332:1-14, 1996.

ROSS, S.M. Toxic metals in soil-plant systems. Chichester, England, John Willey & Sons, 1994. 469 p.

SAHUQUILLO, A.; LOPEZ-SANCHEZ, J.F.; RUBIO, R.; RAURET, G.; THOMAS, R.P.; DAVIDSON, C.M. & URE, A.M. Use of a certified reference material for extractable trace metals to assess sources of uncertainty in the BCR three-stage sequential extraction procedure. Anal. Chim. Acta, 382:317-327, 1999.

SAS Institute. Statistical Analysis System. SAS/STAT use's guide (Version 6.0) 3.ed. Cary, 1990. 705p.

SAUVÉ, S. Speciation of metals in soils. In: Allen, H.E. ed. Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes, and plants. SETAC, Pensacola, 2002. p. 7-38.

SHAN, X.Q. & CHEN, B. Evaluation of sequential extraction for speciation of trace metals in model soil containing natural minerals and humic acid. Anal. Chem. 65:802-807, 1993.

SHIOWATANA, J.; TANTIDANAI, N.; NOOKABKAEW, S. & NACAPRICHA, D.A Novel Continuous-Flow Sequential Extraction Procedure for Metal Speciation in Solids. J. Environ. Qual., 30:1195-1205, 2001.

SHUMAN, L.M. Zinc, manganese and copper in soil fractions. Soil Sc., 127:10-17, 1979.

SPOSITO, G.; LUND, L.J. & CHANG, A.C. Trace metal chemistry in arid-zone field soils amended with sewage sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in solid phases. Soil Sci. Soc Am. J., 46:260-264, 1982.

SPURGEON, D.J. & HOPKIN, S.P. Effects of variations of the organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc on the earthworm *Eisenia fetida*. *Pedobiologia*, 40: 80-96, 1996.

SPURGEON, D.J. & HOPKIN, S.P. Seasonal variation in the abundance, biomass and biodiversity of earthworms in soils contaminated with metal emissions from a primary smelting works. *J. Appl. Eco.*, 36: 173-183, 1999.

STOVER, R.C.; SOMMERS, L.E. & SILVIEIRA, D.J. Evaluation of metals in waste-water sludge. *J. Water Poll. Control Fed.*, 48:2165-2175, 1976.

TESSIER, A.; CAMPBELL, P.G.C. & BISSON, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals, *Analytical Chemistry*, 51:844-851, 1979.

TU, Q.; SHAN, X.Q.; QIAN, J. & NI, Z.M. Trace metal redistribution during extraction of model soils by acetic acid/sodium acetate. *Anal. Chem.*, 66:3562-3598, 1994.

URE, A. M.; QUEVAUVILLER, P.; MUNTAU, H. & GRIEPINK, B. Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 51:135–151, 1993.

VIJVER, M.G.; VINK, J.P.M.; MIERMANS, C.J.H. & VAN GESTEL, C.A.M. Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Soil Biol. Bioch.*, 35: 125-132, 2003.

WELCH, J.E. & LUND, L.J. Zinc movement in sewage-sludgetreated soil as influenced by soil properties, irrigation water quality, and soil moisture level. *Soil Science*, 147:208- 214, 1989.

WONG, M.H. & MA, Y. Land Reclamation using earthworms in metal contaminated soils. In: NAIDU, R., ed. *Chemical Bioavailability in Terrestrial Environment.*, 2008. p. 719-734.

YAMAMOTO T. et al. Ecological study of forest floor invertebrate fauna in naturally regenerated cedar forest and cedar plantation. *Edaphology*, 51:19-32, 1994.

ZHANG, M.; LI, W.; YANG, Y.; CHEN, B. & SONG, F. Effects of readily dispersible colloid on adsorption and transport of Zn, Cu, and Pb in soils. *Environment International*, 31:840–844, 2005.