

## **BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS**

*Juliano de Almeida Andrade<sup>1</sup>, Fabio Augusto<sup>2</sup> & Isabel Cristina Sales Fontes Jardim<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida (LABCROM), Departamento de Química Analítica (DQA), Instituto de Química (IQ), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6154, CEP 13084-971, Campinas, SP, Brasil. E-mail: jaa1000@gmail.com.

<sup>2</sup> Laboratório de Cromatografia Gasosa (LCG), DQA, IQ, UNICAMP.

<sup>3</sup> LABCROM, DQA, IQ, UNICAMP.

**Resumo:** Em vista da eficiência comprovada da biorremediação na degradação de compostos tóxicos ao ser humano, como o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), diversas empresas, principalmente as relacionadas com consultorias e remediação ambiental, têm despertado grandes interesses pela implantação da biorremediação como opção para a reabilitação de áreas contaminadas. Em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, Canadá e vários países da Europa, a técnica bioquímica de remediação vem sendo amplamente utilizada em trabalhos que se baseiam, por exemplo, no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Porém, ao contrário do que se tem notado nesses países, no Brasil, os projetos de biorremediação ainda estão no campo da teoria, com poucos casos práticos, embora exista uma probabilidade real de expansão. A esse despeito, uma das maiores pertinências dessa revisão é elucidar as vantagens que essa técnica pode oferecer quando é utilizada para a degradação de compostos, como os BTEX, em solos tipicamente brasileiros, cujas características físico-químicas contribuem, em muito, para a degradação desses contaminantes. Nessa conjuntura, pesquisas revelam que os fatores ambientais (como teores de umidade e oxigênio) e a disponibilidade de nutrientes nos solos, além das condições climáticas do Brasil, são bastante adequadas para o emprego dessa técnica. Isso pode trazer como vantagens, ótima relação custo-benefício e maior eficiência na degradação de compostos tóxicos e recalcitrantes frente à maioria das técnicas convencionais de remediação. Em síntese, a presente revisão busca enfocar o estado da arte das técnicas de biorremediação de contaminantes em solos, apresentando as mais atuais e recentes aplicações e inovações, tanto no âmbito nacional quanto no internacional.

**Termos de indexação:** biorremediação; degradação; contaminantes; hidrocarbonetos de petróleo – BTEX; solos; tratamento de áreas contaminadas.

### **CONTAMINAÇÃO DE SOLOS POR PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS**

O mundo atual está cada vez mais dependente do petróleo e de seus derivados para a manutenção de sua atividade industrial. Durante a exploração, o refino, o transporte e as operações de armazenamento do petróleo e/ou de seus deri-

vados podem vir a ocorrer derramamentos acidentais ocasionando a contaminação de solos, rios, etc. Tais ocorrências vêm motivando, principalmente, a realização de pesquisas relacionadas com a remediação de sítios contaminados (Aislabe et al., 2004; Marín et al., 2006).

O que se tem notado, nas duas últimas décadas, é que a poluição causada por petróleo e

seus derivados tem sido um dos principais problemas ao meio ambiente. Quando ocorre o derramamento de gasolina em solos, por exemplo, uma das principais preocupações é a contaminação das águas subterrâneas, que também podem contaminar, especialmente, os aquíferos que são usados como fontes de abastecimento de água para o consumo humano (Custance et al., 1992). Os frequentes derramamentos de petróleo e seus derivados registrados em solos brasileiros vêm motivando o desenvolvimento de novas técnicas que visam, principalmente, a descontaminação dessas matrizes. Diante disso, diversas técnicas, físicas, químicas e biológicas, vêm sendo desenvolvidas para a remoção ou a degradação *in-situ* ou *ex-situ* de petróleo derramado e para a redução de seus efeitos sobre o ecossistema, especialmente os tóxicos. Dentre as técnicas desenvolvidas, a “biorremediação” vem se destacando como uma alternativa viável e promissora para o tratamento de solos contaminados por petróleo e seus derivados (Bento et al., 2003; Dua et al., 2002; Rahman et al., 2002).

De modo geral, a biorremediação baseia-se na degradação bioquímica dos contaminantes por meio da atividade de microorganismos presentes ou adicionados no local de contaminação (Bernoth et al., 2000). Neste caso, os tratamentos são basicamente de dois tipos: 1) *ex-situ* (ou *off-site*), realizado fora do local onde ocorreu a contaminação e, por isso, é um tratamento que requer a escavação e a remoção do solo contaminado para outro local. A adoção deste procedimento pode resultar em um aumento considerável do custo do processo, porém, não obstante a essa desvantagem, é possível controlar, com maior facilidade, as condicionantes do meio (vide o item “Fatores que influenciam a biodegradabilidade dos contaminantes”), que são consideradas os fatores-chave utilizados no tratamento dos solos; 2) *in-situ* (ou *on-site*), tratamento feito no próprio local da contaminação. Normalmente, essa opção de biorremediação torna o processo mais atrativo e economicamente viável, quando comparado ao tratamento citado anteriormente. Além disso, o tratamento *in-situ*, normalmente, acarreta em menores impactos ambientais advindos da remediação da área contaminada (Nano et al., 2003).

### Principais contaminantes de petróleo e seus derivados em solos

O petróleo é uma mistura complexa que contém vários compostos, sendo que os hidrocarbonetos representam a fração majoritária. De acordo com a sua origem, as suas composições químicas e as suas propriedades físicas variam de um campo petrolífero para outro. Devido, principalmente, à complexidade dessa mistura, normalmente o tratamento de áreas contaminadas por essas substâncias é bastante difícil e problemático. Em solos contaminados por petróleo e seus derivados, alguns contaminantes se destacam frente aos demais. Neste caso, de forma geral, os compostos de interesse que exigem maior preocupação ambiental e que, normalmente, são os principais a serem identificados e quantificados antes e durante um processo de remediação, são: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (isômeros: *orto-*, *meta-* e *para-*xileno). Esses compostos, conhecidos também como BTEX, são definidos como hidrocarbonetos monoaromáticos, cujas estruturas moleculares possuem como característica principal a presença do anel benzênico. São usados, principalmente, em solventes e em combustíveis e são os constituintes mais solúveis na fração da gasolina.

Compostos como os BTEX, constituem em um grande problema, não somente no Brasil, mas em todo o mundo. Esses compostos aromáticos são tóxicos tanto ao meio ambiente como ao ser humano, nos quais atuam como depressores do sistema nervoso central e apresentam toxicidade crônica mais significativa que os hidrocarbonetos alifáticos (também presentes no petróleo e derivados), mesmo em concentrações da ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Watts et al., 2000). O benzeno é reconhecido como o composto mais tóxico dentre os BTEX e, por isso, pode ser apontado como o agente mais preocupante no tocante à saúde pública. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*), órgão da Organização Mundial da Saúde, o benzeno se classifica no Grupo I, ou seja, é uma substância comprovadamente cancerígena e que também pode causar leucemia em seres humanos. Assim como a IARC, nos Estados

Unidos, a Agência de Saúde e Segurança Ocupacional (*National Institute for Occupational Safety and Health – NIOSH*), bem como a Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency – EPA*) também incluem o benzeno em suas listas de produtos cancerígenos (EPA, 2003a; IARC, 2006; NIOSH, 2006). Daí, a importância considerável em monitorar esses contaminantes em episódios de contaminações.

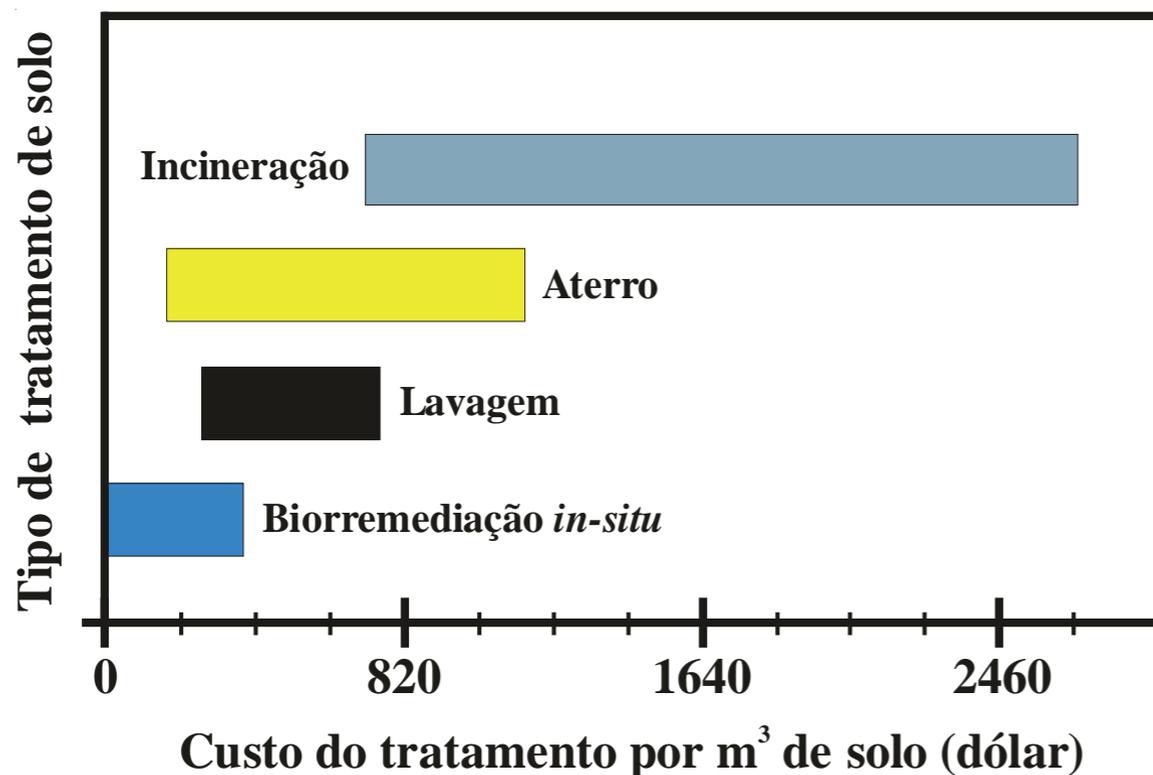
Em solos contaminados por petróleo e seus derivados, além dos BTEX, geralmente, outras classes de compostos também são alvos de atenção, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), os compostos orgânicos voláteis (COV) totais e os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). Os compostos BTEX, HPA e HTP são escolhidos, principalmente, pela toxicidade, mobilidade e persistência no meio ambiente; os COV totais, por representarem o total de emissões gasosas, como perdas por volatilização provenientes do derramamento. Assim, qualquer contaminação oriunda dessas fontes merece atenção, não apenas pelo contato direto (como a inalação de vapores) desses compostos indevidamente dispostos no solo, mas também quanto à sua presença em águas utilizadas para o consumo humano.

### TIPOS DE TRATAMENTO DE SOLOS

O objetivo desse tópico é introduzir as técnicas de remediação mais empregadas atualmente no tratamento de solos contaminados por petróleo e seus derivados, que serão descritas brevemente, a seguir. Para isto, será exemplificada cada técnica de remediação: química (oxidação química *in-situ*), biológica (atenuação natural e biorremediação) e física (extração de vapores no solo). Assim, dentre as formas de tratamento existentes, com base no objeto principal do presente artigo, somente a biorremediação será descrita em detalhes.

De modo geral, deve-se salientar que cada técnica de tratamento é dependente de vários fatores, a saber: 1) condições físicas, químicas e biológicas do local contaminado; 2) concentração do contaminante e; 3) tempo requerido para a degradação ou a remoção do composto alvo, conforme a técnica empregada. Em todos os processos

de tratamento existe uma correlação direta entre o tempo requerido para a remediação da área e o custo total, como pode ser visto na Figura 1, que mostra a faixa de valor cobrado para a descontaminação de um metro cúbico ( $\text{m}^3$ ) de solo, usando diferentes técnicas de remediação.



**Figura 1.** Comparação entre os custos do tratamento de solos empregando diferentes técnicas de remediação (modificado de EPA)

A análise da Figura 1 permite observar que a biorremediação é a técnica que apresenta o custo de tratamento mais baixo quando comparado às demais. A incineração caracteriza-se por apresentar custos maiores relacionados ao tratamento de solos e, conseqüentemente, à inviabilidade do processo, dependendo do volume de solo a ser tratado. Utilizando a incineração como opção de tratamento, dependendo do tipo de composto a ser destruído, o custo total do processo pode chegar, aproximadamente, em 2.665 dólares para cada m<sup>3</sup> de solo tratado. Salienta-se, porém, que aqui o objetivo não é desprezar e nem desmerecer uma técnica ou outra e, sim, elucidar algumas vantagens apresentadas na utilização da biorremediação. Sendo que esta, assim como qualquer outra técnica, traz diversas vantagens e limitações. Por isso, sugere-se que cada caso seja analisado criteriosamente e individualmente, principalmente, quando tratar da tomada de decisão para a escolha da técnica de remediação a ser empregada.

#### Oxidação química *in-situ*

A oxidação química *in-situ*, consiste na injeção de produtos químicos reativos diretamente no local contaminado, com o objetivo de degradar rapidamente os contaminantes por meio de reações químicas que promovem a oxidação ou a redução das espécies de interesse presentes em uma determinada área. Também conhecido como ISCO (*In-Situ Chemical Oxidation*), segundo Brown (2003), esse processo é mais frequentemente empregado em locais contendo concentrações elevadas do contaminante, geralmente, presentes na fonte e na “pluma” de contaminação. A pluma é definida como o local onde estão distribuídos os contaminantes, normalmente lançados a partir de uma fonte pontual. A extensão e a expansão da pluma, normalmente, é prevista com o auxílio de modelos teóricos e cálculos matemáticos, cujos dados são obtidos após a caracterização do solo (como a permeabilidade), da água subterrâ-

nea (como o gradiente hidráulico, a velocidade e o tipo de recarga) e dos contaminantes que estão sendo despejados. Em áreas altamente contaminadas a oxidação química pode ser uma etapa de pré-tratamento que promove melhores condições para o emprego de outras técnicas, como os tratamentos biológicos. Destes, fazem parte a biorremediação e a atenuação natural monitorada ou acelerada, que geralmente são técnicas menos onerosas que as químicas (EPA, 2001a e 2004a).

Dentre os processos químicos emergentes para o tratamento de solos, os processos oxidativos avançados (POA) destacam-se como uma alternativa promissora, pois, envolvem a geração de espécies químicas radiculares e altamente oxidantes, como o radical hidroxila (OH<sup>•</sup>). Esses radicais são capazes de destruir ou hidrolisarem, em curto período de tempo, contaminantes considerados de difícil degradação, como os hidrocarbonetos de petróleo. Os POA, em função de suas eficiências comprovadas na degradação de contaminantes de petróleo e seus derivados, representam, atualmente, uma alternativa importante para a mitigação de problemas ambientais (Andrade, 2005). Dentre as técnicas químicas relacionadas com os POA, as mais utilizadas são: reagente de Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>), persulfato (S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup>), permanganato (MnO<sub>4</sub><sup>-</sup>), ozônio (O<sub>3</sub>/UV; O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV; O<sub>3</sub><sup>-</sup>/OH; O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV e fotocatalise heterogênea (TiO<sub>2</sub>/UV).

O reagente de Fenton destaca-se frente aos demais POA, por ser capaz de gerar o radical OH<sup>•</sup> mesmo na ausência de luz, ao contrário dos processos que utilizam a radiação ultravioleta para catalisar a reação. Além dessa vantagem, esse processo, em função da sua natureza homogênea, é de fácil implementação, mesmo para a remediação de matrizes complexas, como os solos e as águas subterrâneas (Andrade, 2005). No caso particular da remediação de solos, a presença de espécies de ferro de origem natural, encontradas na maioria desses compartimentos ambientais, permite a utilização do reagente de Fenton apenas por adição do agente oxidante no sistema (Peralta-Zamora & Tiburtius, 2004). Neste caso, dentre os oxidantes disponíveis (ozônio, peróxidos de hidrogênio e de cálcio, persulfato de sódio, permanganatos de sódio e de potássio), o mais empregado é o peróxido de hidrogênio, que apresenta alguns benefícios em

relação aos demais oxidantes, como reatividade elevada, custos baixos e facilidades no manuseio e na aplicação.

Adicionalmente, em pesquisas voltadas para a otimização do reagente de Fenton na remediação de matrizes contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo, Andrade (2005) demonstra que é possível aumentar a eficiência desse reagente na degradação de BTEX utilizando agentes complexantes no meio reacional. Este processo foi denominado pelo autor de reagente de Fenton modificado (RFM). A partir desses estudos, desenvolveu-se um reagente registrado como FENTOX<sup>®</sup> (patente de invenção PI-0501652-5), que apresenta cinética de reação bastante elevada na degradação de contaminantes orgânicos, como os BTEX. Segundo o autor, a adição de complexantes permite que a degradação de compostos recalcitrantes, mediada pelo RFM, seja facilitada e acelerada. Além disso, o processo traz como principal vantagem frente ao reagente de Fenton convencional, a possibilidade de trabalhar em matrizes ambientais sem que seja necessário o condicionamento adequado do local, previamente à aplicação dos reagentes. Ressalta-se que, para que o reagente de Fenton convencional tenha eficiência máxima é necessário ajustar o valor de pH para valores próximos a 3,0 (Andrade, 2005).

#### Atenuação natural

O termo “atenuação natural” tem sido empregado para descrever a remediação passiva de solo que envolve a ocorrência de diversos processos, de origens naturais, como a biodegradação, a volatilização, a dispersão, a diluição e a adsorção, promovidos na subsuperfície. Dentre estes, somente a biodegradação, facilitada por microrganismos, destrói fisicamente os contaminantes de interesse. Os demais processos citados envolvem, basicamente, a transferência dos contaminantes de um local para outro ou a retenção do contaminante, no caso do processo de sorção. A principal vantagem do processo de atenuação natural é que, mesmo sem o acréscimo de nutrientes no solo ou a adequação de qualquer condição ambiental, a redução do contaminante pode acontecer de maneira

eficiente e contínua. Isso ocorre devido, principalmente, ao processo de adaptação natural da microbiota nativa existente no solo impactado. Neste caso, esses microorganismos passam a utilizar em seus metabolismos os compostos orgânicos poluentes como fontes de carbono, provocando, então, a redução das concentrações dessas substâncias ao longo do tempo (Robb & Moyer, 2001). Além disso, o solo contaminado está sujeito aos processos intempéricos de origem natural, nos quais, não somente os processos biológicos (como o processo descrito anteriormente), mas também os físicos e químicos, como a “lixiviação” (processo através do qual ocorre o arraste vertical, pela infiltração da água, de partículas, dissolvidas ou em suspensão, da superfície do solo para as camadas mais profundas) e a volatilização, podem estar envolvidos na redução da concentração do poluente no solo.

A utilização desse processo, como opção principal de remediação, requer algumas ressalvas, haja vista que as condições do meio, inclusive o tipo e a concentração dos contaminantes, podem não contribuir para a redução de substâncias tóxicas e recalcitrantes e, conseqüentemente, aumentam os riscos de contaminação de pessoas e animais. Por esses motivos, o emprego da atenuação natural é permitido e até recomendado, desde que sejam respeitados os resultados obtidos em estudos preliminares sobre a avaliação de risco da exposição da população, elaborada dentro de um cenário real para o uso futuro da área. Normalmente, processos de atenuação natural costumam durar de meses a anos. Por isso, o tempo e a porcentagem de degradação dos contaminantes podem ser muito lentos e até imprevisíveis. É justamente por essa consideração, que, na maioria dos casos, é necessário que esse processo de tratamento seja monitorado rigorosa e periodicamente. Este processo, denominado de “atenuação natural monitorada” (ANM), é um dos mais utilizados nos EUA para a redução do impacto ambiental causado por contaminações de solos com compostos orgânicos.

Devido aos custos elevados envolvidos na remediação de áreas contaminadas, a atenuação natural com monitoramento tem sido adotada como uma possibilidade de intervenção em locais contaminados por substâncias orgânicas biode-

gradáveis, nas condições naturais do meio. Esta alternativa baseia-se na capacidade de atenuação natural de contaminantes, no solo e nas águas subterrâneas, a qual, em geral, ocorre durante um longo período de tempo, no qual não devem ocorrer riscos à saúde pública, ao meio ambiente e aos demais bens a proteger. A adoção da técnica deve ser precedida de um estudo criterioso que inclua a previsão da evolução das plumas de contaminação, a metodologia de avaliação de risco e o monitoramento durante o período necessário para que se atinjam as metas de remediação desejáveis. Apesar disso, considerando principalmente o tempo necessário para a reabilitação da área, a ANM pode ser onerosa, gerando custos significativos, caso a atenuação se estenda por um longo período de tempo. Casos como este, comumente, exigem o tratamento *in-situ* ou *ex-situ* do solo impactado (EPA, 2004b).

#### Extração de vapores no solo (SVE)

A extração de vapores no solo, também conhecida como SVE (*Soil Vapor Extraction*), é uma técnica de remediação comumente empregada no tratamento de solos contaminados, porém, deve-se ressaltar que essa técnica é aplicada somente à “zona não-saturada” (zona que se situa imediatamente abaixo da superfície topográfica e acima do nível freático, onde os espaços entre as partículas estão parcialmente preenchidos por gases, essencialmente ar atmosférico e vapor de água, e por água. A água contida nessa zona encontra-se à pressão atmosférica, podendo ser utilizada pelas raízes das plantas ou contribuir para o aumento das reservas de água subterrânea). De modo geral, a SVE baseia-se na aplicação de vácuo em pontos estratégicos do solo, a fim de induzir o fluxo controlado de ar e, então, remover os contaminantes presentes no solo, sobretudo, nas regiões da subsuperfície. Nessa técnica, os gases extraídos devem, obrigatoriamente, passar por etapas de tratamento de vapores, antes de serem lançados para a atmosfera.

Há duas condições-chave requeridas para o emprego de SVE. A primeira, é que o solo deve conter uma fase gasosa, através da qual o ar conta-

minado irá passar. Esta condição geralmente limita o emprego da SVE na “zona vadosa” (o mesmo que zona não-saturada). Em alguns casos, para melhorar a eficiência dessa técnica, a água subterrânea é bombeada para abaixar o nível d’água (N.A.) e, conseqüentemente, aumentar a área da zona não-saturada, permitindo a aplicação da SVE em áreas classificadas anteriormente como “zona saturada” (zona que pode ser constituída por diferentes níveis ou camadas de solo ou formações rochosas, onde todos os espaços porosos ou faturas existentes estão completamente preenchidos por água. O limite superior dessa zona é designado como o nível freático). A segunda condição, é que os contaminantes devem ser capazes de se transferirem de outras fases (sólida, aquosa ou orgânica) para a fase gasosa, sob a aplicação de vácuo. Este requerimento limita a SVE ao tratamento de compostos voláteis ou semivoláteis, que constituem a maior parte dos contaminantes orgânicos de interesse, como os BTEX.

Em suma, no tocante às extrações dos contaminantes por SVE, duas técnicas são utilizadas: uma denominada “vertical” e outra “horizontal”. No primeiro caso, os gases são extraídos a partir de pontos específicos construídos (perfurados) sobre a pluma de contaminação. Normalmente, o processo é eficiente em profundidades maiores que um metro abaixo da superfície do solo. A segunda técnica, extração horizontal, na maioria das vezes, dependendo da geometria da pluma de contaminação, na maioria das vezes, é instalada em conjunto com a vertical, cuja finalidade é melhorar a eficiência da extração e evitar que os gases contaminantes sejam lançados na atmosfera, antes de tratamento adequado. Os poços de extração de vapor devem ser dispostos de forma que as suas zonas de influência (geralmente determinadas em teste piloto) se interceptem e devem ser adequadamente projetados e instalados, para evitar zonas potenciais de estagnação (áreas impactadas onde o ar não é removido pelos poços de extração).

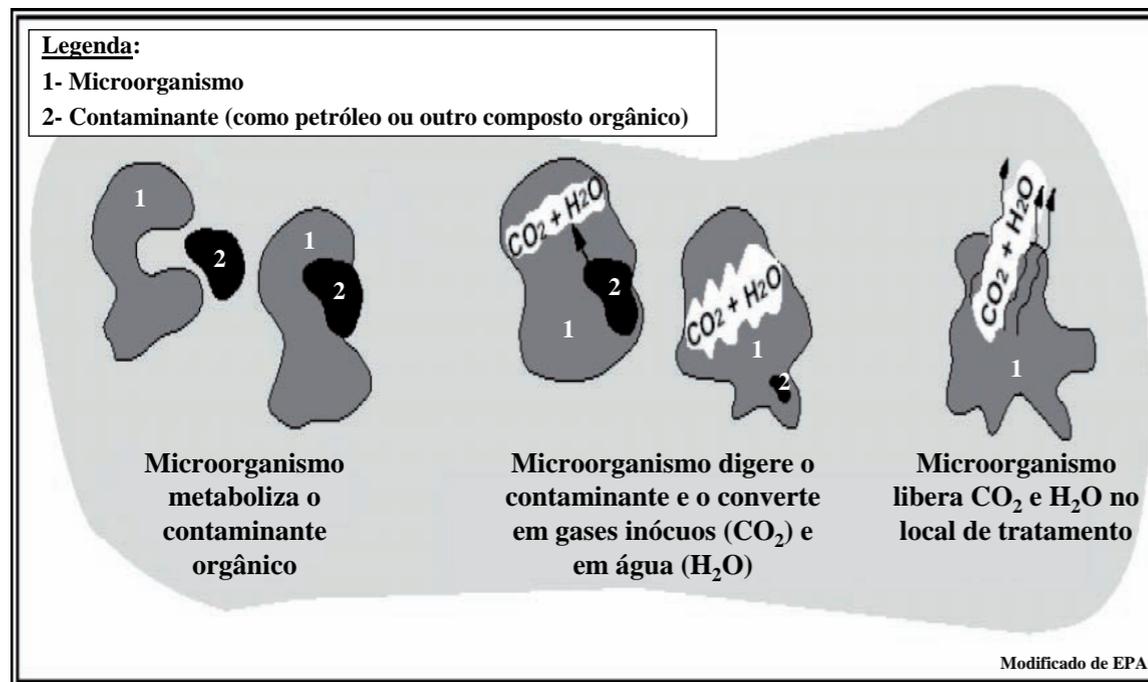
A técnica SVE é aplicada somente para os compostos orgânicos voláteis que apresentam o valor da constante de Henry maior que 0,01 ou a pressão de vapor maior que 0,5 mm de Hg. Outros fatores, como a umidade e a quantidade de matéria orgânica, afetam consideravelmente a permeabilidade do solo e, por conseqüência, di-

minuem a eficiência do sistema de extração. O fato de o processo envolver fluxo contínuo de ar no solo ocasiona, como vantagem, a possibilidade de promover e estimular a biodegradação *in-situ* dos compostos de baixa volatilidade, que possam estar presentes no local. A limitação do sistema de SVE é que ele se baseia fundamentalmente na aplicação de fluxos de ar, o que o condiciona em três fatores específicos: volatilidade do contaminante; ausência de ar em ambientes saturados com água e permeabilidade do solo. Normalmente, a SVE não irá funcionar bem em solos de baixa permeabilidade, como aqueles silteosos e argilosos com baixa porosidade, ou em camadas muito saturadas, como a franja capilar ou logo abaixo do nível d’água. Entretanto, a ampliação das taxas de vácuo aplicado com bombas especiais mostrou-se efetiva em alguns solos de baixa permeabilidade (CETESB, 2004). Mesmo assim, a maior desvantagem dos tratamentos físicos é que estes processos não são de caráter destrutivo e, sim, de transferência de massa, que apenas promovem a transferência dos contaminantes de um local para outro, sem que haja a destruição dos mesmos (DiGiulio & Varadhan, 2001; EPA, 2004c).

#### BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS

A biorremediação envolve a utilização de microorganismos, de ocorrência natural (nativos) ou cultivados, para degradar ou imobilizar contaminantes em águas subterrâneas e em solos. Neste caso, geralmente, os microorganismos utilizados são bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Destes, as bactérias são as mais empregadas e, por conseqüente, são consideradas como o elemento principal em trabalhos que envolvem a biodegradação de contaminantes. São definidas como qualquer classe de microorganismos unicelulares, geralmente agregados em colônias, que vivem em compartimentos ambientais diversos. São importantes, em função de seus efeitos bioquímicos e por destruírem ou transformarem os contaminantes potencialmente perigosos em compostos menos danosos ao ser humano e ao meio ambiente (NRC, 1993).

No que diz respeito aos tipos de utilização da técnica, quanto ao local de tratamento, a biorremediação *in-situ* é a mais empregada no mundo. Porém, independente do local de aplicação, a biorremediação, assim como as demais técnicas químicas de degradação, tem como objetivo principal a mineralização completa dos contaminantes, ou seja, transformá-los em produtos com pouca ou nenhuma toxicidade (inócuos), como  $\text{CO}_2$  e água. Em suma, os microorganismos metabolizam as substâncias orgânicas, das quais se obtêm nutrientes e energia. Sendo que, para que isso ocorra, os microorganismos devem estar ativos para desempenharem a sua tarefa de biodegradação. Um esquema geral e simplificado da ação de microorganismos em processos de biorremediação é mostrado na Figura 2 (EPA, 2001b).



**Figura 2.** Esquema simplificado da ação de microorganismos em processos de biorremediação (EPA, 2001b)

Genericamente, os microorganismos nativos da subsuperfície podem desenvolver a capacidade de degradar contaminantes após longo período de exposição. Normalmente, estes seres microscópicos se adaptam em baixas concentrações de contaminantes e se localizam nas regiões externas à pluma de contaminação e, muito dificilmente, estarão presentes na fase livre (fase orgânica concentrada). Os compostos orgânicos são metabolizados por fermentação, respiração ou co-metabolismo (CETESB, 2004). Portanto, o processo de biorremediação pode ser aeróbico ou anaeróbico, requerendo oxigênio ou hidrogênio, respectivamente. Na maioria dos locais, a subsuperfície é carente dessas espécies (oxigênio ou hidrogênio), o que impede os microorganismos de se reproduzirem e degradarem completamente

o contaminante alvo. Além desse dois processos, a biorremediação também pode ocorrer de forma co-metabólica (Vidali, 2001).

Na “biorremediação aeróbica”, que requer um meio oxidante, o oxigênio atua como receptor de elétrons e os contaminantes são utilizados pelos microorganismos como fontes de carbono (doador de elétrons), necessárias para manter as suas funções metabólicas, incluindo o crescimento e a reprodução. Por exemplo, os compostos BTEX cumprem essa função como doadores de elétrons, caso haja receptores suficientes (oxigênio dissolvido) para que a reação ocorra. Quando o oxigênio é totalmente consumido, os microorganismos passam a utilizar outros receptores naturais de elétrons disponíveis no solo, sendo que esse consumo ocorre na seguinte ordem de preferência: nitrato

(reação de desnitrificação), manganês, ferro, sulfato e dióxido de carbono, sendo este, convertido em ácidos orgânicos para gerar o metano (Aelion & Bradley, 1991).

A “biorremediação anaeróbica”, que requer um meio redutor, ocorre pela ação de espécies doadoras de elétrons, responsáveis pela degradação, principalmente, dos poluentes halogênicos. Trata-se do fenômeno pelo qual os microorganismos, ao metabolizarem fontes alternativas de carbono (que não sejam os contaminantes de interesse), liberam compostos inorgânicos hidrogenados, hidretos (H<sup>-</sup>), que reagem com as moléculas do contaminante e substituem um átomo de cloro (hidrogenólise) ou removem simultaneamente dois átomos de cloro adjacentes originando uma ligação dupla entre os átomos de carbono. A biorremediação anaeróbica *in-situ* é ideal para ser utilizada em locais contaminados por compostos organoclorados, como o percloroetileno (PCE), uma vez que a fonte de carbono estimula nas bactérias a reação denominada halo-respiração ou halo-eliminação. Embora esse princípio, também denominado de descloração redutiva, seja aparentemente simples, a dificuldade da técnica está em criar um modelo ideal de fonte de carbono para um determinado microorganismo. Esta fonte de carbono deve conter compostos que sejam preferencialmente e facilmente metabolizados pelos microorganismos na presença dos contaminantes (Acton & Barker, 1992). Apesar do tratamento anaeróbico ser menos comum que o aeróbico, existe atualmente uma tendência de se promover a biorremediação anaeróbica, utilizando como fontes de carbono, melaço de cana, ácido láctico, proteínas do leite e metanol. Considerando o melaço de cana (caso incipiente brasileiro, subproduto da indústria sucroalcooleira), é importante ressaltar a necessidade de estudos mais avançados e detalhados, envolvendo, principalmente, a ocorrência de diferentes tipos de fermentações. Normalmente, têm-se observado que determinados processos de fermentações podem aumentar consideravelmente os riscos operacionais. Isto ocorre, especialmente, em virtude da metanogênese (etapa final no processo global da degradação anaeróbica de compostos orgânicos, efetuada pelas *Archaeobacterias* metanogênicas, tendo como subprodutos o metano e o dióxido de carbono), que pode resultar

em alguns inconvenientes, como alterações do potencial redox (Eh) da matriz estudada, o que pode provocar a solubilização indesejável de metais e, consequentemente, a contaminação do local por estas espécies (Nakagawa & Andréa, 2006).

A “biorremediação co-metabólica” é aquela na qual a degradação ocorre pela ação de enzimas produzidas por microorganismos para outros fins. É uma técnica praticamente idêntica às anteriores, sendo que, do ponto de vista bioquímico, rege o princípio das reações de oxido-redução. No caso específico do co-metabolismo, caso não haja o substrato principal, ou seja, fontes preferenciais de carbono, a degradação mediada pelos microorganismos não ocorre para um dado componente, definido como “contaminante co-metabolizado”. Por outro lado, neste caso específico, na presença de uma fonte de carbono, a metabolização do substrato primário poderá gerar enzimas capazes de atuar na degradação do contaminante de interesse (Garnier et al., 2000).

Não obstante, em poucos casos as condições naturais do local contaminado fornecem todas as substâncias essenciais, em quantidades suficientes, para que a biorremediação possa ocorrer sem a intervenção humana. Esse processo natural também é conhecido como “biorremediação intrínseca” e é utilizada, com sucesso, em alguns trabalhos (Borole et al. 1997; Chen et al., 2006; Troquest et al., 2003). Todavia, mesmo quando o meio é totalmente acondicionado ao cultivo dos microorganismos, a biodegradação pode ser afetada, principalmente, devido à capacidade intrínseca de cada microorganismo de metabolizar uma substância qualquer. Por exemplo, de acordo com Embar et al. (2006), alguns microorganismos sobrevivem em condições ambientais extremamente adversas. Adicionalmente, pesquisas comprovam que diferentes microorganismos podem degradar diferentes substâncias, dentre estas, substâncias recalcitrantes, como os hidrocarbonetos de petróleo. Em alguns casos, certos microorganismos são mais especializados em degradarem contaminantes específicos. Por exemplo, para uma mesma classe de substâncias, como os compostos organoclorados, alguns microorganismos podem degradar contaminantes como o dicloroetano e o cloreto de vinila, porém, no mesmo local não conseguem degradar o tricloroetano. Contudo, pes-

quisas sugerem que devido à elevada diversidade de compostos em solos contaminados por petróleo e derivados, estudos preliminares à biorremediação são de suma importância para o tratamento dessas matrizes ambientais (Embar et al., 2006). Salienta-se que, a princípio, o fator crítico para definir se a biorremediação é a técnica mais apropriada para o tratamento do local contaminado é a biodegradabilidade do contaminante. Por isso, o estudo detalhado de cada parâmetro que afeta a biodegradação deve ser feito cautelosamente pelos responsáveis do projeto de remediação. O item a seguir descreve a influência desses fatores na biorremediação.

#### Fatores que influenciam a biodegradabilidade dos contaminantes e a problemática da contaminação de solos por petróleo

Embora vários contaminantes podem ser metabolizados por microorganismos, alguns são mais facilmente biodegradados do que outros. No caso dos hidrocarbonetos de petróleo, por exemplo, muitas áreas contaminadas possuem uma mistura complexa de compostos orgânicos, sendo que a maioria destas substâncias, certamente, não é metabolizada na mesma velocidade. Em vez disso, as taxas de degradação dos diversos compostos que são metabolizados são diferentes e dependentes de vários fatores. Em especial, a velocidade de degradação é comumente depende da concentração do contaminante e da quantidade de espécies catalisadoras, como as enzimas geradas *on-site* pelos microorganismos. Nesse contexto, a quantidade de catalisador presente, de certa forma, representa o número de microorganismos hábeis em metabolizar o contaminante, bem como a quantidade de enzimas produzidas por cada célula. Então, qualquer fator que afeta a concentração do contaminante, o número de microorganismos presentes ou a quantidade de enzimas específicas, pode aumentar ou diminuir a velocidade da biodegradação do contaminante.

Em suma, as medidas corretivas a serem adotadas em quaisquer projetos que envolvam a biorremediação dependem de vários fatores, dentre eles, pode-se citar: A) os tipos e as quantidades

dos microorganismos e B) as condições físicas e químicas do sítio contaminado (como pH, umidade, temperatura, salinidade, teor de oxigênio e quantidade de nutrientes). Os nutrientes, que geralmente são representados por nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), durante a biorremediação, normalmente são utilizados na forma de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), di-hidrogeno fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ), respectivamente (Betancur-Galvis et al., 2006). Além das condições citadas, é de extrema importância o conhecimento prévio do teor de matéria orgânica, o qual pode ser expresso pela quantidade de carbono orgânico total no meio.

Adicionalmente, Hutchinson et al. (2003) constataram que o fator principal que influencia na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo é a atividade microbológica. Neste caso, Alexander (1977) discutiu, em detalhes, os efeitos desses fatores sobre os microorganismos. Para estes pesquisadores, a atividade e a população microbiana estão fortemente associadas com os conteúdos de água e de nutriente nos solos, com as espécies de plantas e com os tipos de contaminantes. Além disso, a atividade microbológica é afetada, sobretudo, pelo valor do pH (Figura 3) e pela temperatura (Figura 4) dos solos (Tate, 1995).

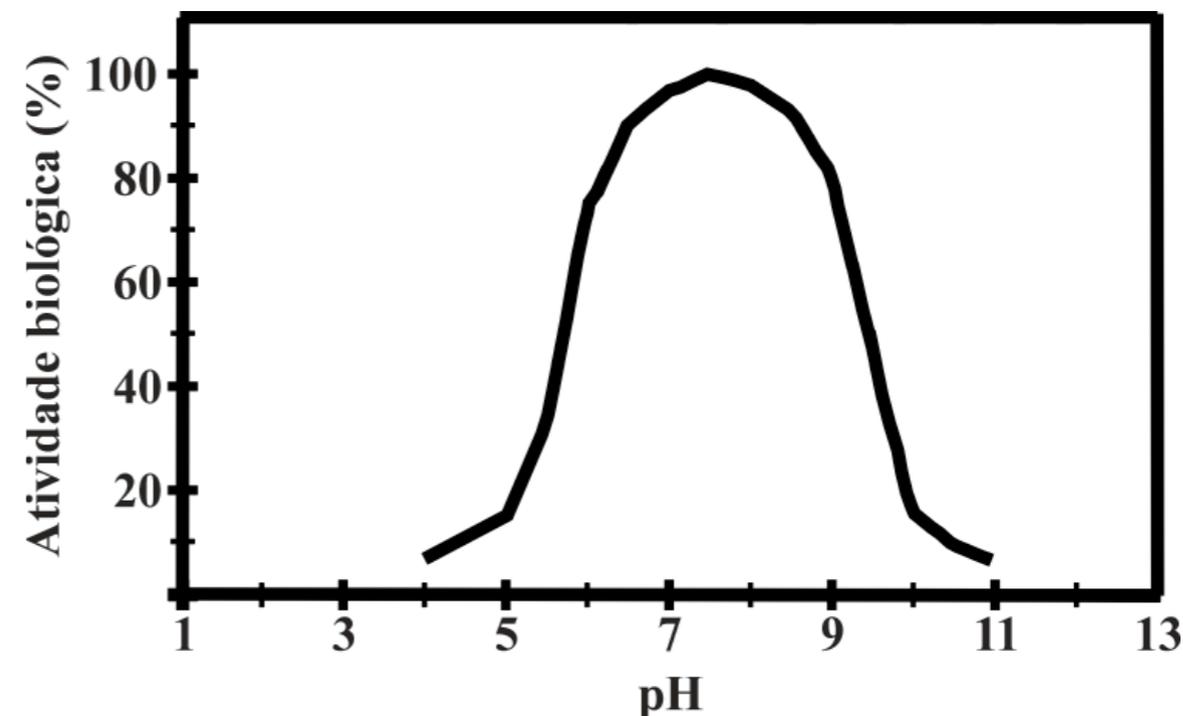
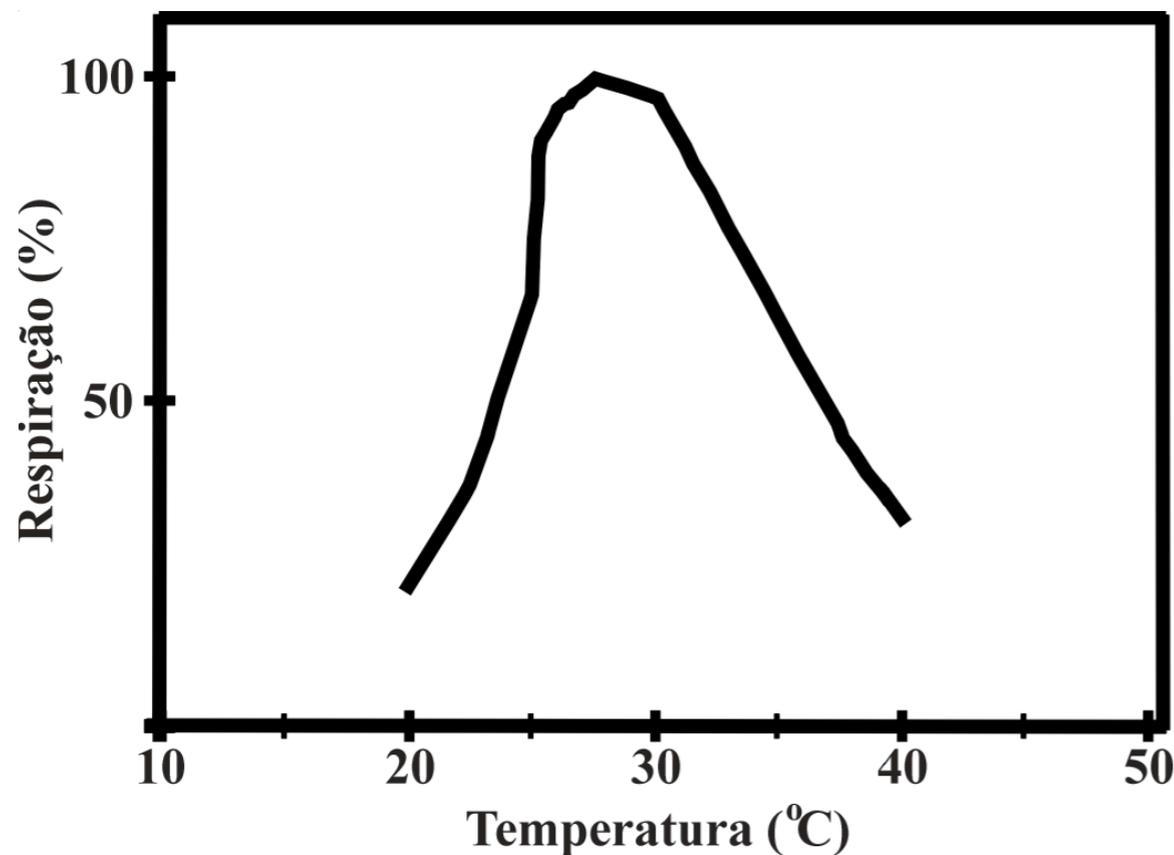


Figura 3. Variação da atividade biológica com a mudança do pH dos solos (modificado de Tate, 1995)

No tocante ao valor do pH, como mostra a Figura 3, observa-se que a faixa ideal de pH para que os microorganismos tenham atividade máxima é entre 6,5 e 8,5. De modo similar, Vidali (2001) também sugere que o valor do pH do meio reacional deva ser mantido próximo da neutralidade, no qual há o predomínio de bactérias e de fungos no local contaminado. Por outro lado, quando há diminuição do valor do pH, por exemplo, em função dos subprodutos ácidos gerados durante a biorremediação, sugere-se que se faça imediatamente a correção do pH do solo, caso contrário, a eficiência do processo poderá ser diminuída consideravelmente. Normalmente, essa correção é feita por meio de "calagem", processo através do qual se aplica calcário ao solo, objetivando neutralizar a acidez e, então, propiciar condições para o desenvolvimento de plantas e de microorganismos. Salienta-se, porém, que nos solos ácidos o desenvolvimento dos microorganismos é bastante reduzido, principalmente das bactérias fixadoras do nitrogênio atmosférico, além de tornar o fósforo de difícil aproveitamento pelos vegetais. Nesta situação, embora a biodegradação de hidrocar-

bonetos de petróleo seja, na maioria das vezes, realizada por bactérias, pesquisas mostram que a utilização de fungos é uma opção considerada bastante viável. Esses microorganismos têm sido mais eficientes que as bactérias para agirem em condições ambientais adversas, como em valores extremos de pH (menor que 5 e maior que 10), em concentrações limitadas de nutrientes e em solos com teores reduzidos de umidade (Vidali, 2001).



**Figura 4.** Resposta típica de uma população de bactérias mesófilas em função da variação da temperatura dos solos (modificado de Tate, 1995)

A análise da Figura 4 mostra que a faixa de temperatura ideal para os microorganismos metabolizarem os contaminantes com eficiência ótima está entre 25 e 30 °C, na qual se encontra a temperatura média da maior parte dos solos do Brasil contendo áreas degradadas por contaminação de hidrocarbonetos do petróleo (Tate, 1995). Analogamente, estudos realizados pela EPA (1995) constatam que a atividade microbiana é bastante comprometida em temperaturas abaixo de 10 °C e acima de 45 °C. Esta é uma excelente característica para a utilização de biorremediação em solos tipicamente brasileiros e, portanto, reforça a probabilidade da implantação dessa técnica em números maiores de locais contaminados. Além disso, verifica-se que a temperatura do solo varia diariamente nas proximidades da superfície, em solos com baixa densidade de cobertura vegetal.

Abaixo de 50 cm, a variação da temperatura dos solos é pouco significativa.

Por outro lado, a presença da vegetação sobre a área contaminada também afeta muitos atributos físicos dos solos, incluindo estrutura, porosidade, condutividade hidráulica e taxa de infiltração. Esses atributos, em geral, influenciam positivamente a atividade microbiológica por regular o transporte requerido de água e de nutrientes através do perfil dos solos e por controlar a aeração da zona vadosa. Além do mais, a biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo é assistida por microorganismos, que, em geral, dependem fortemente das quantidades de umidade e de oxigênio adequadas. As propriedades físicas dos solos influenciam o transporte de ambas espécies, oxigênio e água. Nesse caso, para a biorremediação de solos, os conteúdos de água entre 50 e 80 % da capacidade e o teor de O<sub>2</sub> dissolvido maior que

1 mg L<sup>-1</sup>, geralmente, são ótimos para a atividade microbiológica (Morgan & Watkinson 1989).

Portanto, conforme aventado na presente revisão, observa-se que os solos possuem, naturalmente, diversos microorganismos com atividades metabólicas variadas e que são capazes de degradar eficientemente diferentes contaminantes, como o petróleo e seus derivados. Contudo, em alguns casos, a contaminação de solos por estas substâncias tem se tornado uma problemática mundial, principalmente, devido à dificuldade de reabilitar a área contaminada. Estes problemas têm ocorrido, pois uma das principais dificuldades envolvendo a descontaminação dessas matrizes está relacionada, entre outros fatores, à presença de materiais argilominerais. Estes argilominerais, quando presentes em quantidades elevadas no solo contaminado, podem reduzir consideravelmente a eficiência do processo de biorremediação. Sabe-se que os solos argilosos, de modo geral, apresentam baixa permeabilidade, o que pode comprometer significativamente tanto a difusão de oxigênio, que é o elemento fundamental ao processo aeróbico de degradação, bem como a incorporação de nutrientes. É evidente que a estrutura dos solos também exerce influências significativas sobre as características físico-químicas. Dependendo da estrutura, mesmo que os solos sejam argilosos, eles podem ter permeabilidades elevadas. Os latossolos argilosos, por exemplo, que ocupam extensas áreas no Brasil, apresentam comumente estrutura granular e, desta forma, elevada permeabilidade.

Além da presença de argilominerais, muitos compostos orgânicos apresentam como características físico-químicas, baixa solubilidade em água, elevada afinidade pela matéria orgânica do solo, como os ácidos húmico e fúlvico e, conseqüentemente, baixa taxa de transferência de poluentes da fase sólida para a aquosa. Sendo assim, devido principalmente às características hidrofóbicas, esses contaminantes tendem a se adsorverem nos colóides do solo dificultando a ação de microorganismos e, por conseqüente, inviabilizando a técnica de biorremediação. Portanto, outra limitação da biorremediação surge devido à baixa disponibilidade de contaminantes orgânicos, como os HPA e outros hidrocarbonetos de petróleos. Schwarzenbach et al. (1993) presenciaram e

relataram sobre estas e outras propriedades para os HPA estudados.

Nesse contexto, a utilização de um agente tensoativo pode minimizar essas dificuldades e aumentar a eficiência da biorremediação, haja vista que os problemas relativos à baixa solubilidade em água, elevada adsorção e baixa transferência dos hidrocarbonetos para a fase aquosa, são minimizados. De acordo com Ou (2000), de fato, a maior eficiência na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo pode ser alcançada empregando-se surfactantes. Estes compostos diminuem a tensão superficial entre a fase aquosa (na qual normalmente ocorre a degradação do contaminante) e a fase orgânica (na qual o contaminante se encontra inicialmente presente), favorecem a dessorção e, conseqüentemente, aumentam a solubilidade dos contaminantes. Os surfactantes, como o dodecil sulfato de sódio, são capazes de emulsificar e aumentar a solubilidade dos contaminantes hidrofóbicos, tornando-os mais acessíveis aos microorganismos (CLU-IN, 2006).

Contudo, conclui-se que a degradação biológica de compostos orgânicos é alcançada com eficiência somente em condições naturais favoráveis, que proporcionem interações otimizadas entre o microorganismo e o solo, entre o microorganismo e o contaminante, assim como a relação mútua dos microorganismos entre si. Por exemplo, Coulon & Delille (2006) e Hawrot & Nowak (2006) investigaram que as propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo e as condições climáticas, podem alterar a taxa de biodegradação de poluentes em solos contaminados, por exemplo, com óleo diesel. Neste caso, podem ser empregados nutrientes, como o nitrogênio, o fósforo e o potássio, além de procedimentos para a correção de umidade e o controle da aeração para acelerar os processos de biorremediação. A Figura 5 mostra o esquema típico de um projeto envolvendo a aplicação *in-situ* da biorremediação (EPA, 2003b).

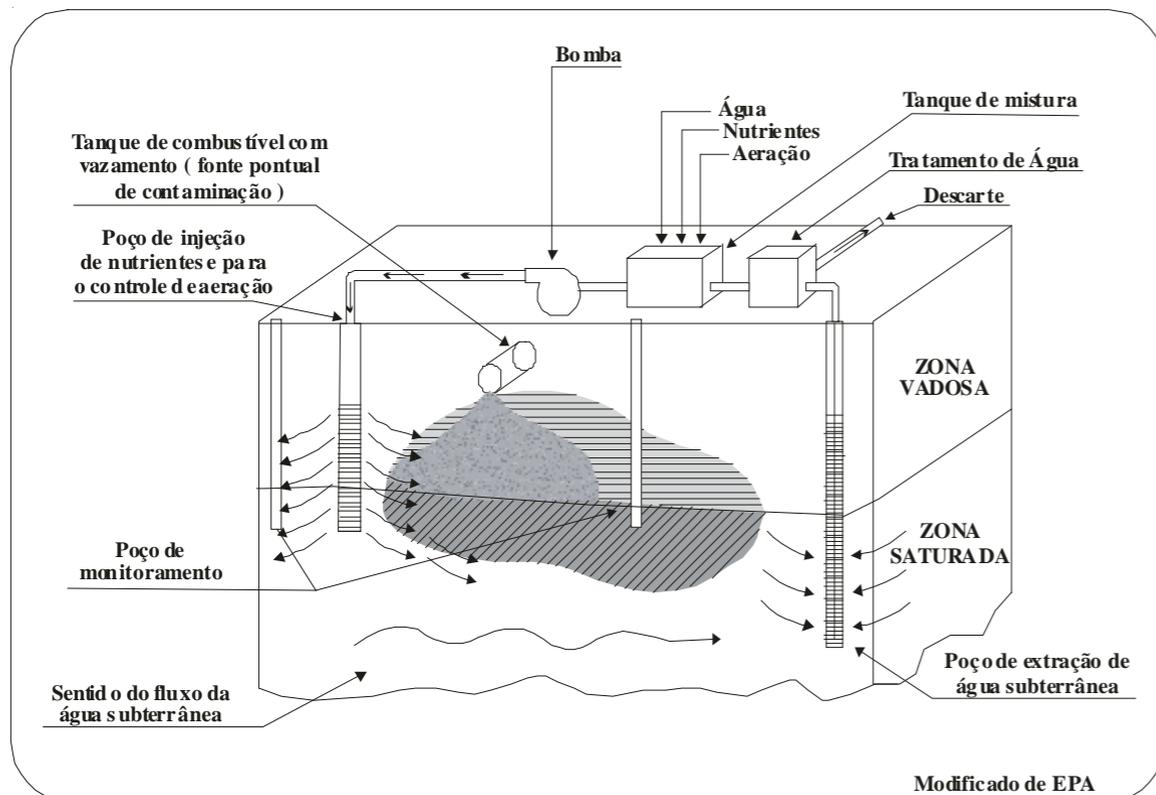


Figura 5. Esquema típico do tratamento de solos e de águas subterrâneas por biorremediação (EPA, 2003b)

#### Técnicas de utilização da biorremediação

Desde os meados dos anos 80 do século XX, as estratégias de biorremediação têm sido adotadas como uma maneira eficaz e de custo baixo para o tratamento de solos contaminados com petróleo (Delfino & Miles, 1985; Tsao et al., 1998; van der Hoek et al., 1989). As diferentes estratégias de biorremediação, em geral, visam aumentar a população microbiana criando condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento (Silva et al., 2004). A seguir, serão apresentadas duas das técnicas principais de biorremediação *in-situ*, a primeira é a “atenuação natural acelerada”, também conhecida por “bioestimulação” e, a segunda, trata-se da “bioaumentação”. Em seguida, será descrita uma das técnicas mais utilizadas para o tratamento *ex-situ* de solos contaminados, que é a biorremediação por “biopilhas”.

#### Atenuação natural acelerada (bioestimula-

ção)

A técnica denominada de atenuação natural acelerada (ANA), diferente da ANM (técnica descrita anteriormente), é uma opção de biorremediação *in-situ* na qual se busca, especialmente, instigar o crescimento da população microbiana nativa. Isto ocorre, fundamentalmente, pelo condicionamento do hábitat natural desses microorganismos. Portanto, na ANA, a idéia fundamental é condicionar o local contaminado, de modo a acelerar o processo de atenuação natural, estimulando, sobretudo, o desenvolvimento dos microorganismos autóctones (indígenos). Ressalta-se aqui, que esses microorganismos, para serem definidos com tal, devem ser nativos da região biogeográfica, em que se pretende a sua aplicação, participando de funções reprodutivas, de ciclo de nutrientes e de fluxos de energia (EPA, 2004d).

Para que esta técnica de biorremediação seja utilizada de forma eficiente, o primeiro requisito a ser atendido é a necessidade dos microor-

ganismos indígenas apresentarem a capacidade de descontaminar o poluente alvo. A ANA, quando utilizada de forma controlada, é capaz de acelerar o processo natural e diminuir o tempo de biorremediação do local, sendo que para isto, normalmente adiciona-se um ou mais dos seguintes compostos: oxigênio, hidrogênio e nutrientes. A adição de nutrientes e a otimização das condições ambientais permitem aumentar a taxa de crescimento e as atividades metabólicas de microorganismos, com o conseqüente aumento da velocidade e da porcentagem de biodegradação. Neste contexto, a bioestimulação pode oferecer custo mais baixo em relação às demais técnicas de biorremediação (EPA, 2004d).

#### Bioaumentação

A bioaumentação, apesar de ser uma técnica relativamente recente e ainda em fase de desenvolvimento, encontra-se bem documentada na literatura. Resumidamente, ela é caracterizada pelo aumento da microbiota nativa através da inoculação de microorganismos exógenos (alóctones). Estes microorganismos são pertencentes à espécie não nativa de determinada região biogeográfica, introduzidos em um ecossistema, podendo persistir e até reproduzir-se por um tempo, participando ou não de interações e de transformações ecológicas (EPA, 2004d).

A utilização da bioaumentação em solos, basicamente, é justificada pela necessidade 1) de uma biodegradação rápida do composto poluente e 2) da redução do período de adaptação que normalmente antecede o processo de degradação pelos microorganismos autóctones. O emprego desta técnica depende, primeiramente, da concordância e da autorização de órgãos governamentais e de agências de fiscalização ambiental, como a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). A aprovação da bioaumentação como estratégia de biorremediação depende de vários fatores, dentre os quais, os tipos de microorganismos utilizados e a área de aplicação.

Nessa conjuntura, ressalva deve ser feita no que diz respeito à utilização da bioaumentação em solos tipicamente brasileiros. Até junho de 2007, no Brasil, era proibida a utilização desta técnica em quaisquer condições e loca-

lizações. No entanto, em 22 de junho de 2007, a CETESB, através da Decisão de Diretoria (DD) nº 103/2007/C/E (essa DD possui caráter normativo), publicou a seguinte informação: “... A utilização de microorganismos alóctones nos sistemas de remediação deverá seguir as normas técnicas CETESB e as legais pertinentes...” (CETESB, 2007a). Assim sendo, após essa data, a utilização da bioaumentação passou a ser permitida no Brasil, mais especificamente no Estado de São Paulo, porém, desde que sejam seguidas as normas pertinentes, explicitadas no referido documento. Dentre as normas a serem seguidas, destaca-se a norma técnica da CETESB nº L1.022, de junho de 2007, que trata sobre o uso de produtos biotecnológicos, constituídos de microorganismos, destinados ao tratamento de efluentes líquidos, de resíduos sólidos e à remediação de solos e de águas (CETESB, 2007b).

Atualmente, muitos produtos têm sido lançados no mercado mundial com o intuito de auxiliar no tratamento de solos contaminados por petróleo. Alguns produtos comerciais apresentam, em sua composição, microorganismos exógenos que são utilizados com o objetivo de induzir a bioaumentação do solo a ser tratado. A fim de melhorar as condições de biodegradação do contaminante, ou seja, de favorecer a bioestimulação, determinados produtos também apresentam em sua formulação, micronutrientes, enzimas de ação externa e surfactantes que facilitam e estimulam a ação microbiana sobre os poluentes. Neste caso, as enzimas de ação externa atuam favorecendo a oxidação dos compostos de difícil degradação em compostos de fácil assimilação pelos microorganismos. Existem, porém, dois tipos básicos de enzimas que na presença de O<sub>2</sub> atuam na oxidação de hidrocarbonetos: as “monoxigenases”, que atuam sobre os *n*-alcanos; e as “dioxigenases”, que atuam sobre os compostos aromáticos e cíclicos. Por outro lado, os surfactantes agem de maneira a disponibilizar o petróleo para que este seja mais facilmente degradado pela microbiota (Shuhong et al., 2006).

Inversamente às vantagens apresentadas, em casos nos quais a bioaumentação de solos se mostra ineficiente, o insucesso da introdução de microorganismos poderá estar relacionado com alguns fatores, como a limitação de nutrientes, a

eliminação por predatismo de microorganismos introduzidos, a concentração de poluente orgânico muito baixa para suportar o desenvolvimento e, até mesmo, aos fatores ambientais desfavoráveis ao crescimento desses microorganismos (Alexander, 1999; Sims et al., 1992). Além disso, o lançamento de microorganismos alóctones pode acarretar em riscos consideráveis ao meio ambiente. Desta maneira, em função dos riscos ambientais associados, por exemplo, ao emprego de produtos biotecnológicos, é de suma importância que tais produtos sejam devidamente avaliados antes de sua aplicação para, então, promover a degradação de poluentes em sistemas de tratamento de resíduos ou em locais contaminados. Este procedimento deve ser realizado cuidadosamente, visando a sua utilização como prática segura e eficaz dos pontos de vista ambiental e sanitário.

Segundo a CETESB, os produtos biotecnológicos podem ser constituídos de microorganismos viáveis, metabólitos (como as enzimas) ou, ainda, misturas de microorganismos e metabólitos contendo produtos orgânicos e inorgânicos, atuando como conservantes, estabilizantes, nutrientes, ativadores e outros. A grande preocupação, portanto, é que os microorganismos viáveis presentes no produto acabado podem reproduzir-se, disseminar-se por novos locais e até transferir material genético para os microorganismos naturalmente presentes no ambiente. Do mesmo modo, as enzimas podem catalisar reações que interfiram no metabolismo normal de organismos originariamente existentes e, além disso, a introdução de nutrientes e de outros compostos podem provocar o desequilíbrio do ecossistema (CETESB, 2007b).

Apesar de toda essa discussão, a respeito da inserção de microorganismos não-indígenos no solo, Top & Springael (2003) defendem que o uso de microorganismos não modificados normalmente não constitui problema, contrariamente ao que se verifica com os microorganismos geneticamente modificados, cuja utilização requer uma avaliação mais criteriosa. Assim sendo, as técnicas biológicas que envolvem o uso da bio-aumentação, isto é, que empregam a adição de microorganismos exógenos, devem ser analisadas criteriosamente devido, principalmente, aos riscos ambientais que a inserção de um microorganismo não nativo ao solo pode gerar. Por esse motivo,

as técnicas de biorremediação que aplicam apenas o uso da microbiota nativa podem vir a produzir resultados eficazes e de menor impacto ao meio ambiente (Silva et al., 2004).

### Biopilhas

O tratamento por biopilhas é controlado por processos biológicos *ex-situ* sob condições aeróbicas. Essa técnica de biorremediação envolve basicamente a disposição do material contaminado em montes denominados de biopilhas. Para o emprego desta técnica, inicialmente o solo é escavado e, em seguida, preparado e colocado em biopilhas, onde é feita a estimulação da atividade microbiana através de aeração, da adição de nutrientes e do aumento da umidade do solo, com o propósito de promover a biodegradação dos contaminantes de interesse. O esquema característico do sistema de um tratamento por biopilhas é mostrado na Figura 6 (EPA, 2004e).

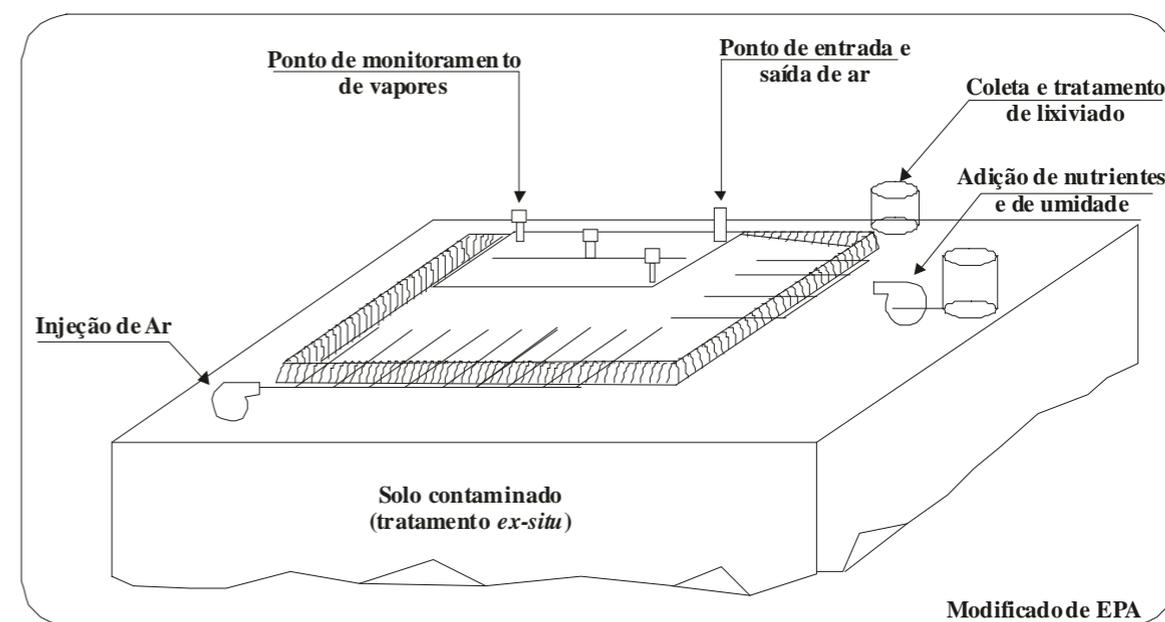


Figura 6. Esquema ilustrativo de um tratamento por biopilha (EPA, 2004e)

As biopilhas são construídas sobre uma base impermeável para reduzir o potencial de migração do lixiviado da camada superficial para a subsuperfície do solo. Além disso, elas são cobertas por uma membrana, também impermeável, para prevenir a liberação de contaminantes voláteis e semivoláteis do solo para a atmosfera, bem como para proteger o solo de intempéries naturais, como ventos e chuvas (USAEC, 2003a). Os materiais a serem tratados devem ser submetidos a um estudo prévio, para a comprovação da tratabilidade, mediante a realização de testes físico-químicos e de ensaios biológicos e posterior otimização das condicionantes em laboratório. O propósito destes estudos é avaliar o tipo e a concentração dos poluentes, a presença de possíveis inibidores da biodegradação, a estrutura do material, os teores ótimos de umidade, de nutrientes e de oxigênio, a temperatura e os demais fatores que influenciam no processo (EPA, 2004e).

Esta técnica de biorremediação apresenta como principal vantagem a possibilidade de maior controle das condições físicas, biológicas e químicas da matriz contaminada e, conseqüentemente, a obtenção de cinéticas de reação mais rápidas e a redução do tempo de degradação do contaminante

quando comparado ao processo de atenuação natural. Particularmente, quando as condicionantes do meio são bem controladas, as biopilhas têm sido bastante eficientes na redução da concentração de compostos derivados de petróleo presentes em solos. A maior limitação desta técnica está relacionada à remoção do solo contaminado, tendo em vista que o processo de tratamento ocorre no modo *ex-situ*. Neste caso, apesar de possibilitar a eliminação dos principais focos de contaminação na zona não-saturada, essa prática deve ser realizada com cautela, pois pode propiciar a intensificação do risco às vias de exposição humana, como a inalação de vapores e de materiais particulados contaminados, cuja causa é advinda da transferência do passivo de um compartimento ambiental para outro (durante a escavação, o armazenamento, o transporte e a redistribuição dos solos contaminados). O passivo ambiental dessa área é composto não apenas do material que está sobre o solo e pode ser contabilizado facilmente, mas também de todo o contaminante que possivelmente foi lixiviado da superfície do solo e pode estar no aquífero ou em bolsões localizados na subsuperfície. Além disso, a remoção e a redistribuição de solos, dependendo da quantidade do material removido,

podem se tornar a alternativa mais onerosa dentre as técnicas de remediação, pois, além dos custos relacionados com a remoção propriamente, devem ser considerados os custos do transporte, do tratamento e da disposição final do solo tratado, além de outras exigências, como o treinamento de pessoal. Essa prática também apresenta a desvantagem de que a remoção do solo deve ser realizada com todos os cuidados para que não ocorra a propagação da contaminação para outros meios, inicialmente os não afetados, como o ar e as águas, ao exemplo do que ocorreria durante a remoção de solos contaminados com substâncias voláteis (EPA, 2004e).

Assim sendo, o transporte e o tratamento *off-site* dos solos por biopilhas possibilitam a transferência do problema para outros locais que

também poderão se tornar contaminados. Por essas razões a adoção da técnica de remoção de solos se justifica somente nos casos os quais há a presença de resíduos perigosos, de solos altamente contaminados ou em que uma análise mais criteriosa demonstre a impossibilidade de aplicação de outras técnicas, de maneira a se atingir as metas de remediação requeridas, no intervalo de tempo desejado (EPA, 2004e).

Entretanto, não obstante às limitações apresentadas, de modo geral, a aplicação da biorremediação vem sendo muito estudada em diversos países e destaca-se como uma alternativa promissora para o tratamento de sítios contaminados por petróleo e seus derivados. A Tabela 1 apresenta as principais vantagens e limitações inerentes à biorremediação de solos.

**Tabela 1.** Vantagens e limitações da biorremediação de solos

VANTAGENS	LIMITAÇÕES
A aplicação envolve o uso de equipamentos de fácil obtenção, instalação e operação.	Podem ser requeridos monitoramento contínuo por tempos longos e/ou manutenção do sítio submetido à biorremediação.
Em atividades in-situ, a biorremediação gera distúrbios mínimos ao meio ambiente.	A técnica é ineficiente para compostos orgânicos que ficam adsorvidos no solo, tornando-os indisponíveis à biodegradação.
Em condições ótimas de operação, apresenta custos menores em comparação às técnicas alternativas de remediação.	É menos eficiente em períodos menores de tempo em comparação às outras técnicas de remediação, como os POA.
Pode ser combinada com outras técnicas, como a SVE, para acelerar o processo de descontaminação.	Contaminantes de baixa solubilidade em concentrações elevadas, como os HTP, podem ser tóxicos aos microorganismos e/ou não biodegradáveis, inviabilizando a utilização da técnica.
Na maioria dos casos, essa técnica não produz compostos tóxicos, que devem ser dispostos e tratados em outro local.	As propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo e as condições climáticas, podem alterar a taxa de biodegradação.
É muito eficiente na biodegradação de petróleo e seus derivados em solos permeáveis.	Dificuldade de utilização em solos argilosos ou com baixa permeabilidade.

Ressalta-se que no Brasil, até o momento, apenas alguns estudos foram realizados abordando a temática de biorremediação de solos. Ao contrário, em outros países, como nos Estados Unidos, essa questão é estudada com frequência, tanto no meio acadêmico como no industrial. Por isso, nos últimos

anos, a biorremediação de solos tem se tornado tema recorrente de muitos estudos acadêmicos, gerando literatura técnico-científica abundante.

## LEGISLAÇÃO AMBIENTAL

Conforme foi discutido, considerando as contaminações de solos por petróleo e seus derivados, caso os compostos orgânicos oriundos dessa contaminação fossem distribuídos em ordem de “toxicidade”, “persistência no meio ambiente” e “efeitos carcinogênicos e mutagênicos”, os BTEX, HPA e HTP representariam as três classes de compostos mais importantes a serem estudadas. Sendo que, especialmente por esse motivo, estes compostos têm sido frequentemente objetos de discussões nos órgãos governamentais de fiscalização ambiental (VROM, 1994).

De acordo com as legislações ambientais mais avançadas, como a da Holanda (*Dutch Reference Framework STI – Values*), a biorremediação só é reconhecida como tal se recuperar o solo integralmente, com base no padrão agrícola de fertilidade. O Ministério da Habitação, Planejamento e Meio Ambiente Holandês (VROM) publicou, em atendimento à Lei de Proteção de Solo (*Soil Protection Act*), os valores das concentrações permi-

**Tabela 2.** Valores de referência (S), de alerta (T) e de intervenção (I) para solos, segundo a legislação holandesa, considerando-se os teores de argila e de matéria orgânica de 0 % (CETESB, 2001; VROM, 1994)

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO EM PESO SECO (mg kg <sup>-1</sup> )		
	S	T	I
Benzeno	0,01	0,11	0,20
Tolueno	0,01	13,0	26,0
Etilbenzeno	0,01	5,0	10,0
Xilenos	0,01	2,5	5,0
HPA	0,2	4,1	8,0
HTP	10	505	1000

No Brasil, mais especificamente no Estado de São Paulo, os valores orientadores para solos são mostrados na Tabela 3. Neste, os valores descritos para os HPA correspondem à soma das concentrações de dez compostos prioritários selecionados pela CETESB (ver a lista dos compostos no rodapé da Tabela 3). Vale ressaltar que, no Brasil, não existe uma legislação específica para HPA total, bem como para HTP (CETESB, 2005).

tidas de compostos potencialmente poluidores ao meio ambiente. Para a determinação das concentrações máximas permitidas de cada composto, vários fatores foram considerados, dentre estes, a modelagem de avaliação de risco e a variação das porcentagens de matéria orgânica e de argila em solos. Com base nas características físico-químicas das matrizes estudadas, os novos valores das concentrações foram divididos em três níveis distintos, denominados de “valores STI”. (onde S: *Streefwaarde*, representa os valores de referência; T: *Toetsingswaarde*, os valores de alerta; e I: *Interventiewaarde*, os valores de intervenção) (VROM, 1994).

Os valores para BTEX, HPA e HTP, estabelecidos pelo governo federal holandês são mostrados na Tabela 2 (CETESB, 2001; VROM, 1994). Para efeito comparativo entre as concentrações estabelecidas pelos órgãos de fiscalização ambiental, nesta Tabela são mostrados somente os valores de referência, alerta e intervenção para solos, desconsiderando os teores de argila e de matéria orgânica. Esta medida foi adotada, pois, os demais órgãos ambientais não consideram porcentagens de matéria orgânica e de argila em solos para os cálculos das concentrações.

**Tabela 3.** Valores orientadores para solos no Brasil (CETESB, 2005)

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO EM PESO SECO (mg kg <sup>-1</sup> )			
	Valores de prevenção	Valores de intervenção		
		agrícola	residencial	industrial
Benzeno	0,03	0,06	0,08	0,15
Tolueno	0,14	30	30	75
Etilbenzeno	6,2	35	40	95
Xilenos	0,13	25	30	70
HPA*	12,7	56,6	147,1	384,8
HTP	---	---	---	---

\* Soma das concentrações de dez compostos selecionados pela CETESB: antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(a)pireno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, indeno(1,2,3-c,d)pireno e naftaleno.

#### APLICAÇÕES E INOVAÇÕES DA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS

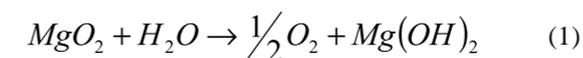
Baseados na descoberta de que os microorganismos endógenos, presentes em areias de praias ou em solos, podem degradar hidrocarbonetos de petróleo nesses locais, desde então, muitas pesquisas vêm sendo realizadas envolvendo a biorremediação. Os baixos custos envolvidos nas transformações bioquímicas *in-situ*, além da possibilidade de redução ou até mesmo de eliminação total dos contaminantes, são condições que favorecem a atratividade das técnicas de biorremediação. Esses fatores atualmente têm sido considerados como os principais responsáveis pelas vastas aplicações e inovações surgidas na área de remediação de solos mediada por microorganismos.

A maioria das inovações envolvendo a biorremediação de solos, ao contrário de diversas técnicas ligadas à degradação de compostos orgânicos, não está relacionada com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas e de novos equipamentos empregados para o monitoramento ambiental e para a identificação desses compostos. O estado da arte está focado no desenvolvimento de novos reagentes, que têm sido produzidos com o objetivo de serem utilizados *in-situ* para acelerar e melhorar a eficiência da biorremediação. Além

disso, as inovações nessa área também estão direcionadas ao estudo biotecnológico envolvendo a geração de organismos geneticamente modificados, desenvolvidos com o intuito de degradarem contaminantes específicos em diferentes nichos ecológicos (Saul et al., 2005; Sánchez et al., 2006).

No tocante ao desenvolvimento de novos reagentes, cujas utilizações estão voltadas para a aceleração de processos bioquímicos de degradação *in-situ*, podem-se citar os trabalhos atuais de uma empresa localizada na Califórnia (EUA), denominada "Regenesis". Esta empresa realiza, entre outras atividades, serviços de consultoria e de remediação ambiental, além de desenvolver e comercializar produtos que aceleram a degradação natural de contaminantes. Um dos produtos desta empresa é o *Oxygen Release Compound* (ORC<sup>®</sup>), que vem sendo amplamente empregado em inúmeros casos reais, sendo que existe um histórico da aplicação deste produto em mais de 11.000 locais de contaminação. Neste caso, a degradação aeróbica de hidrocarbonetos de petróleo, utilizando-se o ORC<sup>®</sup>, consiste, basicamente, na adição de peróxido de magnésio e de fosfato. Pesquisas mostram que estes reagentes, dependendo das condições do local, quando hidratados, podem liberar oxigênio molecular de maneira lenta e em

concentrações controladas durante um período de até 12 meses (Bastiaens et al., 2003; Colvin, 2005; Fukada & Takagi, 2003; Koennigsberg & Willett, 2005; Reed, 2004; Wynn, 2003). A equação química dessa reação é:



Ressalta-se que, no Brasil, a CETESB já aprovou a utilização dos reagentes produzidos pela Regenesis, em casos de biorremediação de solos. O método mais recente e recomendado pela EPA para a quantificação dos compostos do petróleo e derivados é o Método 8260C. Assim como neste método, a maioria das determinações de BTEX, HPA e HTP, descrita por outros métodos, é realizada empregando técnicas analíticas baseadas em cromatografia gasosa. Para a quantificação destes compostos, os detectores mais utilizados são o por ionização em chama e o espectrômetro de massas. Equipamentos de campo, como medidores de gases, também são comumente utilizados para o monitoramento destes compostos. Geralmente, esses equipamentos operam com detectores de infravermelho (EPA, 2006).

De acordo com Maila & Cloete (2005), as atividades biológicas dos solos são vitais para a restauração de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. Muitas espécies de microorganismos dos solos conseguem metabolizar derivados do petróleo reduzindo-os em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (produtos de sua completa mineralização). Neste caso, cerca de 50 % da matéria orgânica é incorporada à biomassa e os outros 50 % são transformados em dióxido de carbono. Dessa forma, o total do contaminante consumido pode ser quantificado através da geração de CO<sub>2</sub>. Assim, o processo de biodegradação pode ser acompanhado por cromatografia gasosa, mediante a dosagem deste composto, utilizando detectores por condutividade térmica ou de infravermelho não-dispersivo. Portanto, o percentual de biodegradação (PB) do petróleo aderido ao solo é calculado pela Equação 2 (Jaramillo, 1996).

$$PB(\%) = (C_{consumido} \times 100) / C_i, \quad (2)$$

onde:

$$C_{consumido} = 2 \times (CO_2 \text{ acumulado ao longo do processo})_e$$

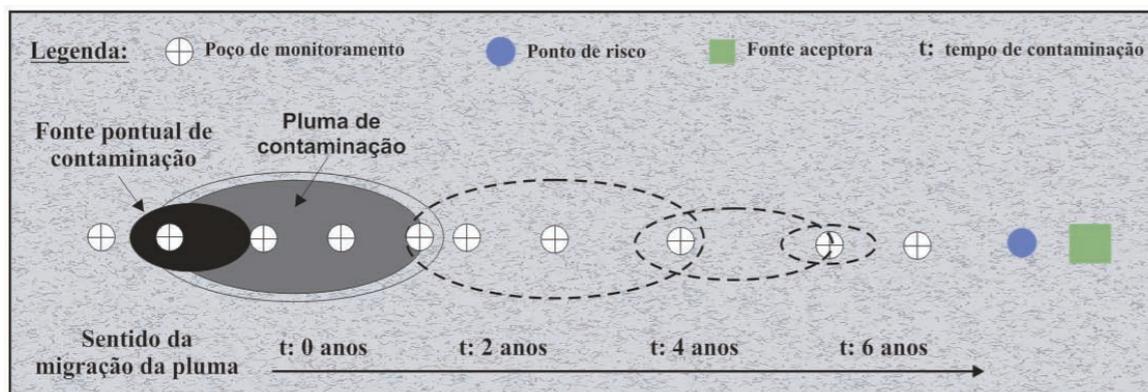
$$C_i = \text{concentração inicial de carbono}$$

#### CONSIDERAÇÕES GERAIS E CONCLUSÕES

Qualquer prática de biorremediação que se baseia em processos de degradação de contaminantes orgânicos, deve ser iniciada com um extenso e cauteloso levantamento hidrogeológico, geoquímico e microbiológico da área contaminada. Dependendo das condições da região, a cinética de biodegradação dos compostos será mais rápida ou mais lenta. As condicionantes do meio, devidamente estudadas, vão nortear não apenas a melhor técnica de extração ou eliminação de contaminantes, como também a possibilidade de biodegradação dos poluentes, o que normalmente pode ocorrer como um polimento ou um incremento da remediação, com ou sem estímulo da microbiota local.

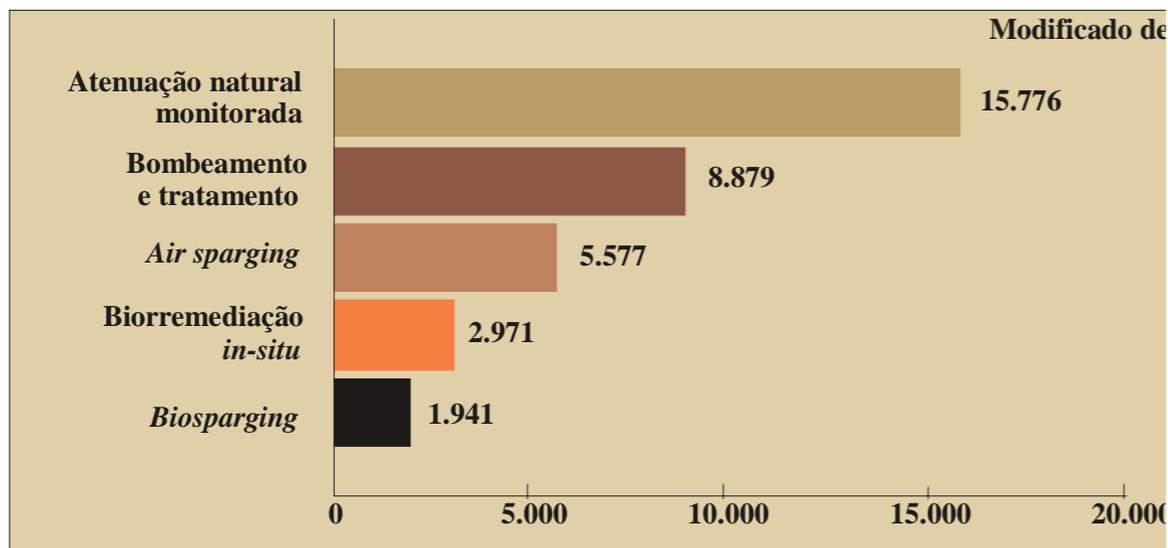
Além da importância de se definir a técnica a ser empregada, uma etapa preliminar de diagnóstico da área contaminada também se faz necessária, pois permite que os profissionais responsáveis pela remediação decidam, por exemplo, pelo uso de processos adicionais para acelerar a biorremediação ou, em alguns casos, para promover a atenuação natural monitorada. Neste último método, a ANM pode ser utilizada, principalmente, nos casos em que uma análise exploratória permite definir que a contaminação não representa riscos à sociedade, em curto, médio ou longo prazo. Dessa maneira, é de grande importância realizar uma análise de risco do local e, em seguida, determinar a taxa de degradação como forma de prever até onde a pluma de contaminação irá se deslocar. Como mostra a Figura 7, quando a taxa de biodegradação for igual ou maior que a taxa de deslocamento dos contaminantes, a pluma deixará de se deslocar e diminuirá de tamanho. Neste caso, se a fonte receptora não for atingida, não existe a necessidade de implantação de métodos mais drásticos e, então, a ANM seria uma opção economicamente viável de recuperação da área contaminada. No entanto, se o processo de ANM

não evitar o deslocamento da pluma até as regiões de risco, são necessários métodos que acelerem a degradação dos contaminantes (EPA, 2004b; USAEC, 2003b).



**Figura 7.** Exemplo da atenuação natural monitorada de uma pluma de hidrocarbonetos de petróleo

Portanto, trabalhos de diagnóstico correto e a implantação de um programa de ANM podem reduzir consideravelmente o custo da remediação e evitar uma nova intervenção humana no local contaminado. Com base nessa informação, não é por acaso que nos Estados Unidos, onde o mercado ambiental se encontra mais bem desenvolvido que no Brasil, a maior parte dos programas para a remediação de contaminações causadas por vazamento de tanques de combustíveis subterrâneos é feita por atenuação natural monitorada, como mostram os dados da Figura 8 (EPA, 2004b).



**Figura 8.** Número de locais contaminados por combustíveis procedentes do vazamento de tanques subterrâneos versus as diferentes técnicas de remediação empregadas para o tratamento desses tanques instalados nos EUA (EPA, 2004b)

Segundo a EPA (2004b), como apresentado na Figura 8, nos EUA há quase 16 mil casos de ANM utilizados em contaminações por tanques de combustíveis subterrâneos contra, aproximadamente, três mil práticas de biorremediação *in-situ* usadas com a mesma finalidade. Portanto, se não há risco que justifique pressa para a remediação da área contaminada por poluentes solúveis (alvo maior da bioestimulação) ou insolúveis, recomenda-se deixar a natureza se autodepurar, ou seja, optar pela atenuação natural. Ressalta-se, no entanto, que nos casos de adoção da técnica da atenuação natural, os custos envolvidos na fase de estudos podem ser bastante elevados, face à grande quantidade de informações necessárias para subsidiar a tomada de decisão. É claro que todas essas informações relacionadas aos custos e à eficiência da técnica devem ser ponderadas e estudadas em laboratórios, antes de qualquer aplicação em grande escala.

Uma outra possibilidade plausível de intervenção, conforme recomendada pela CETESB (2004), seria a alteração do uso e da ocupação do solo. Esta alternativa envolve os mesmos princípios da atenuação natural com monitoramento, com a diferença que, para garantir a ausência de riscos à saúde pública, ao ambiente e aos demais bens a proteger, faz-se necessária uma redefinição ou restrição do uso do solo na área afetada. Esta restrição deve ser válida durante o período no qual o programa de monitoramento seja mantido.

Segundo a CETESB (2006), os trabalhos envolvendo a biorremediação de solos, ocorrem em maior número no Estado de São Paulo, onde a maior parte das áreas contaminadas, catalogadas por esta agência ambiental, são provenientes de vazamentos de tanques subterrâneos de postos de serviços. Em contaminações deste tipo, tem prevalecido a utilização da biorremediação aeróbica *in-situ*. Entretanto, segundo Aislabie et al. (2006), vale considerar que vários fatores podem afetar a eficiência das técnicas de biorremediação *in-situ*. Dentre eles, o oxigênio tem se revelado o fator limitante para microorganismos capazes de degradar aerobicamente contaminantes como o petróleo e seus derivados. Na ausência da concentração adequada de oxigênio, a degradação dos contaminantes irá cessar ou poderá proceder de forma mais lenta por processos anaeróbicos. Também foi

constatado por alguns pesquisadores que o tratamento de solos utilizando as técnicas de biorremediação *in-situ* é tipicamente mais barato que os tratamentos *ex-situ*. Nos processos *in-situ*, há um mínimo de distúrbio do local, além de não ser necessária a utilização de grandes equipamentos. Por outro lado, no processo *ex-situ*, os trabalhos que envolvem a remoção e o transporte das zonas contaminadas, na maioria das vezes, é economicamente dispendioso, aumenta a exposição dos trabalhadores aos contaminantes e nem sempre conduz à destruição ou à redução da toxicidade dos compostos.

De modo geral, a biorremediação de solos apresenta-se como uma técnica bastante eficiente na degradação de petróleo e seus derivados, mesmo em condições ambientais extremas (Margesin & Schinner, 2001). Isso pode ser comprovado facilmente pelo grande número de trabalhos publicados recentemente em periódicos de grande relevância para a comunidade científica. Não obstante à existência de alguns interferentes, como as condições ambientais (principalmente os teores de umidade e de aeração dos solos) e a disponibilidade de nutrientes, as vantagens como a relação custo-benefício e a eficiência de degradação de compostos tóxicos e recalcitrantes, têm feito com que essa técnica de remediação seja utilizada com frequência em vários países desenvolvidos. Porém, ao contrário do que tem acontecido nos Estados Unidos, no Brasil os projetos de biorremediação e de atenuação natural monitorada ainda estão no campo da teoria, com poucos casos práticos, embora exista uma real probabilidade de expansão. No caso do Brasil, a biorremediação *in-situ* é favorecida pelas condições necessárias para a implementação de técnica, sobretudo, pelas condições climáticas típicas da maioria das regiões geográficas nacionais.

Portanto, frente ao exposto, é imperativo que o profissional responsável pela reabilitação da área apresente uma caracterização completa do local contaminado, identificando os tipos de contaminantes presentes, a delimitação da pluma de contaminação e uma avaliação correta do passivo ambiental existente não apenas na área visível, mas também, no subsolo. Essas informações de-

talhadas são fundamentais para que se possa avaliar corretamente o risco de se utilizar essa área para qualquer que seja o fim.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão do auxílio financeiro.

**Summary:** In view of the proven efficiency of bioremediation in the degradation of compounds toxic to humans, such as benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX), several companies, especially those related to remediation and environmental monitoring, have shown enormous interest in the deployment of bioremediation as an option for the rehabilitation of contaminated areas. In developed countries such as the United States, Canada and several European countries, these biochemical remediation techniques have been widely used in work that is based, for example, on the treatment of soil contaminated by petroleum hydrocarbons. However, contrary to what has been done in these countries, in Brazil, bioremediation projects are still mainly theoretical, with few practical cases, but there is a real likelihood of expansion. The more important aim of this review is to indicate the advantages that this technique can offer when it is used for the degradation of compounds such as BTEX in typical Brazilian soils, whose physico-chemical characteristics contribute to the degradation of contaminants. Research shows that environmental factors (such as moisture and oxygen levels) and the availability of soil nutrients, in addition to the climatic conditions in Brazil, are quite suitable for the employment of this technique. They may pose, as an advantage, a favorable cost/benefit ratio and the opportunity for greater efficiency in the degradation of toxic and recalcitrant compounds compared to the majority of conventional remediation techniques. In summary, this review focuses on the state of the art of bioremediation techniques of contaminants in soils, presenting the most current and recent applications and innovations, as reported in the national and international media.

**Index terms:** bioremediation, degradation, contaminants, petroleum hydrocarbons – BTEX, soil.

## REFERÊNCIAS

- [1] ACTON, D.W. & BARKER, J.F. In situ biodegradation potential of aromatic hydrocarbons in anaerobic groundwaters. *J. Contam. Hydrol.*, 9:325-352, 1992.
- [2] AELION, C.M. & BRADLEY, P.M. Aerobic biodegradation potential of subsurface microorganisms from a jet fuel-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:57-63, 1991.
- [3] AISLABIE, J.; SAUL, D.J. & FOGHT, J.M. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles*, 10:171-179, 2006.
- [4] AISLABIE, J.M.; BALKS, M.R.; FOGHT, J.M. & WATERHOUSE, E.J. Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management. *Environ. Sci. Technol.*, 38:1265-1274, 2004.
- [5] ALEXANDER, M. Biodegradation and Bioremediation. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego, California, Academic Press, 1999. 453p.
- [6] ALEXANDER, M. Introduction to Soil Microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. New York, John Wiley, 1977. p.423-437.
- [7] ANDRADE, J.A. Otimização da reação de Fenton visando aplicações na remediação *in-situ* e *ex-situ* de águas subterrâneas. Campinas, Universidade Estadual de Campinas, 2005. 249p. (Dissertação de Mestrado).
- [8] BASTIAENS, L.; VOS, J.; MAESEN, M.; SIMONS, Q.; LOOKMAN, R.; HENDRICKX, B.; DIELS, L.; VAN BOVEN, F.; CAMERLYNCK, S.; VANHOUCHE, F.; LOETE, B. & VAN GESTEL, G. The influence of ORC<sup>®</sup> injection on in-situ BTEX biodegradation and on endogenous micro-organisms. *P. Int. In-situ and On-site Bioremediation*. Battelle Press, 2003.
- [9] BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B. & FRANKENBERGER-JÚNIOR, W.T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Braz. J. Microbiol.*, 34:65-68, 2003.

- [10] BERNOTH, L.; FIRTH, I.; MCALLISTER, P. & RHODES, S. Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry. *Miner. Metall. Proc.*, 17:105-111, 2000.
- [11] BETANCUR-GALVIS, L.A.; BERNAL, D.A.; RAMOS-VALDIVIA, A.C. & DENDOOVEN, L. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated saline-alkaline soils of the former Lake Texcoco. *Chemosphere*, 62:1749-1760, 2006.
- [12] BOROLE, A.P.; SUBLETTE, K.L.; RATERMAN, K.T.; JAVANMARDIAN, M. & FISHER, J.B. The potential for intrinsic bioremediation of BTEX hydrocarbons in soil/ground water contaminated with gas condensate. *Appl. Biochem. Biotech.*, 63-65:719-730, 1997.
- [13] BROWN, R.A. In Situ Chemical Oxidation: Performance, Practice, and Pitfalls. AFCEE Technology Transfer Workshop, San Antonio, Texas, 2003. Disponível em: [http://www.clu-in.org/techfocus/default.focus/sec/In\\_Situ\\_Oxidation/download/techfocus/chemox/4\\_brown.pdf](http://www.clu-in.org/techfocus/default.focus/sec/In_Situ_Oxidation/download/techfocus/chemox/4_brown.pdf). Acesso em 06 mar. 2008.
- [14] CETESB: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Avaliação do Uso de Produtos Biotecnológicos para Tratamento de Efluentes Líquidos, Resíduos Sólidos e Remediação de Solos e Águas – L1.022, 2007b. 21p. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>. Acesso em 20 mar. 2008.
- [15] CETESB: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Decisão de Diretoria nº 103/2007/C/E, de 22 de junho de 2007, 2007a. 40p. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>. Acesso em 10 mar. 2008.
- [16] CETESB: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Manual de gerenciamento de áreas contaminadas. 2.ed., 2001. 389p.
- [17] CETESB: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Manual de gerenciamento de áreas contaminadas. Capítulo X – Investigação para Biorremediação, 2004. 77p.
- [18] CETESB: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Relação de áreas contaminadas, 2006. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>. Acesso em 07 mar. 2008.
- [19] CETESB: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo, 2005. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>. Acesso em 19 mar. 2008.
- [20] CHEN, K.F.; KAO, C.M.; CHEN, T.Y.; WENG, C.H. & TSAI, C.T. Intrinsic bioremediation of MTBE-contaminated groundwater at a petroleum-hydrocarbon spill site. *Environ. Geol.*, 50:439-445, 2006.
- [21] CLU-IN: HAZARDOUS WASTE CLEAN-UP INFORMATION. Technology Practices Manual for Surfactants and Cosolvents. CH2MHILL, 2006. Disponível em: <http://clu-in.org/>. Acesso em 13 mar. 2008.

- [22] COLVIN, G.H. Biostimulation and bioaugmentation of recalcitrant VOCs in groundwater using Hydrogen Release Compound (HRC<sup>®</sup>) and bio-dechlor inoculum (BDI)<sup>™</sup>. *P. Int. In-situ and On-site Bioremediation*, Battelle Press. 2005.
- [23] COULON, F. & DELILLE, D. Influence of substratum on the degradation processes in diesel polluted sub-Antarctic soils (Crozet Archipelago). *Polar Biol.*, 29:806-812, 2006.
- [24] CUSTANCE, S.R.; MCCAUGHY, P.A.; KOPF, A.C. & SULLIVAN, M.J. Environmental fate of the chemical mixtures: crude oil, jp-5, mineral spirits, and diesel fuel. *J. Soil Contam.*, 1:379-386, 1992.
- [25] DELFINO, J.J. & MILES, C.J. Aerobic and anaerobic degradation of organic contaminants in Florida groundwater. *Soil Crop Sci. Soc. Fl. Proc.*, 44:9-14, 1985.
- [26] DiGIULIO, D.C. & VARADHAN, R. Development of recommendations and methods to support assessment of soil venting performance and closure. U.S. EPA, ORD, EPA/600/R-01/070, 2001.
- [27] DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N. & JOHRI, A.K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl. Microbiol. Biot.*, 59:143-152, 2002.
- [28] EMBAR, K.; FORGACS, C. & SIVAN, A. The role of indigenous bacterial and fungal soil populations in the biodegradation of crude oil in a desert soil. *Biodegradation*, 17:369-377, 2006.
- [29] ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. (EPA 510-B-95-007), 1995. Disponível em: <http://www.epa.gov/swrust1/pubs/tums.htm>. Acesso em 07 mar. 2008.
- [30] EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES. A Citizen's Guide to Chemical Oxidation. EPA 542-F-01-013, 2001a.
- [31] EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. Chapter XIII – Chemical Oxidation, EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007 and EPA 510-R-04-002, 2004a. 52p.
- [32] EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. Chapter IX – Monitored Natural Attenuation, EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007 and EPA 510-R-04-002, 2004b. 77p.
- [33] EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. Chapter II – Soil Vapor Extraction, EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007 and EPA 510-R-04-002, 2004c. 36p.
- [34] EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES. How to Evaluate Alternative Cleanup

- Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. Chapter XII – Enhanced Aerobic Bioremediation, EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007 and EPA 510-R-04-002, 2004d. 73p.
- [35] EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. Chapter IV – Biopiles, EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007 and EPA 510-R-04-002, 2004e. 30p.
- [36] EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES. Integrated Risk Information System: benzene. CASRN 71-43-2, 2003a. Disponível em: <http://www.epa.gov/iris/subst/0276.htm>. Acesso em 22 mar. 2008.
- [37] EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES. Method 8260C: Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), 2006. Disponível em: <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/new-meth.htm>. Acesso em 24 mar. 2008.
- [38] EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. A Citizen's Guide to Bioremediation, Soil Waste and Emergency Response, EPA 542-F-01-001, 2001b. Disponível em: <http://www.epa.gov/>. Acesso em 15 mar. 2008.
- [39] EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Bioremediation in the field, 2003b. 39p. Disponível em: <http://www.epa.gov/>. Acesso em 10 mar. 2008.
- [40] FUKADA, S. & TAKAGI, K. Enhanced bioremediation of soil and groundwater at a petrol release site in Japan. P. Int. In-situ and On-site Bioremediation. Battelle Press, 2003.
- [41] GARNIER, P.M.; AURIA, R.; AUGUR, C. & REVAH, S. Metabolic degradation of methyl tert-butyl ether by a soil consortium: effect of components present in gasoline. J. Gen. Appl. Microbiol., 46:79-84, 2000.
- [42] HAWROT, M. & NOWAK, A. Effects of different soil treatments on diesel fuel biodegradation. Pol. J. Environ. Stud., 15:643-646, 2006.
- [43] HUTCHINSON, S.L.; SCHWAB, A.P. & BANKS, M.K. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in the rhizosphere. In: McCUTCHEON, S.C. & SCHNOOR, J.L., ed. Phytoremediation – Transformation and control of contaminants. Hoboken, New Jersey, John Wiley, 2003. p.355-386.
- [44] IARC: INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Carcinogenicity evaluation of BTEX, 71:829, 2006. Disponível em: <http://www.iarc.fr/>. Acesso em: 14 mar. 2008.
- [45] JARAMILLO, I.R. Fundamentos teóricos-práticos de temas selectos de la ciência Del suco. Parte 1, Universidad Autónoma Metropolitana, México. Apud: OLIVEIRA, F.R. & MILLIOLI, V.S. Utilização de técnica de bioestímulo, avaliando-se parâmetros como relação nutricional e umidade na biorremediação de solo contaminado com óleo cru. XIII J.I.C., CETEM, 1996.
- [46] KOENNIGSBERG, S.S. & WILLETT, A. Accelerated bioremediation with oxygen release compound advanced: evolution of time-release electron acceptors. P. Int. In-situ and On-site Bioremediation. Battelle Press, 2005.
- [47] MAILA, M.P. & CLOETE, T.E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants-perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. Int. Biodeter. Biodegr., 55:1-8, 2005.
- [48] MARGESIN, R. & SCHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. Appl. Microbiol. Biot., 56:650-663, 2001.
- [49] MARÍN, J.A.; MORENO, J.L.; HERNÁNDEZ, T. & GARCÍA, C. Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. Biodegradation, 17:251-261, 2006.
- [50] MORGAN, R. & WATKINSON, R.J. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil treatment. CRC Crit. Rev. Biotechnol., 8:305-333, 1989.
- [51] NAKAGAWA, L.E. & ANDRÉA, M.M. Efeito de alterações nas características do solo sobre a degradação de hexaclorobenzeno. Rev. Bras. Ciên. Solo, 30:575-582, 2006.
- [52] NANO, G.; BORRONI, A. & ROTA, R. Combined slurry and solid phase bioremediations of diesel contaminated soil. J. Hazard. Mater., B100:79-94, 2003.
- [53] NIOSH: NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. NIOSH Carcinogen List, 2006. Disponível em: <http://0-www.cdc.gov.mill1.sjlibrary.org/niosh/homepage.html>. Acesso em 17 mar. 2008.
- [54] NRC: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. In Situ Bioremediation: When Does It Work? Washington, DC, National Academy Press, 1993.
- [55] OU, Z. Separate and combined environmental behaviour of surfactants and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Technische Universität Munchen, Institut für Chemie, Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik, 2000. 272f. (Tese de Doutorado).
- [56] PERALTA-ZAMORA, P. & TIBURTIUS, E.R.L. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. Quím. Nova, 27:441-446, 2004.
- [57] RAHMAN, K.S.M.; BANAT, I.M. & THAHIRA, J. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. Bioresour. Technol., 81:25-32, 2002.
- [58] REED, T.A. Bioremediation of total petroleum hydrocarbons at a DOD site in Tracy, California. P. Int. In-situ and On-site Bioremediation. Battelle Press, 2004.
- [59] ROBB, J. & MOYER, E. Natural attenuation of benzene and MTBE at four midwestern retail gasoline marketing outlets. Contam. Soil Sed. Water, Spring:67-71, 2001.
- [60] SÁNCHEZ, O.; FERRERA, I.; VIGUÉS, N.; OTEYZA, T.G.; GRIMALT, J.O. & MAS, J. Presence of opportunistic oil-degrading microorganisms operating at the initial steps of oil extraction and handling. Int. Microbiol., 9:119-124, 2006.
- [61] SAUL, D.J.; AISLABIE, J.; BROWN, C.E.; HARRIS, L. & FOGHT, J.M. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. FEMS Microbiol. Ecol., 53:141-155, 2005.
- [62] SCHWARZENBACH, R.P.; GSCHWEND, P.M. & IMBODEN, D.M. Environmental Organic Chemistry. New York, John Wiley, 1993. p.682.
- [63] SHUHONG, Y.; LEICHANG, H.; LI, Y.O.; MING, D.; YINGYING, H. & DEWEEN, D. Investigation on bioremediation of oil-polluted wetland at Liaodong Bay in northeast China. Appl. Microbiol. Biot., 71:543-548, 2006.
- [64] SILVA, E.; FIALHO, A.M.; SA-CORREIA, I.; BURNS, R.G. & SHAW, L.J. Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine. Environ. Sci. Technol., 38:632-637, 2004.
- [65] SIMS, J.L.; SUFLITA, J.M. & RUSSELL, H.H. Ground water issue: In situ bioremediation of contaminated ground water, EPA/540/S-92/003, U.S. Environmental Protection Agency Office of Solid Waste and Emergency Response, 1992. 11p.
- [66] TATE, R.L. Soil Microbiology. New York, John Wiley, 1995. p.107.
- [67] TOP, E.M. & SPRINGAEL, D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. Curr. Opin. Biotechnol., 14:262-269, 2003.
- [68] TROQUEST, J.; LARROCHE, C. & DUSSAP, C.G. Evidence for the occurrence of an oxygen limitation during soil bioremediation by solid-state fermentation. Biochem. Eng. J., 13:103-112, 2003.
- [69] TSAO, C.W.; SONG, H.G. & BARTHA, R. Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil. Appl. Environ. Microbiol., 64:4924-4929, 1998.
- [70] USAEC: U.S. ARMY ENVIRONMENTAL CENTER. Biopiles of POL (petroleum, oils, and lubricants) Contaminated Soils. Restoration Technology, 2003a. Disponível em: <http://aec.army.mil/usaec/>. Acesso em 14 mar. 2008.
- [71] USAEC: U.S. ARMY ENVIRONMENTAL CENTER. Intrinsic Remediation of POL (petroleum, oils, and lubricants) Contaminated Sites. Restoration Technology, 2003b. Disponível em: <http://aec.army.mil/usaec/>. Acesso em 15 mar. 2008.
- [72] VAN DER HOEK, J.P.; URLINGS, L.G.C.M. & GROBBEN, C.M. Biological removal of polycyclic aromatic hydrocarbons, benzene, toluene, ethylbenzene, xylene and phenolic compounds from heavily contaminated ground water and soil. Environ. Technol. Lett., 10:185-194, 1989.
- [73] VIDALI, M. Bioremediation. An overview. Pure Appl. Chem., 73:1163-1172, 2001.
- [74] VROM. Intervention values and target values: soil quality standards. Ministry of Housing, Spatial Planning and Environment. Premises for risk management: annex to the Dutch Environmental Policy Plan. The Hague: Lower House, DBO/07494013, 1994. 19p.
- [75] WATTS, R.J.; HALLER, D.R.; JONES, A.P. & TEEL, A.L. A foundation for the risk-based treatment of gasoline-contaminated soils using modified Fenton's reactions. J. Hazard. Mater., 76:73-89, 2000.
- [76] WYNN, J.L. Monitored natural attenuation with oxygen release material. P. Int. In-situ and On-site Bioremediation. Battelle Press, 2003.