



Ciência Rural

ISSN: 0103-8478

cienciarural@mail.ufsm.br

Universidade Federal de Santa Maria
Brasil

Seminoti Jacques, Rodrigo Josemar; Menezes Bento, Fátima; Antonioli, Zaida Inês; Oliveira
Camargo, Flávio Anastácio de
Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
Ciência Rural, vol. 37, núm. 4, julho-agosto, 2007, p. 1192
Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33137449>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons

Rodrigo Josemar Seminoti Jacques^I Fátima Menezes Bento^{II} Zaida Inês Antonioli^{III}
Flávio Anastácio de Oliveira Camargo^{IV}

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos mutagênicos e carcinogênicos aos humanos e aos animais que são introduzidos no ambiente em grandes quantidades, devido às atividades relacionadas à extração, ao transporte, ao refino, à transformação e à utilização do petróleo e de seus derivados. Apesar disso, a grande maioria dos microrganismos do solo não possui a capacidade de degradá-los, o que resulta na sua acumulação no ambiente e na conseqüente contaminação dos ecossistemas. Uma estratégia para a eliminação dos HAPs do solo é através da biorremediação, na qual os microrganismos que apresentam capacidade de metabolizar estes compostos irão transformá-los em substâncias inertes, CO₂ e água. No entanto, esta biotecnologia pode ser limitada pela falta de microrganismos degradadores dos HAPs no solo, pela presença de condições ambientais desfavoráveis a estes microrganismos ou pela baixa biodisponibilidade dos contaminantes à microbiota degradadora. Para superar estas limitações e promover uma eficiente remoção dos contaminantes do ambiente, várias técnicas de biorremediação foram desenvolvidas, como biorremediação passiva, bioaugmentação, bioestimulação, fitorremediação, landfarming, compostagem e biorreatores. Esta revisão visa a discutir os metabolismos bacteriano e fúngico destes compostos, os principais fatores químicos e físicos que influenciam a sobrevivência e a atividade destes microrganismos degradadores no ambiente e apresentar as técnicas de biorremediação que estão sendo atualmente utilizadas para a remoção dos HAPs no solo.

Palavras-chave: contaminantes orgânicos, microrganismos, bioaugmentação, bioestimulação, landfarming, biorreatores.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are mutagenic and carcinogenic compounds to the humans and animals, released through the environment by anthropogenic activities related to the extraction, transport, refine, transformation and use of the petroleum and its derivatives. Most of the soils microorganisms do not possess the capacity to degrade them, which results in its accumulation in the atmosphere and contamination of the ecosystems. A strategy for PAHs elimination from the soil is through the bioremediation, where microorganisms having capacity to metabolize these compounds will transform them in inert substances, CO₂ and water. However, this biotechnology can be limited by the lack of specific HAP microbial-degraders in soil, by unfavorable environmental conditions to these microorganisms or by the low bioavailability of those contaminants to the microorganisms. To overcome these limitations and to promote an efficient removal of the pollutants to the atmosphere, several bioremediation techniques were developed as passive bioremediation, bioaugmentation, biostimulation, phytoremediation, landfarming, composting and bioreactors. This revision aims at discussing microbial metabolism of PAHs, present the main chemical and physical factors that influence the survival and the activity of these microorganisms and to show the bioremediation techniques that are being used now for the PAHs removal in soil.

Key words: organic contaminants, microorganisms, bioaugmentation, biostimulation, landfarming, bioreactors.

^ICentro de Ciências Rurais, Universidade Federal do Pampa/Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), São Gabriel, RS, Brasil.

^{II}Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^{III}Departamento de Solos, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{IV}Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. Av. Bento Gonçalves, 7712, CP 15.100, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: fcamargo@ufrgs.br. Autor para correspondência.

INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos químicos constituídos unicamente de átomos de carbono e hidrogênio, arranjados na forma de dois ou mais anéis aromáticos. Devido à possibilidade da fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si, há atualmente mais de 100 HAPs reconhecidos pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Apesar disso, somente 16 HAPs são considerados em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica. São eles: acenaftaleno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)pireno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, naftaleno e pireno (POTIN et al., 2004).

Os HAPs são lipossolúveis na membrana celular e prontamente absorvidos no organismo dos humanos via inalação, exposição oral e dermal, com posterior acúmulo no tecido adiposo (NETTO et al., 2000). O metabolismo dos HAPs gera compostos epóxidos com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele, devido à presença desses compostos (CHAKRADEO et al., 1993).

Os HAPs são gerados naturalmente, e de forma contínua, pela combustão incompleta de substâncias orgânicas, como resíduos vegetais, madeira, matéria orgânica, etc. Porém, a contaminação do solo é um típico efeito da atividade antropogênica, devido à produção industrial dos HAPs (para fabricação de corantes, de fibras sintéticas, de preservantes de madeira, etc.), à produção de carvão vegetal, à extração e gaseificação do carvão mineral e aos processos de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e de seus derivados (BANFORTH & SINGLETON, 2005). Independentemente da atividade industrial, os centros urbanos são os locais com maior potencial de contaminação dos HAPs, devido aos postos de combustíveis, que podem contaminar o ar, o solo, o subsolo e as águas subterrâneas com hidrocarbonetos resultantes dos vazamentos nos tanques subterrâneos de armazenamento de combustíveis. Além disso, motores veiculares, oficinas mecânicas e garagens de automóveis são também fontes geradoras de HAPs nas cidades (LIMA et al., 1998). Assim, devido a estas atividades, o solo recebe anualmente quantidades consideráveis dos HAPs que, em função da complexidade da sua estrutura química,

da sua baixíssima solubilidade em água (como exemplo, a do antraceno é de somente $0,073 \text{ mg L}^{-1}$) e da forte tendência de sorção à fase sólida do solo, tornam-se recalcitrantes e permanecem por longos períodos no ambiente, o que aumenta a possibilidade de exposição de humanos e animais a esses compostos.

No Brasil, somente o Estado de São Paulo possui legislação que trata da contaminação do solo e das águas subterrâneas pelos HAPs. Nesta legislação, o naftaleno apresenta um Valor de Referência de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$, o que significa que, em concentrações iguais ou menores a esta, o solo pode ser considerado “limpo” e possível de ser utilizado para qualquer finalidade. O Valor de Intervenção indica que há riscos para a saúde humana e para o ambiente, sendo que a ultrapassagem desse valor em um volume de solo de 25 m^3 ou em 100 m^3 de água subterrânea impõem a necessidade de implementação na área avaliada de ações voltadas para a sua remediação. Para o naftaleno, o Valor de Intervenção é de 15 mg kg^{-1} em solos agrícolas, de 60 mg kg^{-1} em solos residenciais e de 90 mg kg^{-1} em solos industriais. Na água subterrânea, o valor de intervenção para este HAP é de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (CETESB, 2005). Em termos mundiais, a legislação ambiental existente sobre HAPs está principalmente nos Estados Unidos, sob competência da Agência Americana de Proteção Ambiental (USEPA), e na União Européia, através da Comissão das Comunidades Europeias e da Lista Holandesa de Valores de Qualidade do Solo e da Água Subterrânea, a qual utilizada por alguns órgãos ambientais brasileiros.

Uma estratégia para eliminação dos HAPs dos solos contaminados é através da biorremediação, que é a utilização de processo ou atividade biológica para transformar os contaminantes em substâncias inertes (HOLLINGER et al., 1997). Esta biotecnologia vem sendo utilizada há vários anos em outros países e, em certos casos, apresenta menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas (como incineração e lavagem do solo), sendo atualmente utilizada em escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas contaminadas (BANFORTH & SINGLETON, 2005).

Por outro lado, a degradação dos HAPs no solo pode ser limitada pela incapacidade dos microrganismos autóctones em metabolizar eficientemente esses compostos, pela falta de nutrientes à microbiota degradadora ou pela baixa biodisponibilidade dos HAPs aos microrganismos degradadores, devido à sorção à fase sólida mineral e orgânica do solo (JOHNSON et al., 2005). Para superar estas limitações e promover uma eficiente remoção dos

contaminantes do ambiente, podem-se utilizar técnicas de biorremediação *in situ*, como atenuação natural, bioaumentação, bioestimulação, fitorremediação e “landfarming”, ou técnicas de biorremediação *ex situ*, como compostagem e biorreatores. Esta revisão visa a discutir aspectos relacionados ao metabolismo microbiano da degradação dos HAPs, elencar os principais fatores químicos e físicos que influenciam a sobrevivência e a atividade destes microrganismos no ambiente e apresentar as técnicas de biorremediação que estão sendo atualmente utilizadas para a remoção dos HAPs no solo.

Microrganismos degradadores de HAPs

Para que um microrganismo utilize estes compostos como fonte de C e energia para o seu crescimento, é necessário que possua as várias enzimas que transformam as complexas moléculas dos HAPs em intermediários comuns das suas rotas catabólicas. Várias vias metabólicas de degradação dos HAPs já foram identificadas em diferentes microrganismos, porém as mais estudadas são as do metabolismo aeróbico realizado pelas bactérias, pelos fungos lignolíticos e pelos fungos não-lignolíticos. No metabolismo bacteriano, a oxigenação inicial dos HAPs é realizada por uma enzima intracelular dioxigenase, que tem a função de reconhecer o HAP e adicionar dois átomos de oxigênio, quebrando a estabilidade devido à ressonância do anel aromático. Após sucessivas oxidações, o último anel aromático é transformado em um dos intermediários centrais da via de degradação dos HAPs, que pode ser o catecol, o protocatecol ou o gentisato. Até aqui atuaram as enzimas denominadas de periféricas, que têm a função de reconhecer as moléculas dos HAPs e convertê-las nestes intermediários centrais. A partir de então, atuam as denominadas enzimas de fissão, que converterão os intermediários centrais em compostos que possam ser utilizados nas vias comuns de geração de carbono e energia da bactéria. As enzimas de fissão podem ser divididas em dois grupos, conforme o local da clivagem no intermediário central: as enzimas intradiol abrem o anel aromático por via orto, originando o cis-muconato, que, por passos sucessivos, será convertido em succinato e acetil-coenzima; e as enzimas extradiol fazem a abertura do anel aromático por via meta, originando o semialdeído 2-hidroxi-mucônico, que, por passos sucessivos, será transformado em ácido pirúvico e acetaldeído (BAMFORTH & SINGLETON, 2005).

Os fungos também podem metabolizar os HAPs. São duas as principais vias descritas na literatura: a primeira está relacionada aos fungos não-lignolíticos e a segunda aos fungos lignolíticos. O

metabolismo dos HAPs do *Cunninghamella elegans* é bastante estudado entre os fungos não-lignolíticos. Assim como em seres humanos, o citocromo P450 realiza a monoxigenação inicial do fenantreno em óxidos arenos (epóxidos), que, através das enzimas epóxido hidrolases, são transformados em trans-diidrodióis, ou um dos anéis pode ser rearranjado não-enzimaticamente a fenol e ser conjugado, originando compostos como o-glicosídeos e o-glicoronídeos. Os trans-diidrodióis são transformados por desidratação em fenantróis, que podem então ser convertidos em 9-fenantril-beta-D-glicopiranosídeo, que se acredita ser um dos produtos finais da via de degradação dos fungos não-lignolíticos (THE UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2005).

A lignina contém uma variedade de estruturas aromáticas, sendo que os fungos lignolíticos oxidam este polímero extracelularmente pela ação de lignina peroxidases, peroxidases dependentes de manganês e lacases. Estas são enzimas não-específicas, que podem oxidar HAPs (JOHNSEN et al., 2005). O *Pleurotus ostreatus* é um fungo lignolítico que tem o metabolismo dos HAPs bem estudado. Ele oxida o fenantreno transformando-o em 9,10-fenantreno-quinona e, por clivagem deste anel, em 2,2'-difenoato. A partir deste metabólito, pode ser formado 2,2'-bifenildimetanol ou CO₂, este último por uma via bioquímica ainda não elucidada (THE UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2005).

Devido ao grande número de enzimas envolvidas na degradação destes compostos, a maioria dos microrganismos do solo não possui a capacidade de degradar os HAPs, justificando a necessidade de se isolar e selecionar microrganismos degradadores, visando a sua utilização na biorremediação de solos contaminados (ALEXANDER, 1999). Desde a década de 1950, vêm sendo isoladas bactérias degradadoras destes compostos, pertencentes principalmente aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Gordonia*, entre outros (MUTNURI et al., 2005; JACQUES et al., 2005a; JACQUES et al., 2005b; JACQUES et al., 2007) e vários fungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, *Chrysosporium*, etc (CERNIGLIA, 1997; JACQUES et al., 2005a). No entanto, nos últimos anos, tem sido dada atenção à obtenção de consórcios microbianos, que, comparativamente às culturas puras, têm-se mostrado mais efetivos na degradação destes compostos. Estes consórcios apresentam maior capacidade de utilização de um grande número de HAPs

como fonte de C e, principalmente, podem mineralizar completamente estes compostos, devido à complementaridade metabólica entre os membros do consórcio, em que os HAPs seriam transformados em CO₂ e água através da ação de mais de um microrganismo. RICHARD & VOGEL (1999), estudando um consórcio bacteriano degradador de óleo diesel no solo, verificaram que, dos sete membros deste consórcio, quatro não utilizavam diretamente o óleo como fonte de carbono e energia; no entanto, a presença destes aumentava a produção de CO₂ pelo consumo de intermediários produzidos pelos demais membros.

Fatores ambientais que influenciam a biorremediação de HAPs no solo

A biorremediação também pode ser limitada se as condições do solo não forem favoráveis à sobrevivência e à atividade dos microrganismos degradadores. A umidade do solo é considerada por HAIDER (1999) o fator ambiental mais crítico na biodegradação, pois uma alta atividade microbiana somente ocorrerá se houver adequada disponibilidade de água aos microrganismos. Além disso, o teor de água no solo tem relação inversa com a disponibilidade de oxigênio e, conseqüentemente, com a atividade dos microrganismos aeróbios, que são os principais responsáveis pela degradação dos HAPs.

A temperatura afeta a atividade metabólica, o consumo de substrato pelos microrganismos e, por conseqüência, a biodegradação dos HAPs. Apesar de a biodegradação ocorrer numa ampla faixa de temperatura, as maiores taxas ocorrem entre 25 e 35°C, sendo que, em temperaturas acima ou abaixo destas, há prejuízos para este processo (HAIDER, 1999). O pH do solo afeta diretamente a atividade dos microrganismos através dos efeitos dos íons H⁺ na permeabilidade celular e na atividade enzimática, assim como, indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade do alumínio e demais metais pesados, que podem ser tóxicos aos microrganismos.

Em ambientes naturais, o nutriente que normalmente limita o crescimento microbiano é o C, sendo que os nutrientes inorgânicos estão presentes em quantidades que normalmente excedem as demandas das comunidades microbianas (ALEXANDER, 1999). No entanto, a presença de elevadas concentrações de HAPs no solo com potencial para serem utilizados como substrato para o crescimento dos microrganismos pode fazer com que outros nutrientes, que não o C, tornem-se limitantes. A relação C:N:P de 100:10:1 no solo a ser biorremediado tem sido normalmente recomendada (CHENG & MULLA, 1999). Entretanto, as pesquisas

que avaliaram os efeitos da adição de N e P ao solo demonstraram resultados muito conflitantes, o que provavelmente se deve às especificidades de cada ambiente, no que se refere a teores de nutrientes no solo, tipo de contaminante e população microbiana envolvida (LEYS et al., 2005).

Outros nutrientes que poderiam influenciar a degradação dos HAPs no solo são o ferro e o enxofre, porque desempenham funções celulares que estão intimamente relacionadas ao metabolismo dos HAPs, como a participação na estrutura das enzimas que realizam a degradação destes compostos nas células microbianas. Após revisão sobre os efeitos destes fatores ambientais na biodegradação dos HAPs (JACQUES et al. 2005a), pode-se constatar que a grande maioria dos pesquisadores recomenda que a adição de nutrientes deve ser realizada somente após criteriosa avaliação, de forma a evitarem-se adições desnecessárias, que resultam em aumentos dos custos e em prejuízos ao processo de biorremediação.

Em vista da baixa solubilidade em água e da forte tendência de sorção dos HAPs à fase sólida do solo, a degradação desses compostos pode ser limitada devido a sua baixa biodisponibilidade aos microrganismos degradadores (JOHNSON et al., 2005). O termo sorção é definido como o processo em que compostos químicos tornam-se associados à fase sólida. No solo, este processo ocorre porque os HAPs são apolares e sua permanência na fase líquida demanda que as moléculas de água rompam as pontes de H que estão estabelecidas com outras moléculas de água. Como esta reorganização tem um custo energético muito elevado, o composto apolar é forçado a deslocar-se na direção dos locais de maior hidrofobicidade, representados no solo pela matéria orgânica (MO) e pela superfície dos minerais (SCHWARZENBACH et al., 1993).

A MO é a principal matriz hidrofóbica do solo, porque é constituída principalmente de átomos de C e de H, fazendo com que as pontes de H estejam limitadas a determinados locais de sua estrutura. Além disso, por se encontrarem em um meio hidrofílico, que é o solo, as moléculas de MO tendem a expor suas superfícies com carga para o exterior e formar espaços hidrofóbicos em seu interior, nos quais os compostos apolares podem penetrar (SCHWARZENBACH et al., 1993). O conteúdo de MO é a característica do solo que mais influencia a sorção dos HAPs, sendo que vários autores demonstraram relações lineares positivas entre o conteúdo de C orgânico do solo e a capacidade de sorção de HAPs (CARMICHAEL & PFAENDER, 1997; NAM et al., 1998; LUEKING et al., 2000).

As superfícies do tipo metal-OH presentes nos minerais sem cargas não formam pontes de H com a água e são hidrofóbicas, sendo que nelas pode ocorrer a sorção de compostos apolares (LAIRD & SAWHNEY, 2002). SAADA et al. (1995) demonstraram que 75% da superfície da caulinita é hidrofóbica, o que resultou em sorção de hidrocarbonetos duas vezes maior que a illita, que apresenta 60% da sua superfície hidrofóbica. Este tipo de sorção assume maior importância nos solos com conteúdos de MO iguais ou menores a 4g kg^{-1} , onde as superfícies hidrofóbicas estão pouco ou nada cobertas pela MO (SCHWARZENBACH et al., 1993).

Em vista de que a composição da fase sólida do solo determina a sua capacidade de sorção de HAPs, é de se esperar que solos com diferentes conteúdos de MO e composições mineralógicas apresentem diferentes capacidades de sorção e de biodisponibilidade desses compostos aos microrganismos degradadores do solo. Neste contexto, NAM et al. (1998) avaliaram a mineralização do antraceno em seis solos com diferentes conteúdos de C orgânico, demonstrando que houve maior sorção deste HAP nos solos com conteúdo de carbono orgânico maior que 20g kg^{-1} e, conseqüentemente, menor mineralização. CARMICHAEL & PFAENDER (1997) observaram que, no solo com maior conteúdo de C orgânico, a desorção do fenantreno foi menor, o que resultou em menor taxa de mineralização deste composto. Estes resultados indicam que a sorção dos HAPs no solo influencia a biodisponibilidade destes compostos à microbiota degradadora e, conseqüentemente, a eficiência da biorremediação.

Biorremediação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no solo

As estratégias usadas para a biorremediação dos HAPs podem ser divididas entre as técnicas *in situ*, em que não há necessidade de remoção do solo, sendo a biorremediação realizada no próprio local contaminado, e as técnicas *ex situ*, em que há necessidade de remoção do solo, sendo a biorremediação realizada em outro local (BOOPATHY, 2000). A remoção pode ser necessária quando há possibilidade de os poluentes contaminarem pessoas e o ambiente próximo do solo a ser biorremediado, ou quando a presença de altas concentrações de contaminantes demanda a utilização de técnicas como compostagem, biorreatores, etc.

Uma das técnicas *in situ* é a biorremediação passiva ou intrínseca, também denominada atenuação natural, na qual o contaminante permanece no local e, através de processos naturais como biodegradação,

volatilização, diluição e sorção, ocorre a descontaminação do ambiente (MULLIGAN & YONG, 2004). Por depender exclusivamente destes processos naturais, a biorremediação passiva pode ser muito lenta, exigindo o uso conjunto de outras técnicas e obrigatoriamente, o monitoramento do local por longos períodos de tempo, visando à proteção da saúde do homem e do ambiente. BENTO et al. (2005) conduziram um experimento por 84 dias, no qual a biorremediação passiva reduziu em 47% a concentração de hidrocarbonetos no solo (12.250g kg^{-1}). Já a contaminação de querosene tem sido rapidamente eliminada pela biorremediação passiva devido à alta volatilidade deste combustível (DROR et al., 2001).

A baixa taxa de degradação de um contaminante no solo pode ser resultado do número reduzido ou inexistente de microrganismos com habilidade de degradação do composto (HUESEMANN et al., 2002). Isto é particularmente importante quando o solo recebe um xenobiótico e não há populações microbianas capazes de degradar eficientemente este composto. Nestes casos, a bioaugmentação, que é a inoculação de um local contaminado com microrganismos com alto potencial de degradação dos contaminantes, torna-se uma prática recomendada (EDGEHILL et al., 1999). Embora o sucesso desta técnica dependa de certas condições já discutidas nesta revisão, a inoculação de um consórcio microbiano composto por seis bactérias e um fungo no solo contaminado com antraceno, fenantreno e pireno resultou em um aumento de aproximadamente 10 vezes na mineralização destes HAPs em relação à microbiota nativa do solo (JACQUES et al., 2005a).

Outra técnica *in situ* que pode ser utilizada é a bioestimulação, em que nutrientes orgânicos e inorgânicos podem ser adicionados ao solo visando a estimular a atividade dos microrganismos degradadores. A adição de 1% de glicose ao solo, contaminado com 8.800mg kg^{-1} de C orgânico originado de um resíduo petroquímico, não resultou em aumento da mineralização, após 272 dias de incubação (MIELNICZUK, 1991). ATAGANA et al. (2003) observaram durante 6 semanas que a degradação de hidrocarbonetos foi muito baixa na relação C:N natural do solo de 130:0,08. Nas relações C:N de 25:1, 20:1, 15:1, 10:1 e 5:1, e C:N:P de 10:1:2, as porcentagens de degradações foram próximas, com valor médio de 55%. MILLS & FRANKENBERGER (1994) obtiveram aumentos de aproximadamente 50% na mineralização do óleo diesel com a adição de 100 a 500mg kg^{-1} de fósforo no solo. Porém, BENTO et al. (2005) não observaram diferenças entre a biorremediação passiva e a bioestimulação com N e P na remoção de

hidrocarbonetos leves e pesados do solo. JACQUES et al. (2005a) adicionaram doses crescentes de nitrogênio, fósforo, enxofre e ferro a um solo arenoso com fertilidade natural muito baixa e contaminado com 500mg kg⁻¹ de antraceno, não observando aumentos da mineralização deste HAP, havendo inclusive a redução da mineralização quando da adição ao solo de doses de nitrogênio superiores a 50kg ha⁻¹. Estes resultados indicam que a bioestimulação deve ser precedida de criteriosa avaliação, visando a determinar os nutrientes e as doses que necessitam ser adicionados ao solo.

A compostagem é uma técnica *ex situ* que pode ser utilizada para o tratamento do solo contaminado com HAPs, sendo este normalmente removido do local de origem e colocado na forma de pilhas, num local que permita o controle da lixiviação e do escoamento superficial dos líquidos originados dessas pilhas. Neste solo, será desencadeado um processo em que os microrganismos aeróbios irão degradar os contaminantes orgânicos, transformando-os em material orgânico estabilizado, CO₂ e água. A eficiência da compostagem para biorremediação de solos contaminados com HAPs foi demonstrada por AHTIAINEN et al. (2002), que avaliaram em um experimento de larga escala a remoção de 10.960mg kg⁻¹ de uma complexa mistura de HAPs num solo de uma área de tratamento de madeira. Para isso, pilhas com 100m³ de solo foram revolvidas mecanicamente durante 5 meses, sendo de 96% a remoção dos HAPs com 2 e 3 anéis, de 55% a remoção dos HAPs de 4 anéis e de 58% a remoção dos HAPs de 5 e 6 anéis aromáticos.

A biorremediação de solos contaminados com altas concentrações de HAPs pode ser realizada por uma técnica *ex situ* que se utiliza de biorreatores. Existe uma infinidade de tipos e configurações de biorreatores que ilustrativamente podem ser comparados a tanques aéreos fechados. O solo contaminado é misturado com água, de modo a formar uma suspensão com 10 a 40% de sólidos, que é mecanicamente aerada através de rotações. A formação desta suspensão no interior do biorreator possibilita o aumento da disponibilidade dos contaminantes aos microrganismos degradadores e a eliminação da heterogeneidade da distribuição dos contaminantes no solo, duas grandes limitações da biorremediação *in situ* (MACLEOD & DAUGULIS, 2005). Além disto, no interior do biorreator, as condições ambientais de pH, a disponibilidade de nutrientes, a aeração e a temperatura são otimizadas para o máximo crescimento microbiano, sendo possível também a inoculação de microrganismos comprovadamente degradadores dos contaminantes. Após a concentração dos

contaminantes ter sido reduzida aos níveis desejados, a suspensão é desidratada e a água pode ser reutilizada no biorreator.

Em geral, as taxas e a extensão da biodegradação nesta técnica são muito altas, em vista do controle sobre fatores abióticos, e até bióticos, no interior do biorreator, o que resulta no tratamento do solo num curto período de tempo. Concomitantemente a isso, algumas desvantagens estão relacionadas a esta técnica, como a limitação da quantidade de solo tratado devido ao tamanho dos biorreatores e a necessidade, em alguns casos, de pré-tratamento do solo para a remoção de compostos tóxicos aos microrganismos (como metais pesados) e para a redução do tamanho dos agregados do solo. Porém, o fator que normalmente limita a utilização desta técnica é o elevado custo de remediação do solo, em vista da alta tecnologia utilizada nos biorreatores. Assim, o uso dessa técnica restringe-se aos casos em que o solo está contaminado com altas concentrações do poluente e há necessidade de se realizar a biorremediação em curto período de tempo. Sob essas exigências, a utilização de outras técnicas de biorremediação provavelmente não traria resultados satisfatórios (DOELMAN & BREEDVELK, 1999).

A biorremediação de um solo contaminado com uma concentração de 1.700mg kg⁻¹ de uma complexa mistura de HAPs, resultante de atividade industrial entre os anos de 1908 e 1959, era dificultada pela baixa biodisponibilidade destes contaminantes aos microrganismos degradadores, em vista do longo período de tempo em que os HAPs permaneceram no solo. Para superar esta limitação, SAPONARO et al. (2002) utilizaram um biorreator, onde adicionaram somente nutrientes inorgânicos à suspensão formada por 10% de solo contaminado e 90% de água. Após 34 dias de operação do biorreator, com aeração constante, a concentração de HAPs no solo foi reduzida em 75%, em média, sendo que a maioria desta redução ocorreu nos primeiros 10 dias, demonstrando que a utilização de biorreatores é uma ferramenta estratégica para obtenção de resultados satisfatórios, quando há condições ambientais limitantes à utilização da demais técnicas de biorremediação.

A fitorremediação é uma técnica emergente, que utiliza plantas para remediar o solo contaminado por metais pesados, compostos orgânicos e radionuclídeos. A maioria das pesquisas em fitorremediação estuda a utilização de plantas hiperacumuladoras, que têm a capacidade de estocar grandes quantidades de metais pesados sem um uso aparente em seu metabolismo (WEIS & WEIS, 2004). Porém, a observação de que os solos vegetados mostraram maiores taxas de desaparecimento de

compostos orgânicos que os solos não-vegetados resultou no incremento das pesquisas visando à biorremediação de solos contaminados com agrotóxicos, HAPs, solventes orgânicos, combustíveis, etc. (ALKORTA & GARBISU, 2001).

A fitorremediação pode ser dividida em 5 tipos principais, que são: a) rizofiltração, que é uma técnica de tratamento de água em que os contaminantes são removidos e retidos no tecido vegetal; b) fitoextração, em que os contaminantes são removidos do solo e retidos no tecido vegetal; c) fitotransformação, uma técnica que pode ser aplicada ao tratamento da água e do solo, na qual ocorre a degradação dos contaminantes através do metabolismo da planta; d) fitoestimulação, em que ocorre a estimulação da atividade dos microrganismos degradadores dos contaminantes pela rizosfera da planta; e e) fitoestabilização, quando as plantas são utilizadas para reduzir a migração dos contaminantes no solo (PILON-SMITS, 2005).

Apesar da possibilidade das enzimas das plantas degradarem HAPs e outros poluentes orgânicos (NEWMAN & REYNOLDS, 2004), a comprovação da fitotransformação nos experimentos é dificultada pela forte interação solo-planta-microrganismo, sendo que, até o momento, a fitoestimulação tem apresentado o maior número de pesquisas que comprovam sua eficiência na biorremediação de solos contaminados com estes compostos. JOHNSON et al. (2005) avaliaram o efeito da mistura de *Trifolium repens* + *Lolium multiflorum* na biorremediação de um solo contaminado com 1.017 mg kg^{-1} de uma mistura de 16 HAPs. Após 180 dias, o solo vegetado apresentou uma concentração destes poluentes 19% menor e uma população de microrganismos degradadores 24 vezes maior que o solo não-vegetado. No solo estéril (sem a presença de microrganismos), as plantas não degradaram os HAPs, indicando que o aumento da degradação destes contaminantes no solo vegetado se deveu aos microrganismos, sendo sua população grandemente estimulada pela presença das plantas.

O *landfarming* é uma técnica de biorremediação muito utilizada para o tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos. Os microrganismos heterotróficos da camada superficial do solo são estimulados a degradar os contaminantes ali presentes, transformando-os em substâncias inertes como o material orgânico estabilizado, água e CO_2 . Esta estimulação ocorre através do revolvimento do solo por operações de aração e gradagem (visando a aerar e homogeneizar as camadas com diferentes concentrações de contaminantes), além da adição de corretivos, fertilizantes e, se necessário, de água através

da irrigação. Pode-se ainda bioaumentar o solo com microrganismos de reconhecida capacidade de degradação desses contaminantes e adicionar surfactantes, visando a aumentar a biodisponibilidade dos contaminantes. Esta técnica pode ser realizada *in situ* e visa a descontaminar o solo no local onde este foi contaminado, ou pode ser realizada *ex situ*, se o solo contaminado foi removido para outro local onde o *landfarming* será operado (DOELMAN & BREEDVELK, 1999).

O *landfarming* pode ser considerado também um sistema de tratamento de resíduos. Nesse caso, uma área é destinada exclusivamente para este fim. Os resíduos com alta concentração de carbono orgânico são aplicados periodicamente no solo, visando à degradação de seus constituintes. Quando o monitoramento indicar a redução da concentração dos constituintes do resíduo no solo, deve ser feita nova adição de resíduo (WARD et al., 2003). Se os resíduos tratados apresentarem componentes tóxicos, a operação do *landfarming* deverá ser licenciada pelas agências de proteção ambiental. Além disso, para evitar a contaminação do ambiente, a área deve ser impermeabilizada com uma camada de argila compactada a uma profundidade de 0,6 a 1,0m abaixo da superfície, assim como deve-se conter o escoamento superficial.

As refinarias e indústrias petroquímicas de vários de países, inclusive do Brasil, utilizam o *landfarming* para o tratamento dos seus resíduos sólidos. A escolha deste sistema deveu-se à simplicidade de operação e à alta taxa de aplicação dos resíduos ao solo, que varia de 83 a $252 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, reduzindo dessa forma o custo por unidade de volume de resíduo tratado (SIMS & SIMS, 1999). No entanto, erros na operação do *landfarming* e condições ambientais desfavoráveis à atividade microbiana durante alguns períodos do ano podem reduzir as taxas de degradação. Além disso, sua utilização *in situ* é limitada aos casos de contaminação superficial do solo, sendo que, nos casos de contaminação subsuperficial, faz-se necessário a remoção e o tratamento *ex situ*.

A tabela 1 resume, comparativamente, as técnicas de biorremediação discutidas nesta revisão. Salienta-se que todos os relatos são de trabalhos realizados a campo, visando ao tratamento de grandes quantidades de resíduos ou de grandes volumes de solo. Apesar de as particularidades de cada local dificultarem as comparações, percebe-se que há diferenças significativas na concentração inicial, no tempo e na porcentagem de remoção dos contaminantes. O conhecimento dessas variáveis, assim como do custo econômico, da dependência de condições ambientais, da aceitação pública e dos

Tabela 1 - Aplicações das técnicas de biorremediação para a remoção de hidrocarbonetos no solo, em condições de campo.

Técnica	Contaminante	Concentração inicial (mg kg ⁻¹)	Remoção (%)	Tempo (dias)	Referência
Biorremediação passiva	Petróleo	18.000	56	480	CHAINEAU et al. (2003)
Bioaugmentação	Resíduo petroquímico	69.700	92	360	MISHRA et al. (2001)
Bioestimulação	Resíduo petroquímico	69.700	90	360	MISHRA et al. (2001)
Compostagem	HAPs	10.960	70	150	AHTIAINEN et al. (2002)
Biorreator	Resíduo petroquímico	50.000	99	12	WARD et al. (2003)
Fitorremediação	Pireno	488,7	36,13 ¹ (85,02)	45	LING & GAO (2004)
<i>Landfarming</i>	Hidrocarbonetos	46.000	55	60	MARIN et al. (2005)

¹Remoção dos contaminantes ao final do período de avaliação em relação ao tratamento sem plantas. Entre parênteses, a remoção dos contaminantes em relação ao início do período de avaliação.

impactos ambientais das técnicas é fundamental na escolha e aplicação do processo de biorremediação. Por outro lado, esses dados demonstram que a biorremediação está sendo utilizada em larga escala em outros países, com resultados satisfatórios. Esta biotecnologia apresenta grandes possibilidades de desenvolvimento no Brasil, uma vez que o país apresenta condições climáticas mais favoráveis à biodegradação que os países do hemisfério norte, podendo tornar a biorremediação uma alternativa eficiente para a remoção dos contaminantes do ambiente.

CONCLUSÕES

Em vista da ampla distribuição dos HAPs no ambiente, da possibilidade de ocasionarem problemas à saúde de humanos e animais, e dos limites impostos pela legislação ambiental, sua eliminação do ambiente deve ser buscada, visando à redução da exposição e da absorção pelo organismo dos mamíferos. A biorremediação é uma alternativa para a remoção dos HAPs do solo, na qual os microrganismos degradadores irão transformá-los em substâncias inertes, CO₂ e água. Em vista de a maioria dos microrganismos do solo não possuírem a capacidade de degradar estes compostos, há necessidade de se isolar e selecionar os microrganismos degradadores. Nesta seleção, além da capacidade de degradação *in vitro*, deve ser considerada a capacidade de colonizar e degradar o contaminante no solo. Fatores ambientais

como disponibilidade de água e oxigênio, temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes inorgânicos influenciam a sobrevivência e a atividade dos microrganismos degradadores, sendo necessário manejá-los de forma a possibilitar condições adequadas para a manutenção da população inoculada ao solo. A baixa biodisponibilidade de HAPs aos microrganismos degradadores, devido à sorção à fase sólida orgânica ou mineral do solo, também pode limitar a biorremediação. Visando a superar todas estas limitações bióticas e abióticas que influenciam a biorremediação dos solos contaminados com HAPs, foram desenvolvidas várias técnicas de biorremediação, entre elas a biorremediação passiva, a bioaugmentação, a bioestimulação, a fitorremediação, o *landfarming*, a compostagem e o uso de biorreatores. Para a obtenção de resultados satisfatórios, é de fundamental importância o conhecimento dos princípios e das aplicações dessas técnicas, de forma a possibilitar a seleção e a utilização correta, de acordo com as condições específicas de cada local e de cada contaminante presente. Além disso, variáveis como investimento inicial e de operação, volume de solo tratado, tempo de remediação, dependência de condições ambientais, aceitação pública e impacto ambiental, entre outros, também devem ser consideradas para que o processo de biorremediação seja eficiente, de baixo impacto ambiental e economicamente viável. Esta biotecnologia já teve sua eficiência comprovada em outros países e apresenta grandes possibilidades de desenvolvimento no Brasil.

REFERÊNCIAS

- AHTIAINEN, J. et al. Microbial toxicity tests and chemical analysis as monitoring parameters at composting of creosote-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v.53, n.3, p.323-329, 2002.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2.ed. New York: Academic, 1999. 453p.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C. Phytoremediation of organic contaminants in soils. **Bioresource Technology**, Oxon, v.79, n.3, p.273-276, 2001.
- ATAGANA, H.I. et al. Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. **Biodegradation**, Dordrecht, v.14, n.4, p.297-307, 2003.
- BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v.80, n.7, p.723-736, 2005.
- BENTO, F.M. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, Oxon, v.96, n.9, p.1049-1055, 2005.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, Chicago, v.74, n.1, p.63-67, 2000.
- CARMICHAEL, L.M.; PFAENDER, F.K. The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. **Biodegradation**, Dordrecht, v.8, n.1, p.1-13, 1997.
- CERNIGLIA, C.E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.19, n.5-6, p.324-333, 1997.
- CETESB. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**. Acesso em 20 jul. 2005. Online. Disponível na Internet http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp.
- CHAIINEAU, C.H. et al. Bioremediation of crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.144, n.1, p.419-440, 2003.
- CHAKRADEO, P.P. et al. Effect of benzo(a)pireno and methyl(acetoxymethyl)nitrosamine on thymidine uptake and induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human fetal esophageal cells in culture. **Cellular Biology International**, Amsterdam, v.17, n.7, p.671-676, 1993.
- CHENG, H.H.; MULLA, D.J. The soil environment. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.1-13.
- DOELMAN, P.; BREEDVELK, G. In situ versus on site practices. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.539-558.
- DROR, I. et al. Temporal changes in kerosene content and composition in field soil as a result of leaching. **Journal of Contamination Hidrology**, Amsterdam, v.48, n.3-4, p.305-323, 2001.
- EDGEHILL, R.U. et al. Bioremediation by inoculation with microorganisms. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.290-314.
- HAIDER, K. Microbe-soil-organic contaminant interactions. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.33-51.
- HOLLIGER, C. et al. Contaminated environmental in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.20, n.4, p.517-523, 1997.
- HUESEMANN, M.H. et al. Microbial factors rather than bioavailability limit the rate and extent of PAH biodegradation in aged crude oil contaminated model soils. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.6, n.4, p.321-336, 2002.
- JACQUES, R.J.S. **Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo**. 2005a. 170f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- JACQUES, R.J.S. et al. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge landfarming. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.56, n.3, p.150-156, 2005b.
- JACQUES, R.J.S. et al. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.11, n.1, p.1-11, 2007.
- JOHNSEN, A.R. et al. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, Oxford, v.133, n.1, p.71-84, 2005.
- JOHNSON, D.L. et al. Soil microbial response during the phytoremediation of PAH contaminated soil. **Soil, Biology and Biochemistry**, Oxford, v.37, n.12, p.2334-2336, 2005.
- LAIRD, D.A.; SAWHNEY, B.L. Reactions of pesticides with soil minerals. In: DIXON, J.B. et al. (Ed). **Soil mineralogy with environmental applications**. Madison: SSSA, 2002. p.766-794.
- LEYS, N.M. et al. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.66, n.6, p.726-736, 2005.
- LIMA, C.B.S. et al. Efluentes: a qualidade da água comprometida. In: MENEGAT, R. et al. (Ed). **Atlas ambiental de Porto Alegre**. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 1998. p.157-158.
- LING, W.; GAO, Y. Promoted dissipation of phenanthrene and pyrene in soils by amaranth (*Amaranthus tricolor* L.).

Environmental Geology, New York, v.46, n.3, p.553–560, 2004.

LUEKING, A.D. et al. Relationship of soil organic matter characteristics to organic contaminant sequestration and bioavailability. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.29, n.1, p.317–323, 2000.

MACLEOD, C.T.; DAUGULIS A.J. Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a hydrophobic *Mycobacteriu*. **Process Biochemistry**, Oxon, v.40, n.5, p.1799–1805, 2005.

MARIN, J.A. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. **Environmental Research**, San Diego, v.98, n.2, p.185–195, 2005.

MIELNICZUK, C. **A população microbiana e a degradação de resíduo petroquímico no solo**. 1991. 134f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MILLS, S.A.; FRANKENBERG, W.T. Evaluation of phosphorus sources promoting bioremediation of diesel fuel soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.53, n.2, p.280–284, 1994.

MISHRA, S. et al. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.4, p.1675–1681, 2001.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N. Natural attenuation of contaminated soil. **Environmental International**, Oxford, v.30, n.4, p.587–601, 2004.

MUTNURI, S. et al. Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.67, n.4, p.569–576, 2005.

NAM, K. et al. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.32, n.23, p.3785–3788, 1998.

NETTO, A.D.P. et al. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and their nitrated derivatives (NHPAS): a review of methodology. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.6, p.765–773, 2000.

NEWMAN, L.A.; REYNOLDS, C.M. Phytodegradation of organic compounds. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, n.1, p.225–230, 2004.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.56, p.15–39, 2005.

POTIN, O. et al. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Oxford, v.54, n.1, p.45–52, 2004.

RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v.44, n.2–3, p.93–100, 1999.

SAADA, A. et al. Comparison of the hydrophilicity/hydrophobicity of illites and kaolinites. **Journal of Colloid and Interface Science**, Providence, v.174, n.1, p.185–190, 1995.

SAPONARO, S. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) slurry phase bioremediation of a manufacturing gas plant (MGP) site aged soil. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v.135, n.1–4, p.219–236, 2002.

SCHWARZENBACH, R.P. **Environmental organic chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 681p.

SIMS, R.C.; SIMS, J.L. Landfarming of petroleum contaminated soils. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.767–782.

THE UNIVERSITY OF MINNESOTA, Minnesota, 2005. **Biocatalysis/Biodegradation Database**: Microbial biocatalytic reactions and biodegradation pathways primarily for xenobiotic, chemical compounds. Acesso em 25 mai. 2005. Online. Disponível na Internet http://umbbd.ahc.umn.edu/pha2/pha2_image_map.html.

WARD, O. et al. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.30, n.5, p.260–270. 2003.

WEIS, J.S.; WEIS, P. Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. **Environment International**, Oxford, v.30, n.5, p.685–700, 2004.