

ESCOLA POLITÉCNICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CURSO MBA EM GESTÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS,
DESENVOLVIMENTO URBANO E REVITALIZAÇÃO DE BROWNFIELDS

Marco Antonio Antunes Franco de Andrade

**BIOPILHAS PARA BIORREMEDIAÇÃO: UMA ANÁLISE CRÍTICA EM
REGIÕES DE CLIMA FRIO**

São Paulo

2020



ESCOLA POLITÉCNICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CURSO MBA EM GESTÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS,
DESENVOLVIMENTO URBANO E REVITALIZAÇÃO DE BROWNFIELDS

Marco Antonio Antunes Franco de Andrade

**BIOPILHAS PARA BIORREMEDIAÇÃO: UMA ANÁLISE CRÍTICA EM
REGIÕES DE CLIMA FRIO**

Monografia apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de especialista em Gestão de Áreas Contaminadas, Desenvolvimento Urbano e Revitalização de Brownfields.

Orientador: Prof. Dr. René Peter Schneider
Coorientador: Prof. (a). Dra. Patrícia Guidão Cruz Ruggiero

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-publicação

de Andrade, Marco Antonio

Biopilhas para biorremediação: Uma análise crítica em regiões de clima frio / M. A. de Andrade -- São Paulo, 2020.
45 p.

Monografia (MBA em Gestão de Áreas Contaminadas, Desenvolvimento Urbano e Revitalização de Brownfields.) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Biorremediação 2.Biodegradação 3.Contaminação do solo
4.Hidrocarbonetos 5.Baixa temperatura I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

“Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter, método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar, acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir”.

São Tomás de Aquino

RESUMO

DE ANDRADE, Marco Antonio. Biopilhas para biorremediação: Uma análise crítica em regiões de clima frio. 2020. 45 f. Monografia (MBA em Gestão de Áreas Contaminadas, Desenvolvimento Urbano Sustentável e Revitalização de Brownfields) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A biorremediação tem se mostrado uma abordagem eficaz para o tratamento de solos contaminados, sendo apontada como uma alternativa eficiente, econômica e versátil aos tratamentos físico-químicos. Dentre as diversas técnicas existentes, a biorremediação através de biopilha visa, sobretudo, estimular a atividade microbiana aeróbia no solo por meio da aeração e/ou adição de minerais, nutrientes e umidade. O grande desafio está na utilização de biopilhas em regiões de climas frios, uma vez que estudos demonstram que temperaturas do ar e do solo muito baixas reduzem a atividade bacteriana e retardam a eficiência do processo. O presente trabalho apresenta uma avaliação crítica de sete estudos que tratam da aplicação da técnica de biopilha em regiões de climas frios. Os aspectos analisados incluíram as metodologias aplicadas, técnicas de otimização do tratamento, taxas de remoção e concentração de contaminantes, escala e configuração das biopilhas. Por fim, avaliou-se a eficiência dos sistemas, verificando os efeitos obtidos no aumento e/ou manutenção de temperatura, atividade microbiana e na remoção da contaminação do solo por hidrocarbonetos de petróleo. Da análise dos trabalhos, concluiu-se que bioestimulação, bioaugmentação, aeração e temperatura foram os fatores que influenciaram a biorremediação, e a interação e controle destes parâmetros proporcionou melhores resultados, especialmente em climas frios.

Palavras-chave: Biorremediação, biodegradação, contaminação do solo, hidrocarbonetos, baixa temperatura.

ABSTRACT

DE ANDRADE, Marco Antonio. Biopiles for bioremediation: A critical analysis in cold climate regions. 2020. 45 f. Monografia (MBA em Gestão de Áreas Contaminadas, Desenvolvimento Urbano Sustentável e Revitalização de Brownfields) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Bioremediation is considered an efficient, economical and versatile alternative to physical-chemical technologies for the treatment of contaminated soils. Biopiles have emerged as attractive arrangements for stimulation of aerobic microbial activity in the soil through aeration and / or addition of minerals, nutrients and moisture. The challenge in the use of biopiles in cold climates are the very low air and soil temperatures which reduce bacterial activity and reduce the efficiency of the process. In the present work, several studies about the application of biopiles in cold climates were critically reviewed. The aspects analyzed focused on the methodologies applied, treatment optimization techniques, contaminant removal and concentration rates, scale and configuration of the biopiles. The efficiency of the systems was evaluated verifying the effects that were obtained in the increase and/or maintenance of temperature, microbial activity and the removal of soil contamination by petroleum hydrocarbons. The analysis of the articles concluded that biostimulation, bioaugmentation, aeration and temperature were the factors that influenced bioremediation and the interaction and control of these parameters provided better results, especially in cold climates.

Key words: Bioremediation, biodegradation, soil contamination, hydrocarbons, low temperature.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Técnicas de remediação <i>ex-situ</i> aplicadas à zona não saturada.....	10
Figura 2: Esquema Biopilha.....	14
Figura 3: Distribuição dos contaminantes orgânicos no solo.....	17
Figura 4: Degradação do naftaleno por bactérias aeróbicas.....	20
Figura 5: Taxas de remoção de contaminantes.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físicas de alguns hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.....	16
Tabela 2: Pesquisa bibliográfica inicial	24
Tabela 3: Estudos selecionados na metodologia.....	25
Tabela 4: Análise de Concentrações de Contaminantes.....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 BIOPILHA	13
2.2 CARACTERÍSTICAS DO CONTAMINANTE	15
2.3 CARACTERÍSTICAS DO SOLO	17
2.3.1 pH	17
2.3.2 Textura do solo	17
2.3.3 Umidade.....	18
2.3.4 Nutrientes.....	18
2.3.5 Microrganismos	19
2.3.6 Temperatura.....	21
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	23
4 METODOLOGIA	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 TIPOS DE CONTAMINANTES	26
5.2 ESCALA E CONFIGURAÇÕES DAS BIOPILHAS	26
5.2.1 Experimentos de Campo.....	27
5.2.2 Experimentos em Escala Reduzida.....	28
5.2.3 Experimentos em Laboratório	29
5.3 METODOLOGIA DE AMOSTRAGEM	29
5.4 CONCENTRAÇÃO DE CONTAMINANTES	32
5.5 BIOAUMENTAÇÃO	36
5.6 BIOESTIMULAÇÃO	37
5.7 TÉCNICAS PARA AUMENTO E/OU MANUTENÇÃO DA TEMPERATURA....	38
6 CONCLUSÃO	41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

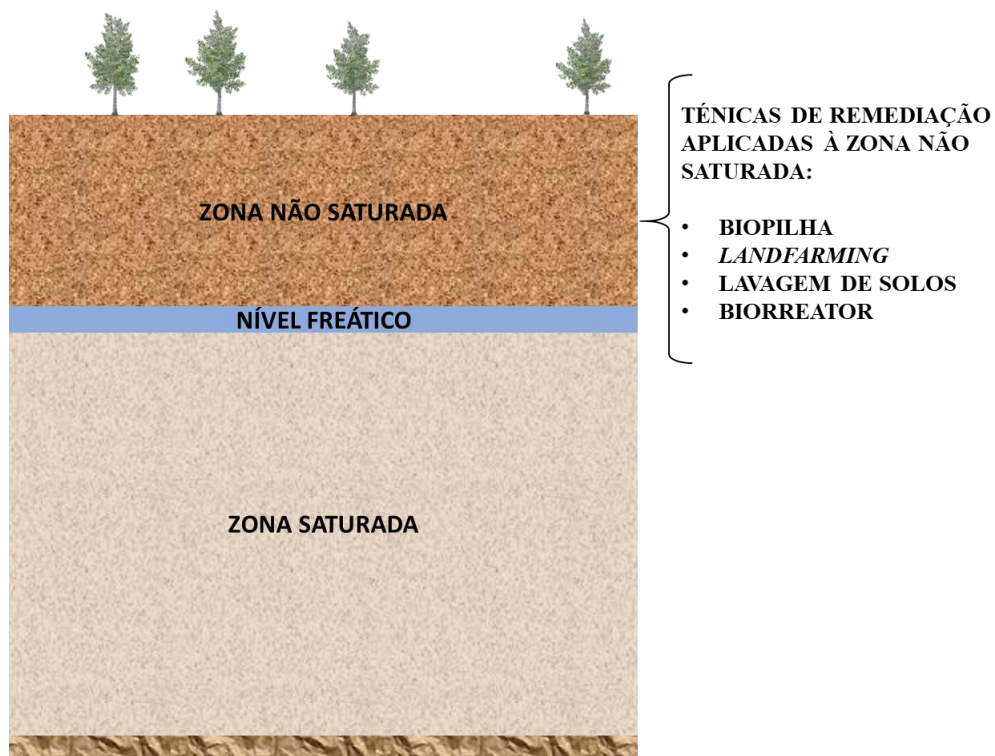
1 INTRODUÇÃO

A biorremediação é uma entre as várias técnicas desenvolvidas e aplicadas para remediação de solos, podendo ser definida como um processo que se baseia na utilização de mecanismos biológicos para reduzir (degradar, desintoxicar, mineralizar ou transformar) concentrações de poluentes (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016).

Na biorremediação existem diferentes tipos de tratamento de solo, os quais se classificam de acordo com o local de aplicação, ou seja, *in-situ* ou *ex-situ*, zona não saturada ou zona saturada, tipo de contaminante, entre outros.

Dentre as técnicas *ex-situ* aplicadas à zona não saturada, encontram-se a Biopilha, *Landfarming*, Lavagem de Solos, Biorreatores, entre outras. A Figura 1 apresenta algumas técnicas de remediação *ex-situ* aplicadas à zona não saturada.

Figura 1: Técnicas de remediação *ex-situ* aplicadas à zona não saturada.



Fonte: Autor.

A técnica de tratamento por biorreatores consiste em um sistema fechado onde diferentes modos de operação podem ser utilizados: batelada, batelada alimentada, batelada de sequenciamento, contínuo e multi-estágio. Este tipo de tratamento requer a manutenção das condições ideais dos parâmetros do processo, tais como temperatura, pH, agitação, taxas de

aeração, substrato e concentrações microbianas, caso contrário, acarretará a redução das atividades microbianas e tornará o processo de biorremediação menos eficaz (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016).

Na técnica de lavagem de solos, aplica-se um sistema de base aquosa, uso de um agente de lixiviação, como por exemplo um surfactante, para remoção dos materiais orgânicos adsorvidos nas partículas finas do solo. Neste processo, após a remediação do solo, faz-se necessário também um tratamento da água residual para o seu enquadramento nos padrões de qualidade de acordo com o órgão ambiental (IPT, 2014).

As técnicas de biopilha e *landfarming* são semelhantes em muitos aspectos, e a depender da forma em que são aplicadas podem existir diferentes interpretações sobre a nomenclatura apropriada. Biopilhas e *landfarming* são sistemas que empregam camadas de solo para o tratamento, os quais necessitam de oxigênio para estimular o crescimento e a reprodução de bactérias aeróbicas que, por sua vez, degradam os contaminantes adsorvidos ao solo. Enquanto *landfarmings* são aeradas através de aragem, as biopilhas podem ser aeradas por fluxo de ar, por meio de injeção ou extração, através de tubulação no interior das camadas de solo. *Landfarming* envolve o tratamento de uma camada de solo contaminado (até 1,0 m de espessura), onde realiza-se a estimulação da atividade microbiana aeróbia por meio de aeração e/ou adição de minerais, nutrientes e umidade. Outros materiais podem ser adicionados para melhorar as propriedades do solo (EPA NSW, 2014).

Landfarming é considerado um sistema de tratamento simples, devido a menor exigência de equipamentos para sua operação, tendo por consequência um menor custo de aplicabilidade. Na maioria dos casos esta técnica de biorremediação é feita *ex-situ*, porém, existem estudos onde esta foi aplicada *in-situ*. Embora seja um processo relativamente simples, existem fatores limitantes para a aplicação desta técnica, como por exemplo, a necessidade de grande área para manobras de maquinários para aragem, redução das atividades microbianas devido as condições ambientais desfavoráveis, concentração do contaminante (KHAN et al., 2004). *Landfarming* pode ser uma opção de remediação adequada para locais distantes de áreas residenciais, com solos com baixas concentrações de compostos voláteis e onde todas as emissões potenciais possam ser bem monitoradas (EPA NSW, 2014).

Nos casos onde o volume de solo contaminado é muito grande ou hidrocarbonetos penetraram profundamente no solo e os resíduos não podem ser tratados no local, deve-se considerar outras alternativas, como as biopilhas, de modo a fornecer uma plataforma onde as condições do solo (pH, nutrientes, umidade, temperatura) podem ser otimizadas para promover as atividades microbianas.

Segundo Sanscartier et al. 2009b, biopilhas têm o benefício adicional de exigir menor área de superfície para tratar um mesmo volume de solo em comparação com *landfarming*, no entanto, exigem mais recursos para construir e operar.

A técnica biopilha consiste em depositar o solo contaminado em camadas sobrepostas umas às outras e estimular a atividade microbiana através do fornecimento de oxigênio, nutrientes e/ou um consórcio microbiano para degradar os compostos contaminantes (JUWARKAR et al., 2010). Características do solo, como pH, nutrientes, umidade, as concentrações dos contaminantes a serem degradados, bem como a temperatura, são fatores que influenciam o processo de tratamento por biopilha e, portanto, requer um estudo acerca das características do solo a ser tratado.

Este trabalho visa, portanto, retratar um panorama acerca da biorremediação de solos contaminados, utilizando a técnica de tratamento por biopilha, de modo a apresentar os principais recursos utilizados para sua aplicação em condições extremas de baixa temperatura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOPILHA

Biopilha é uma técnica de tratamento de solos contaminados, onde o processo visa principalmente estimular a atividade microbiana aeróbia no solo por meio da aeração e/ou adição de minerais, nutrientes e umidade. Biopilhas podem ser usadas para tratar grandes volumes de solo em um espaço relativamente limitado e as configurações de um modelo em escala podem ser facilmente aumentadas e reproduzidas, obtendo desempenho e resultados semelhantes aos verificados durante estudos em laboratório (CHEMLAL et al. 2013). A altura convencional de uma biopilha pode variar de 2 a 3 metros, com largura entre 5 e 10 metros e comprimento de até de 30 metros.

A construção da biopilha inclui: impermeabilização da base da pilha a fim de reduzir os riscos de migração do lixiviado para regiões de subsuperfície não contaminados, arranjo de tubulação de injeção, extração e/ou coleta de ar, tubulação de injeção de nutrientes e umidade, sistemas de coleta e tratamento de lixiviado, métodos de pré-tratamento do solo (por exemplo, trituração, mistura, controle de pH), coberturas (se necessário). Métodos de ajuste de pH, adição de umidade e fornecimento de nutrientes geralmente incluem a incorporação de fertilizantes sólidos, cal e / ou enxofre nos solos durante a construção da biopilha, ou injeção de nutrientes líquidos, água e soluções ácidas alcalinas, de preferência através de um sistema de tubulação dedicado durante a operação da biopilha. A composição de nutrientes e soluções para controle de pH é desenvolvida a partir de análises de solo, e a frequência de sua aplicação é modificada durante a operação do sistema conforme necessário.

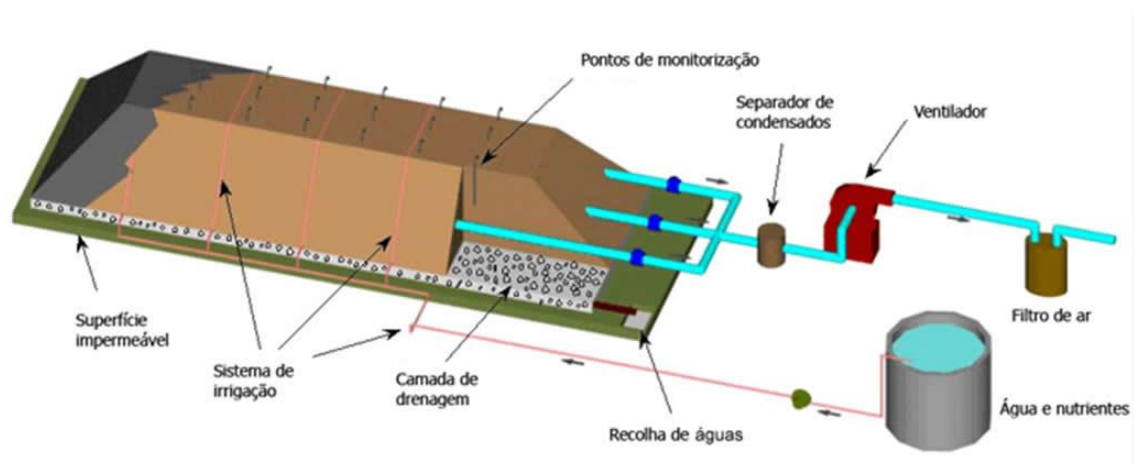
Os solos no interior da biopilha devem ser monitorados durante o seu tratamento de modo a determinar o pH, o teor de umidade e nutrientes, a população bacteriana, e as concentrações dos contaminantes. Os resultados devem ser usados para ajustar as taxas de fluxo de injeção ou extração de ar, taxas de aplicação de nutrientes, frequência e quantidade de adição de umidade e pH. Intervalos ideais para esses parâmetros devem ser mantidos para atingir taxas de degradação máximas. Outra característica importante diz respeito a flexibilidade da biopilha, pois o tempo de tratamento pode ser reduzido através do uso de sistemas que melhoram a eficiência e estimulam a atividade microbiana, como por exemplo, sistemas de aquecimento que podem ser incorporados às biopilhas para aumentar as atividades microbianas e disponibilidade do contaminante, acelerando assim a taxa de biodegradação (AISLABIE et al. 2006).

Para o tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos, geralmente utiliza-se um sistema de distribuição de ar para o fornecimento de oxigênio, a fim de estimular as reações aeróbias, pois ainda que diversas substâncias orgânicas presentes em solos contaminados sofram degradação em ambiente anaeróbio, os processos nos quais o oxigênio é o aceptor de elétrons ocorrem de forma mais rápida e devem ser incentivados nas biopilhas. O uso de sistema mecânico para revolver o solo pode também fornecer oxigênio à biopilha, chamado de sistema dinâmico, esta forma de aeração é mais comumente usada para solos com elevados teores de argila e silte.

O sistema de distribuição de ar também pode ser usado para fornecer calor ao solo, objetivando otimizar a temperatura deste quando as condições são limitantes. No entanto, o aquecimento do solo através de fluxo de ar forçado pode causar secagem excessiva deste, favorecendo a volatilização dos contaminantes e ocasionando a inibição da atividade microbiana, uma vez que os contaminantes são metabolizados pelos microrganismos na fase aquosa.

A Figura 2 apresenta um esquema representativo de uma biopilha que possui um sistema completo de mecanismos que podem ser incorporados em seu projeto.

Figura 2: Esquema Biopilha.



Fonte: Ecodeal, 2020.

A efetividade de uma biopilha é dependente de diversos fatores, estes podem ser classificados quanto às características do contaminante, características do solo e condições ambientais.

2.2 CARACTERÍSTICAS DO CONTAMINANTE

A taxa e a eficiência da biodegradação de compostos orgânicos no solo, principalmente para compostos hidrofóbicos, são afetadas pelas complexas interações entre as moléculas dos contaminantes, as partículas do solo, da água intersticial e dos microrganismos degradadores dos contaminantes.

Características como a volatilidade dos contaminantes são consideradas no tratamento por biopilhas, pois os constituintes voláteis tendem a evaporar durante a extração ou injeção de ar, em vez de serem biodegradados. Em alguns casos são instalados sistemas de captura de gases que passam por um processo de tratamento antes de serem liberados diretamente na atmosfera. Portanto, conhecer as propriedades físico-químicas e concentração do contaminante é importante a fim de determinar a taxa de biodegradação. Constituintes alifáticos e monoaromáticos de baixo peso molecular (nove átomos de carbono ou menos), por exemplo, são mais facilmente biodegradados do que os constituintes orgânicos alifáticos ou poliaromáticos de alto peso molecular.

Contaminantes orgânicos, como hidrocarbonetos de petróleo, variam desde aqueles com uma fração volátil significativa, como gasolina, até aqueles que são principalmente não voláteis, como óleos lubrificantes. Hidrocarbonetos mais leves (mais voláteis), como por exemplo a gasolina, tendem a ser removidos por evaporação durante os processos de aeração, e em menor grau, degradados pela respiração microbiana. Produtos como diesel, querosene, contêm percentagens mais baixas de constituintes voláteis do que a gasolina, sendo assim, a biodegradação desses produtos é mais significativa do que a evaporação. Enquanto produtos mais pesados, menos voláteis (por exemplo, óleos lubrificantes) não evaporam durante a aeração da biopilha, tendo a biodegradação como o mecanismo dominante que decompõe esses produtos.

Em geral, gasolina, querosene e diesel contêm constituintes com volatilidade suficiente para evaporar durante o tratamento por biopilha. A redução da taxa de fluxo de ar, através de sistemas de aeração, pode contribuir na redução de taxas de volatilização, o que por consequência reduz as taxas de degradação diminuindo os níveis de oxigênio para os microrganismos.

A solubilidade dos contaminantes em água também é um fator que afeta a taxa de biodegradação no tratamento por biopilhas. Baixa solubilidade de hidrocarbonetos em água é uma barreira ao acesso dos microrganismos a estes contaminantes, reduzindo a biodisponibilidade.

A Tabela 1 apresenta a relação entre a estrutura química de alguns hidrocarbonetos em relação a solubilidade e volatilidade.

Tabela 1: Propriedades físicas de alguns hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.

Composto	Nº de Carbonos (Anéis de Benzeno)	Massa Molar	Solubilidade (mg/L)
N-Alcanos			
etano	2	30,1	63,7
n-hexano	6	86,2	12,3
n-decano	10	128,3	0,05
n-hexadecano	16	226,4	$5,2 \times 10^{-5}$
n-eitosano	20	282,6	$3,1 \times 10^{-7}$
n-hexacosano	26	366,7	$1,3 \times 10^{-10}$
Iso-Alcanos			
2-metilpentano	6	86,2	13,8
2.2.4-trimetilpentano	8	114,2	2,4
4-metiloctano	9	128,3	0,12
Alcenos			
1-hexeno	6	84,2	50,0
trans-2-hepteno	7	98,2	15,0
1-octeno	8	112,2	2,7
Monoaromáticos			
benzeno	(1)	78,11	1791,0
tolueno	(1)	92,13	534,8
o-xileno	(1)	106,16	175,0
etilbenzeno	(1)	106,16	152,0
Poliaromáticos			
naftaleno	(2)	128,16	31,7
antraceno	(3)	178,22	0,0451
fenantreno	(4)	178,22	1,1
pireno	(5)	202,4	0,132

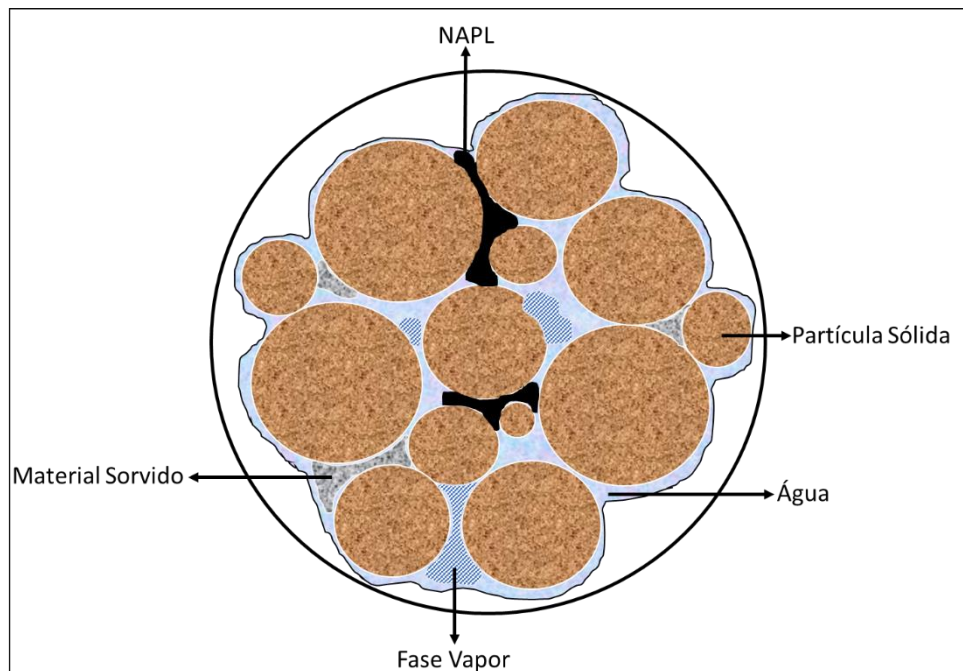
Fonte: Adaptado, HOWARD, 1990.

Sorção em sólidos, difusão em macroporos de sólidos e em sedimentos ou seu enclausuramento em fases insolúveis e lipofílicas, também são fatores que reduzem a biodisponibilidade, pois dificultam a transferência de massa, prejudicando a degradação significativa do contaminante (ICSS, 2006).

O grau de adsorção do contaminante na matriz do solo é um fator que interfere na biodisponibilidade. A biodisponibilidade para reações microbianas é menor para contaminantes que são mais fortemente adsorvidos a sólidos, mais amplamente difundidos em macroporos de solo e sedimentos, ou que estão presentes como líquido de fase não aquosa – NAPL (*Non Aqueous Phase Liquid*) (ICSS, 2006).

A Figura 3 mostra que os compostos orgânicos podem estar dissolvidos na fase aquosa que envolve as partículas do solo, dissolvidos na fase vapor, sorvidos nas partículas sólidas ou na matéria orgânica nos poros do solo ou ainda como líquido de fase não aquosa – NAPL.

Figura 3: Distribuição dos contaminantes orgânicos no solo.



Fonte: Autor.

A concentração de contaminantes no solo também influencia o desempenho de uma biopilha. A presença de concentrações muito altas de hidrocarbonetos ou metais pesados no solo pode ser tóxica ou inibir o crescimento e a reprodução de bactérias responsáveis pela biodegradação. Por outro lado, concentrações muito baixas de material orgânico resultarão em níveis reduzidos de atividade microbiana.

2.3 CARACTERÍSTICAS DO SOLO

2.3.1 pH

O pH pode afetar a solubilidade e a disponibilidade biológica de nutrientes, metais e outros constituintes. Para favorecer o crescimento bacteriano o pH do solo deve estar na faixa de 6 a 8, com um valor de cerca de 7 (neutro) sendo o ideal. Solos com valores de pH fora desta faixa antes da operação exigirão ajuste de pH durante a construção ou operação da biopilha.

2.3.2 Textura do solo

Para garantir que a adição de oxigênio (por extração ou injeção de ar), distribuição de nutrientes e teor de umidade dos solos possam ser mantidos dentro de faixas eficazes, deve-se

considerar a textura dos solos. Por exemplo, solos que tendem a se aglomerar (como argilas) são difíceis de arejar e resultam em baixas concentrações de oxigênio, essa condição dificulta a distribuição de nutrientes uniformemente através desses solos. Nesses casos, pode-se adicionar materiais estruturantes, como serragem, lascas de madeira, com o objetivo de criar um meio menos compacto.

2.3.3 Umidade

O tratamento de solos contaminados utilizando o processo de biopilha requer a manutenção de níveis ideais de umidade para um crescimento microbiano adequado. A umidade excessiva do solo, entretanto, restringe o movimento do ar através da subsuperfície, reduzindo assim a disponibilidade de oxigênio, que é essencial para os processos metabólicos aeróbicos. A faixa ideal de umidade do solo deve estar entre 40% a 85% da capacidade de retenção de água (capacidade de campo).

A utilização de um sistema de aeração pode ocasionar o ressecamento do solo e, portanto, faz-se necessário o monitoramento dessa condição ao longo do tratamento.

2.3.4 Nutrientes

Os microrganismos necessitam de nutrientes inorgânicos, como nitrogênio e fósforo para estimular o crescimento celular e sustentar os processos de biodegradação. Os nutrientes podem estar disponíveis em quantidades suficientes nos solos a serem tratados, no entanto, em solos com carência destes nutrientes há a necessidade de sua adição na biopilha, a fim de melhorar a eficiência da biorremediação, estimulando a atividade microbiana. A este processo de adição de nutrientes, denomina-se bioestimulação:

- Bioestimulação (Biostimulation): Estimulação de microrganismos presentes nos solos ou águas subterrâneas, fornecendo nutrientes necessários para o crescimento, elevando a produção de biomassa, gerando um aumento de catalisadores, bem como, favorecendo a manutenção da atividade metabólica.

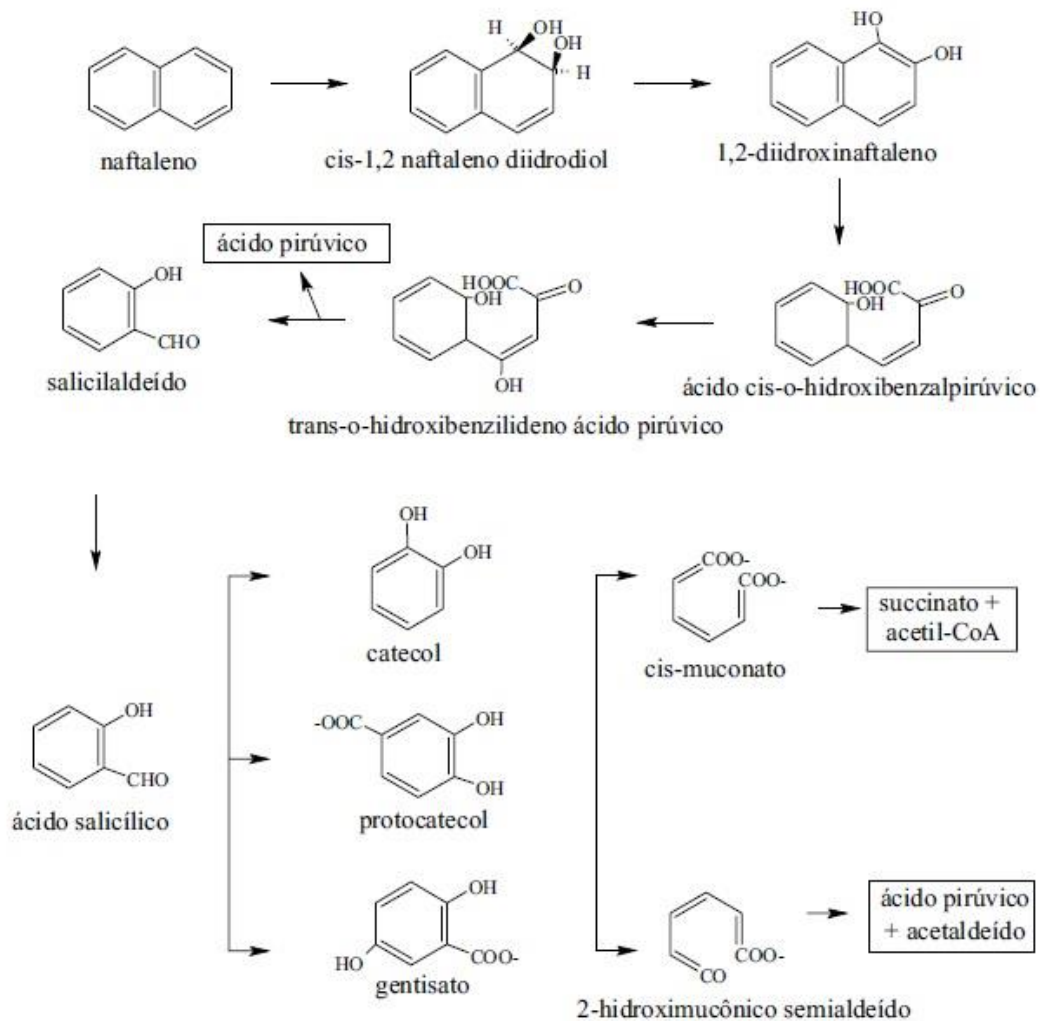
Quantidades excessivas de certos nutrientes, como por exemplo, fosfato e sulfato, podem reprimir o metabolismo microbiano (US EPA, 1994).

2.3.5 Microrganismos

Nos solos, geralmente, existe uma diversidade de microrganismos. Em solos bem drenados, os quais são mais apropriados para biopilhas, esses organismos são em sua maioria aeróbios e dentre eles, as bactérias configuram o grupo mais numeroso e bioquimicamente ativo.

O processo metabólico usado pelas bactérias para produzir energia necessita de um aceptor final de elétrons para oxidar enzimaticamente a fonte de carbono. Os microrganismos são classificados de acordo com as fontes de carbono e aceptores finais de elétrons que necessitam para realizar processos metabólicos. As bactérias que utilizam compostos orgânicos (por exemplo, constituintes do petróleo e outros orgânicos de ocorrência natural) como sua fonte de carbono são chamadas de heterotróficas; àquelas que utilizam compostos de carbono inorgânicos (por exemplo, dióxido de carbono) são autotróficas. As bactérias que consomem oxigênio como aceptor final de elétrons são aeróbicas, já aqueles que consomem um composto diferente de oxigênio, (por exemplo, nitrato, sulfato) são classificadas como anaeróbicas. Bactérias classificadas como facultativas são aquelas que podem utilizar tanto oxigênio, quanto demais compostos como aceptores finais de elétrons.

Os contaminantes formados por hidrocarbonetos são compostos apolares ou hidrofóbicos, o que os torna permeáveis à membrana citoplasmática. Deste modo são transportados para o interior das células por meio de difusão simples. Após o seu transporte para o interior da célula, o composto passa pelo processo de transformação, sofrendo uma reação de biodegradação através de enzimas que funcionam como catalizadores dessas reações. A Figura 4 apresenta as etapas de reação de biodegradação aeróbica do Naftaleno.

Figura 4: Degradação do naftaleno por bactérias aeróbicas.

Fonte: BAMFORTH & SINGLETON, 2005.

Análises laboratoriais podem ser efetuadas para avaliar a densidade de microrganismos e sua capacidade em degradar o contaminante alvo. Caso a contagem de microrganismos ou mesmo a capacidade destes em degradar um contaminante específico seja insuficiente, a densidade populacional pode ser aumentada a partir da técnica de bioaumentação:

- Bioaumentação (Bioaugmentation): adição de microrganismos em um meio contaminado, podendo ser aplicada com culturas exógenas ou isoladas da própria microflora presente no solo a ser tratado, ou seja, visa introduzir ou aumentar a população microbiana com capacidades degradativas.

2.3.6 Temperatura

A temperatura ambiente é um parâmetro importante, uma vez que exerce influência sobre a temperatura do solo, impactando a atividade bacteriana e, conseqüentemente, a biodegradação. Como a temperatura do solo varia com a temperatura ambiente, poderá haver períodos durante o ano em que o crescimento bacteriano será afetado e, conseqüentemente a degradação dos constituintes.

Dentro da faixa de 10°C a 45°C, a taxa de atividade microbiana normalmente dobra para cada aumento de 10°C na temperatura. Temperaturas superiores a 60°C são favoráveis para o aumento de taxas de transferência de massa dos compostos para a fase aquosa, de modo que temperaturas mais elevadas afetam a tensão superficial e viscosidade de hidrocarbonetos, que por sua vez, influenciam a pressão capilar e permeabilidade, melhorando assim, a taxa de degradação microbiana (WESTLAKE et al. 1974; DIBBLE & BARTHA 1979; SANDVIK et al. 1986; FRANKENBERGER, 1991). Entretanto, temperaturas elevadas, acima de 75°C, podem reduzir as taxas de degradação e aumentar a volatilização.

Entre os parâmetros de controle para degradação de hidrocarbonetos, temperatura é geralmente considerada um dos mais importantes em regiões de climas frios, uma vez que a biodegradação segue a dinâmica da relação de Arrhenius, onde o metabolismo microbiano aumenta na medida em que a temperatura aumenta.

A biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos em regiões frias é dificultada por baixas temperaturas, solos congelados e verões curtos. Temperaturas baixas reduzem a atividade bacteriana, retardando a biorremediação de hidrocarbonetos e minimizando a eficiência do processo. Entretanto, nota-se que a biorremediação é cada vez mais vista como uma tecnologia de remediação que pode ser aplicada em climas frios. (SANSCARTIER et al., 2009).

Margesin e Schinner (2001) denotaram que mesmo em locais frios, regiões árticas e antárticas, a biorremediação demonstrou ser um método viável para solos contaminados com hidrocarbonetos. Estudos apontam que a atividade microbiana do solo diminui significativamente em temperaturas abaixo de 10°C e cessa abaixo de 5°C, em contrapartida, outras pesquisas demonstraram que a biodegradação de hidrocarbonetos é viável mesmo em temperaturas abaixo de 10°C, constatando que tal condição não afetaria a capacidade dos microrganismos de degradarem contaminantes orgânicos (SANSCARTIER et al., 2009), quando associados a utilização de recursos que auxiliam na manutenção da temperatura e otimização do sistema de biopilhas.

Intervenções na biopilha, como por exemplo sistema de aquecimento, cobertura da pilha ou introdução de bactérias capazes de atuar em baixas temperaturas, podem superar os efeitos de climas mais frios e estender a duração do tempo de atividade para haver a biodegradação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo apresentar um panorama acerca da biorremediação de solos contaminados, utilizando a técnica de tratamento por biopilha sob baixas condições de temperatura, diferentes culturas microbianas e demais aspectos relacionados ao tratamento.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Apresentar uma análise crítica de sete estudos selecionados em revisão bibliográfica sobre a aplicação da técnica de biopilha em climas de baixa temperatura, de modo a comparar as metodologias aplicadas, eficiência de técnicas de otimização de tratamento, taxas de remoção de contaminantes, escala e configuração das biopilhas.

4 METODOLOGIA

A principal ferramenta de busca de dados utilizada para a pesquisa foi o portal Capes, onde a pesquisa bibliográfica ocorreu no período compreendido entre março e maio de 2020. Inicialmente os termos e palavras-chave utilizados foram: *soil bioremediation*, *biopile*, *biopile technique*, *description of the biopile technique*.

A Tabela 2 apresenta os resultados iniciais da pesquisa, obtidos para cada palavra-chave, a partir dos quais iniciou-se a triagem e determinação dos artigos que serão apresentados e discutidos neste estudo.

Tabela 2: Pesquisa bibliográfica inicial	
PALAVRAS-CHAVE PARA PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	
Termos Pesquisados	Resultados da Pesquisa (nº artigos)
Soil bioremediation	34.552
Biopile	305
Biopile technique	103
Description of the biopile technique	22

Os estudos analisados direcionaram para o uso de biopilhas para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos, descrevendo os experimentos acerca da eficácia de processos de biorremediação em relação à temperatura, adição de nutrientes, inoculação de microrganismos biodegradadores e aplicação de diferentes estratégias no controle da temperatura em climas frios.

Após a análise dos trabalhos, decidiu-se por direcionar a pesquisa para artigos que realizaram experimentos de biopilhas em regiões de frio extremo, utilizando de diferentes recursos para a otimização da biorremediação nestas condições, tendo a temperatura como um dos principais fatores de controle.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos demonstraram que mesmo sob condições extremas de baixas temperaturas é possível obter bons resultados de biodegradação de hidrocarbonetos com o uso de biopilhas, onde diferentes técnicas foram aplicadas.

Independentemente das diferentes técnicas aplicadas para a manutenção da temperatura, o monitoramento e a análise de alguns fatores que influenciam a eficácia das biopilhas é fundamental para a obtenção de sucesso no tratamento. Dentre os mais importantes destacam-se tipo e concentração de contaminante, nutrientes (bioestimulação), atividade microbiana (bioaugmentação) e temperatura. A Tabela 3 apresenta os estudos que serão discutidos neste trabalho.

Tabela 3: Estudos selecionados na metodologia.

Estudos	Localidade	Autores
<i>Thermal insulation systems for bioremediation in cold regions.</i>	Fairbanks, Alaska	Dennis M. Filler; Robert F. Carlson (2000)
<i>Integral biopile components for successful bioremediation in the Arctic.</i>	Fairbanks, Alaska	Dennis M. Filler, Jon E. Lindstrom, Joan F. Braddock, Ronald A. Johnson, Royce Nickalaski (2001)
<i>The influence of temperature on bacterial assemblages during bioremediation of a diesel fuel contaminated subAntarctic soil</i>	Kerguelen Archipelago, Antártica. “Port aux Français”	Daniel Delille; Frederic Coulon, Emilien Pelletier (2005)
<i>Monitoring of biopile composting of oily sludge.</i>	Göteborg, Suécia	Mait Kriipsalu; Diauddin Nammari (2010)
<i>Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: comparison of biostimulation and bioaugmentation</i>	Lahti, Finlândia	Sari Kauppi; Aki Sinkkonen; Martin Romantschuk (2011)
<i>Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM).</i>	Ontário, Canadá	Francisco Gomez; Majid Sartaj (2014)
<i>Bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: optimization of a biostimulation strategy using response-surface methodology (RSM).</i>	Estação científica Carlini, Antártica	Martínez Álvarez LM; LAM Ruberto; Lo Balbo A; Mac Cormack WP (2017)

5.1 TIPOS DE CONTAMINANTES

O óleo diesel foi o contaminante avaliado no tratamento de solos contaminados pela maioria dos autores discutidos neste estudo, exceto Kriipsalu e Nammari (2009) e Gomez e Sartaj (2014) que usaram como contaminante alvo borra oleosa e óleo de aquecimento respectivamente.

O óleo diesel pode ser classificado como um constituinte alifático e monoaromático de baixo peso molecular, podendo ser apresentado na faixa de C₈-C₂₈, apresenta baixas percentagens de constituintes voláteis, sendo mais facilmente biodegradado do que os constituintes orgânicos alifáticos ou poliaromáticos de alto peso molecular.

A borra oleosa investigada por Kriipsalu e Nammari (2009) foi analisada como sendo um constituinte de cadeias de carbono na faixa C₁₀-C₄₀, sendo considerada como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), conforme análises apresentadas em seu estudo. PAHs ocorrem principalmente em misturas (como mistura de PAH pura ou em conexão com hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos e aromáticos heterocíclicos). Diferente dos constituintes monoaromáticos, os HPAs enquadram-se como produtos mais pesados, menos voláteis, não evaporam durante a aeração da biopilha, tendo a biodegradação como o mecanismo dominante que decompõe esses produtos.

Esse parâmetro afeta a eficiência do tratamento por biopilha e, portanto, deve ser levado em consideração ao comparar resultados de trabalhos distintos, pois as diferentes características dos compostos influenciam na biodegradação. Outro ponto a ser enfatizado diz respeito à faixa de carbono predominantes neste constituinte. O contaminante diesel pode apresentar comportamentos diferentes de acordo com a faixa de carbono que o classifica. Daí a importância da realização de análises específicas.

5.2 ESCALA E CONFIGURAÇÕES DAS BIOPILHAS

Entre os estudos ocorreram experimentos de bancada (laboratório), experimentos de biopilha com escala reduzida e experimentos de biopilha em campo. Essas diferenças em relação aos tratamentos devem ser consideradas ao analisar a eficiência dos trabalhos, pois experimentos realizados em laboratório ou até mesmo em escala reduzida trazem condições ótimas, que influenciam de forma considerável quando comparadas à experimentos de campo. Isso ocorre porque parâmetros como temperatura, distribuição de nutrientes, contagem e análise de atividade microbiana são mais facilmente controlados e otimizados em laboratório e em

escala reduzida, e portanto, tendem a gerar melhores resultados, o que não garante que quando levados à aplicação em campo trarão as mesmas taxas de remoção de contaminantes. Em contrapartida, o tempo de tratamento aplicado pode favorecer o processo de degradação de contaminantes nas biopilhas aplicadas em campo.

Outro fator que influencia nos resultados, além da escala utilizada, diz respeito ao projeto da biopilha. Biopilhas com escalas maiores requerem um projeto mais complexo para que o controle de parâmetros, como injeção de nutrientes, microrganismos, oxigênio, temperatura e seu monitoramento em toda sua dimensão ocorra de forma homogênea, como realizado por Kriipsalu e Nammari (2009) e Filler et. al. (2001), que apresentaram em suas biopilhas sistemas bem elaborados para controle e monitoramento desses parâmetros e que permitiram alcançar bons resultados para taxa de degradação.

Pensar nas condições ótimas de dimensionamento de uma biopilha é importante tanto para a eficiência do processo quanto para a redução dos seus custos. Para isso, os autores testaram diferentes configurações de biopilha, visando identificar a influência destes fatores quando trabalhados em conjunto ou isoladamente.

5.2.1 Experimentos de Campo

Kriipsalu e Nammari (2009) conduziram o experimento utilizando sistema de biopilha estática que possuía um volume de 28 m³, temperatura, umidade e gases (CH₄, CO₂ e O₂) foram medidos em três níveis horizontais, com oito seções verticais. O sistema de aeração (realizado por sopradores) foi posicionado na parte inferior e a ventilação feita através de duas saídas de 100mm. O tratamento por biopilha teve duração de 370 dias.

Filler et. al. (2001), abordam em seu experimento o uso de sistema de isolamento térmico (*termal insulation system* – TIS) aplicado em conjunto com *bioventing*, visando aumentar a eficácia da biorremediação através de biopilhas, com resultados apresentados referente a 329 dias de tratamento. O solo contaminado foi misturado com cascalho e a biopilha foi construída com as seguintes dimensões: 49m de comprimento, 40m de largura e 2.4m de altura. A biopilha foi projetada com pontos de monitoramento de gases e temperatura, poços de monitoramento, duas redes de tubos horizontais para injeção de ar e bioestimulação, além do sistema de isolamento térmico (TIS), para prover calor a biopilha. O sistema TIS montado sobre a biopilha contava com a instalação de monitores termostáticos e era constituído de sete linhas paralelas ligadas por cabos de aquecimento, formando uma malha envolvendo a superfície e

laterais da pilha, de modo que fosse possível fornecer uma distribuição de calor de forma homogênea e eficaz.

Kauppi et. al. (2011) realizou experimento de campo onde foram construídas duas pilhas, a Pilha 1 construída sobre tubo de aeração conectado a um sistema de bombeamento, enquanto a Pilha 2 foi construída sobre tubo semelhante ao da Pilha 1, no entanto, alimentado com fluxo passivo, sem conexão com bomba. A Pilha 1 foi dividida em quatro seções e a Pilha 2 em três seções, resultando em um total de sete seções com tratamentos diferentes (bombeamento de ar; adição de nutrientes; materiais estruturantes).

5.2.2 Experimentos em Escala Reduzida

Gomez e Sartaj (2014), construíram 18 biopilhas (4,0m x 4,0m x 1,0m; com 16 m³ cada), mantidas e submetidas a diferentes consórcios microbianos e compostos orgânicos, durante 94 dias de tratamento. De forma a avaliar a eficiência das biopilhas sob diferentes condições, os autores realizaram a seguinte divisão e nomenclatura para os tratamentos: (S) é a configuração de biopilha contendo apenas o solo contaminado escavado, usada como controle; na configuração (SC) houve mistura de solo contaminado com composto orgânico, a fim de determinar o efeito da adição deste; (SM) refere-se à configuração contendo solo contaminado e inoculação de consórcio microbiano, para avaliar o efeito individual de adição do consórcio, e por fim, a configuração (SCM), onde houve adição de composto orgânico e consórcio microbiano ao solo contaminado, para avaliar o efeito combinado destes dois elementos em conjunto. Para o experimento SC, o solo era misturado utilizando-se escavadeiras até se obter um substrato uniforme. Após esse procedimento, o solo homogeneizado era disposto em camadas de 0,30m sobre tubos perfurados que fariam a aeração do sistema. Em SM e SCM, além de misturar o solo, a cada camada de solo (0,30m) foram pulverizadas soluções que continham os consórcios microbianos. Este processo foi repetido até que a altura desejada das biopilhas fossem alcançadas. Após a construção das biopilhas, estas foram recobertas com lona preta de 6mm para proteger contra processos erosivos e principalmente manter condições adequadas de umidade e temperatura no interior das pilhas.

Martínez Álvarez et. al (2017) realizaram o experimento durante 50 dias utilizando aproximadamente 830 kg de solo contaminado, o qual foi homogeneizado utilizando um tambor rotativo e posteriormente dividido em duas porções equivalentes para a construção de duas pilhas. A partir disso, uma das pilhas foi usada como controle (*control biopile* – CC) e outra utilizando sistema de bioestimulação (*biostimulated system* – BS). O perfil construtivo das

biopilhas contava com um formato piramidal (210cm x 140cm x 130 cm; h = 20cm). A biopilha CC era periodicamente misturada e realizada a adição de água para manter o nível de umidade em 15%. A biopilha BS passava pelo mesmo processo descrito, porém, com a adição de nutrientes C:N:P, previamente otimizados através de estudo anterior (MARTÍNEZ ÁLVAREZ et. al., 2015). Ambas biopilhas foram cobertas usando geomembrana de polietileno, assim foi possível isolar o solo, evitar a lixiviação e proteger as pilhas contra vento, chuva e neve.

No experimento de Delille et. al. (2005), foram utilizados quatro compartimentos de madeira (0,75m x 0,75m), com solo limpo e aplicação de óleo diesel na superfície. Dois compartimentos, um com adição de nutrientes e outro sem nutrientes, foram deixados em contato direto com a atmosfera, enquanto outros dois, com a mesma configuração, foram recobertos por camada de lona plástica dupla.

5.2.3 Experimentos em Laboratório

Delille et. al. (2005) também desenvolveram um experimento em laboratório com injeção de ar aquecido com objetivo de determinar os efeitos do aumento da temperatura. Foram usados 12 recipientes (chamados pelos autores de biopilhas) de polietileno (31cm x 26cm x 36cm), com amostra de solo de 3,5kg. Os 12 recipientes foram subdivididos em 4 configurações, onde em uma das configurações se utilizou processo de aeração.

Kauppi et. al. (2011) apresentaram experiências de laboratório realizadas em duas fases, denominadas rodada I e rodada II, sendo apresentadas diferentes condições de testes em relação à adição de nutrientes e inoculação de microrganismos.

5.3 METODOLOGIA DE AMOSTRAGEM

Kriipsalu e Nammari (2009) realizaram monitoramento de temperatura e gases continuamente durante 370 dias, através de 24 pontos de medição. Além destes parâmetros, o teor de umidade também foi medido continuamente e ocasionalmente foram realizadas medições do fluxo de ar. As concentrações de contaminantes foram determinadas utilizando GC-FID, os autores não descrevem no estudo os métodos aplicados para a realização das análises.

No início do experimento, Gomez e Sartaj (2014) realizaram a coleta de cinco amostras compostas para caracterizar o solo contaminado. No decorrer do experimento as amostras de solo das biopilhas passavam por um processo de mistura para a homogeneização. Para a

determinação das concentrações foi utilizado o *Canadian Wide Standards Tier*, método que requer a determinação de 4 frações de hidrocarbonetos: F1 (C6 a C10), F2 (> C10 a C16), F3 (> C16 a C34) e F4 (C35 +), usando GC-FID ou gravimetria. Os autores utilizaram um modelo estatístico para o cálculo das taxas de remoção de contaminantes. O software utilizado para a análise estatística foi o MINITAB®, cuja equação do modelo foi validada pelo F-test na análise de variância (ANOVA).

Na equação do modelo estatístico de Gomez e Sartaj (2014) nutrientes e microorganismos são descritos como variáveis independentes dentro da equação e, portanto, afetam diretamente os resultados finais quando o modelo é rodado. Porém, esses fatores podem variar consideravelmente no interior de uma mesma biopilha em pontos distintos, o que pode acarretar desvios na predição dos valores a serem utilizados para otimização do tratamento. Essa condição foi demonstrada no estudo de Kriipsalu e Nammari (2009), que após coleta e análises de amostras foi aplicado um modelo espacial tridimensional, utilizando krigagem ordinária, de modo a descrever a dinâmica de variação de temperatura, fluxo de ar e concentração de hidrocarbonetos no interior da biopilha, e se constatou uma grande variação da concentração de hidrocarbonetos, fato que pode ser explicado pela maneira heterogênea que se deu a distribuição de umidade, temperatura e nutrientes.

Kauppi et. al. (2011), nas experiências de laboratório, coletaram amostras de 2g e 3g de orifícios de aproximadamente 8mm cada. No experimento de campo, duas amostras replicadas foram coletadas por meio de um amostrador nas sete seções da pilha. A camada superior de 20 cm foi removida com uma pá e as amostras representaram uma profundidade de aproximadamente 20 a 70 cm da pilha. As amostras foram coletadas três vezes, aos 6 meses, 8 meses e 11 meses desde o início do experimento. O óleo era extraído com acetona e hexano e as concentrações de contaminantes eram determinadas usando GC-FID de acordo com padrão ISO 16703.

Delille et. al. (2005) realizou amostragens periódicas visando realizar um levantamento regular de bactérias totais, saprófitas e degradantes de hidrocarbonetos. Amostras de solo de superfície (primeiros 2cm) foram coletadas utilizando núcleos estéreis de plástico de 2 ml assépticos para contagem bacteriana e frascos de vidro pré-lavados (hexano / acetona) para análise química. Para determinar as concentrações apresentadas foram identificados e quantificados usando GC/MS, cromatografia gasosa.

Filler et. al. (2001) instalaram nove poços de monitoramento, na biopilha e em seu entorno, para que assim fosse possível a coleta de amostras de água. A coleta de água foi realizada para avaliar e quantificar número e atividade microbiana no solo em tratamento,

podendo deste modo fazer avaliações contínuas sem causar perturbações no solo da biopilha e em seu entorno. As amostras de água do poço do primeiro período foram coletadas em julho, imediatamente após a fertilização, em agosto e ao final do aquecimento ativo em novembro. As amostras de água foram analisadas quanto a alterações nos números microbianos ao longo do período de tratamento. Amostras de solo foram coletadas apenas em julho e posteriormente a biopilha foi coberta com o TIS. O_2 e CO_2 foram medidos com um equipamento portátil de medição de vapores para quantificar as concentrações de gases. A partir desses dados, foram as calculadas as concentrações de contaminantes no solo.

No experimento de Martínez Álvarez et. al (2017), a cada dois dias as biopilhas eram descobertas e misturadas manualmente com o uso de pás. As amostragens de solo foram reunidas após mistura e homogeneização da biopilha de maneira a assegurar maior representatividade, no entanto não descrevem o período em que eram realizadas essas amostragens. Para determinação das concentrações foi utilizado o espectrofotômetro infravermelho, a partir de método ASTM D 7066.

O monitoramento regular é necessário para garantir a otimização das taxas de biodegradação, rastrear as reduções de concentração de constituintes, bem como monitorar as emissões de vapores, a migração de constituintes e demais fatores que influenciam no tratamento (nutrientes, microrganismos, umidade etc.). Um plano de amostragem deve ser estabelecido e modificado com base nos resultados do monitoramento regular dos solos das biopilhas.

A taxa de degradação pode ser avaliada por meio da modificação temporal de consumo de O_2 e formação de CO_2 . Verificou-se que os trabalhos de Martínez Álvarez et. al (2017) e Delille et. al. (2005) não trouxeram dados referentes às análises desses parâmetros. A determinação do consumo de O_2 é mais adequada para calcular a taxa de degradação real do que a formação de CO_2 , pois o CO_2 pode estar sujeito à outras reações.

Uma modificação da taxa de degradação permite avaliar se as medidas de remediação realizadas estão adequadas. Uma redução da taxa de degradação no decorrer da remediação pode indicar a falta de água, sais de nutrientes ou contaminantes degradáveis.

Solos dentro da biopilha devem ser monitorados com regularidade durante tratamento para a determinação do pH, teor de umidade, população bacteriana, conteúdo de nutrientes e concentrações de constituintes. Embora alguns trabalhos cite a realização de análises em seus tratamentos, verificou-se que alguns destes não trazem a frequência com que foram feitos os monitoramentos.

5.4 CONCENTRAÇÃO DE CONTAMINANTES

TPH é uma análise de concentração que consiste na quantificação isolada de cada hidrocarboneto, divididos em alifáticos e aromáticos, além da subdivisão por faixas de carbono, permitindo, através das características observadas, chegar mais próximo do tipo e proveniência da contaminação. Análises de TPH para faixas de carbono específicas também podem ser realizadas, como por exemplo, GRO (*Gasoline Range Organics*) - de 6 a 10 carbonos, DRO (*Diesel Range Organics*) - de 9 a 28 carbonos e ORO (*Oil Range Organics*) - de 20 a 40 carbonos, entre outras. No entanto, estas faixas são variáveis em função da bibliografia de referência adotadas por cada laboratório.

Conforme pode ser verificado na Tabela 4, os autores não realizaram as mesmas análises de concentrações, o que implica em resultados de hidrocarbonetos de petróleo em diferentes faixas de carbono e impede que seja feita uma comparação entre os resultados obtidos nos trabalhos. Martínez Álvarez et. al. (2017) apresentaram dados de concentração de hidrocarbonetos na faixa C₉ - C₂₈. Já Kauppi et. al. (2011) e Kriipsalu e Nammari (2009), especificaram a faixa de carbono em C₉ – C₄₀ e C₁₀ – C₄₀, respectivamente. Filler et. al. (2001) também trouxeram resultados para uma faixa de carbono específica (GRO e DRO). Delille et. al. (2005) não trouxeram dados referentes às concentrações em seus estudos e Gomez e Sartaj (2014) especificaram somente o valor de concentração inicial e ao final, ambos os estudos apresentaram taxas de remoção (%) de TPH.

Conhecer as faixas de carbono dos constituintes de forma ampla (análise de TPH) é importante para o entendimento prévio dos processos de degradação que serão preponderantes na biopilha. Ao avaliar faixas específicas de carbono, os autores restringem as quantificações em relação às concentrações totais tanto iniciais, quanto finais de hidrocarbonetos presentes e desta forma, podem apresentar erros analíticos na determinação do contaminante e consequentemente na aplicabilidade da biopilha, assim como na determinação dos mecanismos de degradação preponderantes. Conforme pode ser observado no trabalho de Filler et. al. (2001), o qual realizou análises de GRO e DRO, verifica-se que as concentrações de GRO são muito baixas quando comparadas às concentrações de DRO, cuja faixa de hidrocarbonetos contempladas é maior. Portanto, por se tratar de óleo diesel, percebe-se que uma análise somente para GRO traria concentrações bem inferiores de hidrocarbonetos.

Tabela 4: Análise de Concentrações de Contaminantes.

Autores	Tipo de Contaminante	Experimento	Análises (Concentrações Contaminantes)							
			TPH (mg/kg)		TPH – GRO ⁽⁶⁾ (mg/kg)		TPH – RDO ⁽⁷⁾ (mg/kg)		Hidrocarbonetos de petróleo (mg/kg)	
			Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Martínez Álvarez et. al. (2017) ⁽¹⁾	Óleo diesel	Escala reduzida - Biopilha Controle	-	-	-	-	-	-	2180	1110
		Escala reduzida - Biopilha c/ Bioestimulação	-	-	-	-	-	-	2180	527,79
Filler et. al. (2001) ⁽²⁾	Óleo diesel	Biopilha - Sistema Aquecimento Ativo (<i>TIS</i>)	-	-	1000	27,1	11000	397	-	-
Kriipsalu e Nammari (2009) ⁽³⁾	Borra oleosa	Biopilha em conjunto com biorreator	-	-	-	-	-	-	15000	4700
Kauppi et. al. (2011) ⁽⁴⁾	Óleo diesel	Biopilha - Experimento Bancada	-	-	-	-	-	-	1750	600
		Biopilha - experimento de campo	-	-	-	-	-	-	2700	≈500
Gomez e Sartaj (2014) ⁽⁵⁾	Óleo para aquecimento	Escala reduzida - Biopilhas	924	-	-	-	-	-	-	-

(1) Os autores apresentaram os valores de concentrações como quantificações de hidrocarbonetos na faixa entre C₉ – C₂₈.

(2) Adotou-se os maiores valores de concentrações das faixas obtidas.

(3) Os autores apresentaram os valores de concentrações como quantificações de hidrocarbonetos na faixa entre C₁₀ - C₄₀.

(4) Os autores apresentaram os valores de concentrações como quantificações de hidrocarbonetos na faixa entre C₉ - C₄₀.

(5) Os autores trazem a concentração inicial e indicam as concentrações finais como taxas de redução (74% - 82%).

(6) GRO (*Gasoline Range Organics*).

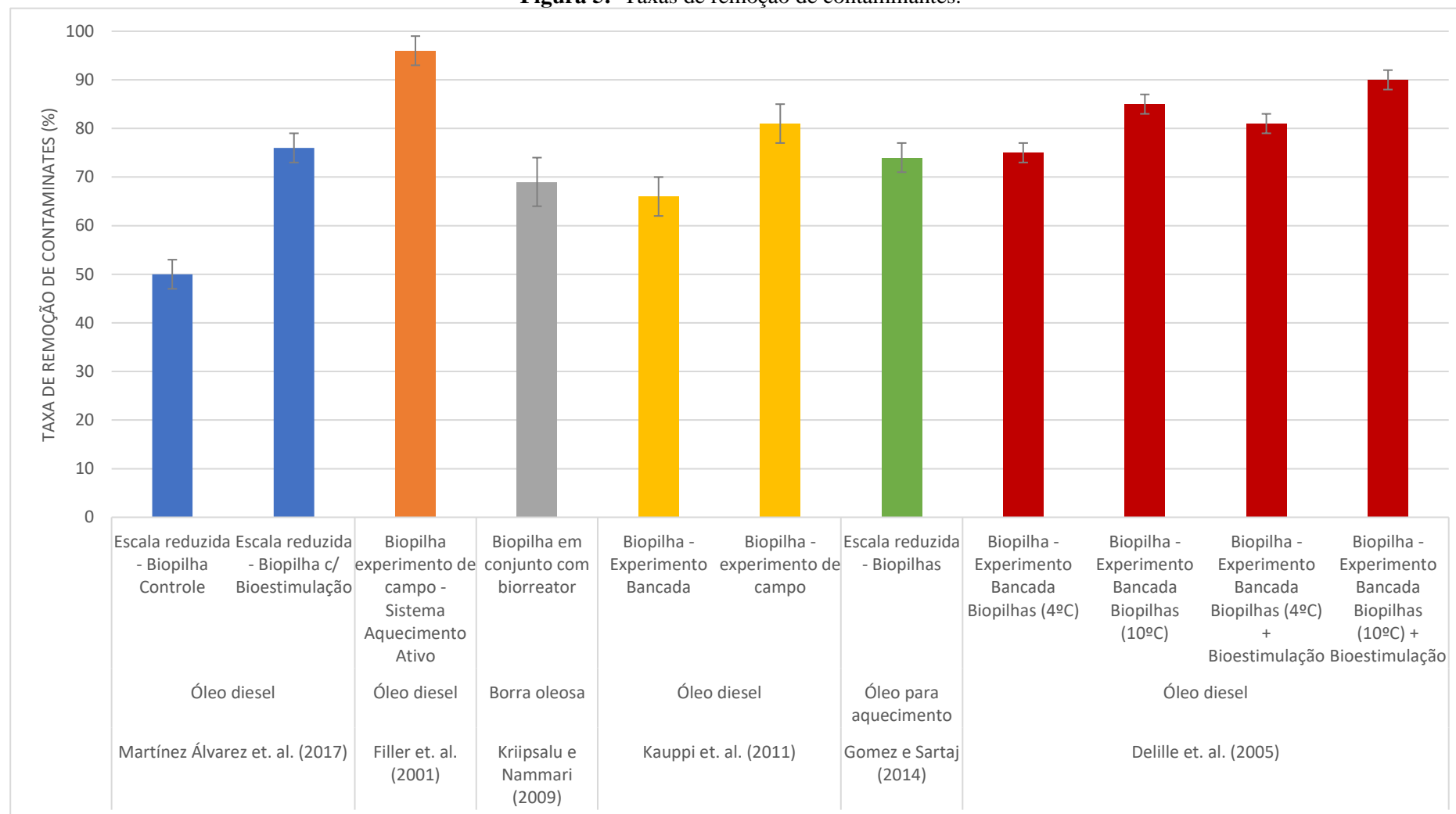
(7) DRO (*Diesel Range Organics*).

A fim de possibilitar uma comparação da eficiência da remoção de contaminantes obtidas nos trabalhos apresentados, optou-se por utilizar valores de concentrações considerando taxas de remoção de contaminantes, sem fins de comparação em relação ao tipo de análise laboratorial aplicada. A Figura 5 apresenta os melhores resultados para as taxas de remoção dos contaminantes obtidas em cada trabalho.

A análise comparativa da taxa de remoção de contaminantes indica que o experimento de Filler et. al. (2001) apresentou a melhor taxa de remoção e menor concentração final, embora tenha apresentado a maior concentração inicial. Acredita-se que esta eficiência no tratamento se deve ao fato de Filler et. al. (2001) terem aplicado em seu experimento o sistema de isolamento térmico (*thermal insulation system – TIS*) para prover calor a biopilha em conjunto com *bioventing* e bioestimulação, visando aumentar a eficiência da biorremediação de solo contaminado com óleo diesel. Filler et. al. (2001) apontaram que no primeiro período de tratamento a temperatura do solo foi mantida entre 1.5°C a 6.5°C. Durante o segundo período de biorremediação, as temperaturas no interior da biopilha foram mantidas entre 0.5°C e 7.8°C no verão, tendo a região inferior da pilha aferições de temperatura variando entre 0.5°C a 1.2°C até dezembro. Além disso, a biopilha foi projetada com pontos de monitoramento de gases e temperatura, poços de monitoramento, duas redes de tubos horizontais para injeção de ar e bioestimulação, conforme explicado no item 5.2.1.

Em contrapartida, Kriipsalu e Nammari (2009) apresentaram os menores valores para taxa de remoção de contaminantes. Os autores conduziram um experimento utilizando sistema de biopilha estática para tratamento de solo contaminado com borra oleosa. O experimento buscou a otimização da biopilha estática, avaliando a degradação da borra oleosa através do monitoramento de temperatura, fluxo de ar injetado através aeradores na temperatura ambiente, umidade, medição dos níveis de gases.

É importante salientar que, embora a taxa de remoção seja significativa para análise da eficiência do sistema projetado para biopilha, ou seja, configuração, técnicas de aquecimento e parâmetros escolhidos para a degradação do contaminante, a concentração final deve estar enquadrada dentro das normas locais vigentes, como obtido no trabalho de Filler et. al. (2001), que apresentaram concentrações finais abaixo do valor de referência para o Alasca, correspondente a 500 mg/kg para DRO, 100 mg/kg para GRO e 15 mg/kg para BTEX. Portanto, altas taxas de remoção não significam necessariamente baixas concentrações ao término do tratamento e sistemas com baixas taxas de remoção podem ter alcançado índices de concentração final dentro dos padrões aceitáveis.

Figura 5: Taxas de remoção de contaminantes.

Fonte: Autor.

5.5 BIOAUMENTAÇÃO

Verificou-se que os artigos que optaram por usar a bioaumentação realizaram constantes análises para investigar o desenvolvimento de comunidades microbianas, identificação, diversidade e contagem destas, objetivando avaliar a influência da inoculação de microrganismos na degradação dos constituintes. Cabe destacar que o aumento de uma comunidade de microrganismos não necessariamente indica que haverá maiores taxas de biodegradação.

Kauppi et. al. (2011) tiveram como um de seus objetivos testar a aceleração da degradação dos hidrocarbonetos de óleo diesel através de um consórcio microbiano ou uma cepa isolada (*Acinetobacter calcoaceticus*). De acordo com os resultados apresentados pelos autores, segundo análises laboratoriais referentes a identificação, diversidade e densidade de bactérias, a adição de uma cultura bacteriana pura ou uma cultura mista (consórcio microbiano) não apresentou efeitos significativos ao tratamento. Seguindo a mesma linha de análises, Filler et. al. (2001) apontam que houve uma extensão no tempo de biodegradação, porém, essa condição não se deu pela bioaumentação e sim pela utilização de sistema de aquecimento ativo, adição de nutrientes e oxigenação da biopilha. A combinação das técnicas funcionou bem para aumentar a biodegradação de hidrocarbonetos no ambiente em questão, não havendo necessidade aparente de aumentar a população microbiana através de bioaumentação.

Conforme relatado por Kauppi et. al. (2011), o solo utilizado havia sido exposto à contaminação por um longo período, podendo indicar que a comunidade bacteriana autóctone no solo contaminado teve tempo para se adaptar aos hidrocarbonetos de diesel. Como consequência, a comunidade bacteriana inoculada no experimento não foi capaz de se adequar e competir com as bactérias nativas, devido às condições ambientais variadas a que foram expostas. Boas taxas de degradação de contaminantes foram observadas quando técnicas de bioaumentação e bioestimulação foram aplicadas em conjunto. Esta mesma condição foi observada no trabalho desenvolvido por Gomez e Sartaj (2014), onde segundo dados do estudo, nas biopilhas cuja bioestimulação e bioaumentação foram usadas simultaneamente, as taxas de degradação de TPH variaram entre 74% a 82%, enquanto, nas biopilhas usadas como controle, sem adição de compostos orgânicos e uso de consórcios microbianos a taxa de remoção de TPH atingiu uma média de 48%.

Thomassin-Lacroix et al. (2002) descrevem que a degradação eficaz de hidrocarbonetos de petróleo não depende somente da comunidade bacteriana. O uso apenas da bioaumentação não traz efeitos significativos, mas a relação entre bioaumentação e

bioestimulação melhoram a biorremediação, mesmo em ambientes com baixas temperaturas. Mesmo comprovando uma alta capacidade de degradação dos microrganismos, a utilização de bioaumentação deve ser avaliada de forma criteriosa, uma vez que bons resultados podem ser alcançados sem a aplicação da técnica e assim gerar economia ao projeto de biopilha.

5.6 BIOESTIMULAÇÃO

Os trabalhos apresentaram experimentos em laboratório e/ou em campo, através de diferentes configurações entre as biopilhas (pilha controle, pilha com o emprego de bioestimulação ou em conjunto com bioaumentação, uso de aeração, técnicas de aquecimento, entre outras) com o objetivo de comparar os resultados e determinar a eficácia de cada sistema adotado, conforme apresentado na Figura 5.

Observa-se que em todas as configurações que utilizaram a bioestimulação, melhores taxas de biodegradação foram apresentadas. Porém, assim como verificado para resultados de bioaumentação, os trabalhos indicam que a bioestimulação quando aplicada isoladamente não é fator determinante para o sucesso nos resultados de uma biopilha.

O tratamento por biopilha usado Kriipsalu e Nammari (2009), trouxe desvantagens ao processo, uma vez que nesse processo a biopilha se tornou um sistema estático, onde, com o decorrer do tratamento, houve compactação do solo. Neste modelo, os resultados de concentrações de hidrocarbonetos foram heterogêneos em diferentes pontos da biopilha. Uma justificativa para os resultados distintos de concentração na biopilha se dá devido a compactação do solo, a qual criou caminhos preferenciais para o fluxo de ar, afetando temperatura e umidade. Acredita-se que a compactação do solo afetou também a distribuição de nutrientes, ocorrendo de forma desigual e influenciando diretamente nos resultados do tratamento.

Kriipsalu e Nammari (2009), Delille et. al. (2005) e Martínez Álvarez et. al (2017), não usaram a técnica de bioaumentação em seus trabalhos e observou-se a importância dos nutrientes como fatores limitantes na biodegradação de hidrocarbonetos. Delille et. al. (2005) apontaram que onde não houve adição de nutrientes, as concentrações remanescentes de TPH ficaram na faixa de 25% a 4°C e 15% a 10°C, enquanto nos experimentos em que houve adição de nutrientes as taxas remanescentes de TPH foram ainda menores, 19% a 4 °C e 10% a 10°C. Deste modo, pode-se inferir que a interação entre variáveis independentes é necessária para obtenção de melhores resultados em tratamentos por biopilhas.

Verificou-se nos artigos a ausência de dados de monitoramentos em relação às concentrações dos nutrientes ao longo dos tratamentos. A análise deste parâmetro auxiliaria na tomada de decisões para o controle adequado da biopilha, onde em determinados casos, a aplicação da bioestimulação poderia ser ajustada durante a operação do sistema conforme fosse necessário, obtendo melhores resultados de degradação ao final do tratamento.

5.7 TÉCNICAS PARA AUMENTO E/OU MANUTENÇÃO DA TEMPERATURA

Três técnicas distintas para elevar e/ou manter a temperatura em níveis que contribuíssem com o sistema de tratamento por biopilhas foram empregadas nos estudos: sistema de aeração, aquecimento ativo e recobrimento da biopilha.

Kriipsalu e Nammari (2009), verificaram que o fluxo de ar proporcionou um efeito positivo nos primeiros dois meses de estudo, no entanto, constatou-se uma insuficiência de fluxo de ar no centro da biopilha, possivelmente por haver maior compactação do solo e caminhos preferencias nas áreas laterais do biorreator. Conclui-se que esta condição influenciou os resultados finais do tratamento, pois variadas concentrações de hidrocarbonetos em diferentes pontos da pilha foram verificadas, o que pode ser explicado ainda pela baixa biodisponibilidade nos microporos e variação dos teores de umidade na biopilha, resultando em um ambiente desfavorável para a biodegradação. Acredita-se que este fenômeno possa ter ocorrido por se tratar de uma biopilha estática, onde para um fluxo de ar homogêneo seria necessário efetuar revolvimento do solo.

Outro ponto a ser destacado, refere-se à utilização de um sistema de aeração com fluxo de ar na temperatura ambiente. Pontua-se que o ar nas condições ambiente pode não ter atuado efetivamente nos resultados de biodegradação, ao passo que um o sistema com fornecimento de fluxo de ar aquecido poderia manter a temperatura em níveis estáveis durante todo o tratamento, contribuindo para melhores taxas de biodegradação, conforme realizado por Delille et. al. (2005). Em contrapartida, Kauppi et. al. (2011), aplicando o mesmo método de aeração, também sem aquecimento do ar, mas com acréscimo de madeira triturada ao solo, obtiveram melhores resultados no que se refere ao aumento da temperatura em relação à temperatura ambiente. As temperaturas nas pilhas variaram entre 8°C e 10°C, em maio, 20°C e 25°C em junho e julho. Em outubro, as temperaturas das pilhas estavam entre 11°C e 14°C.

Conclui-se que a inclusão da madeira contribuiu para aquecer o solo e impedir perdas de calor para a atmosfera por convecção. Além de contribuir para a elevação da temperatura, a inserção de madeira triturada favoreceu também o aumento da porosidade do solo,

possibilitando maior fluxo de ar no interior da biopilha e consequentemente, a distribuição de nutrientes, elevando as taxas de biodegradação.

Delille et. al. (2005) também utilizaram um sistema de injeção de ar contínuo durante todo o experimento, no entanto, este foi aquecido a uma temperatura de aproximadamente 10°C acima da temperatura ambiente. Durante o experimento a temperatura variou entre 0°C no inverno a 20°C no verão. Bactérias totais foram determinadas por contagem direta de acridina laranja (*AODC – acridine orange direct count*) usando um microscópio de epifluorescência, enquanto as bactérias degradadoras de hidrocarbonetos foram determinadas pelo método do número mais provável (*MPN – most propable number*), indicando que a injeção de ar aquecido apresentou resultados promissores, mostrando-se eficiente na obtenção de calor mesmo em condições de climas frios. Porém, por se tratar de experimento em escala reduzida, a manutenção da aeração aquecida durante todo o tratamento pode ser um entrave para biopilhas com maiores dimensões e volume de solo, uma vez que se deve considerar os custos embutidos para a instalação, manutenção e gastos energéticos para manter o sistema. Deste modo, é importante destacar que, além de considerar os resultados obtidos para o experimento em escala, há a necessidade de um gerenciamento de custos, relacionados aos equipamentos necessários ao sistema, de forma que estes atendam a uma demanda para tratamentos em larga escala que não superem a relação da vantagem ao se optar por tratamento com biopilhas.

A aplicação de um sistema de aeração como um meio de elevar a temperatura durante o tratamento do solo, embora tenha apresentado resultados distintos, tendo em vista as diferentes configurações das biopilhas usadas nos estudos, demonstrou -se como boa alternativa na manutenção da temperatura no interior das biopilhas.

Filler e Carlson (2000) e Filler et. al. (2001), utilizaram sistema de isolamento térmico (*termal insulation system – TIS*) aplicado em conjunto com *bioventing*, visando aumentar a eficácia da biorremediação através de biopilhas em ambientes de condição extrema de baixas temperaturas, no Alasca. Em regiões de climas de frio rigoroso, a biorremediação utilizando biopilhas e o sistema *TIS*, apresenta-se como uma solução bastante promissora, principalmente quando se busca reduzir o tempo de tratamento, uma vez que o sistema de aquecimento ativo proporciona uma extensão do período de atividade microbiana. Contudo, é importante destacar que antes do início do tratamento, a relação custo-benefício deve ser avaliada por meio de um projeto da biopilha, levando-se em consideração o volume de solo a ser tratado, características climáticas da região, estimativa de materiais e trabalhadores necessários para a instalação, operação e manutenção do sistema, bem como análise das fontes de energia a serem utilizadas.

Um site muito grande pode limitar a frequência de monitoramento, levar a operação e manutenção a exceder os custos e tornar a relação custo-benefício desvantajosa.

Gomez e Sartaj (2014), Martínez Álvarez et. al (2017) e Delille et. al. (2005), construíram biopilhas utilizando o recobrimento destas como prática para elevar a temperatura do sistema em relação a temperatura ambiente. Observou-se nos experimentos realizados por Gomez e Sartaj (2014), que mesmo com média de temperatura ambiente na faixa negativa (-6,2°C), o recobrimento com geotêxtil mostrou-se eficaz, mantendo a temperatura no interior das pilhas, entre 1°C e 8°C. Martínez Álvarez et. al (2017) descrevem que a região da Antártica, onde o experimento foi realizado, tem como característica, no verão, receber maior incidência de radiação solar por períodos mais longos, portanto, o uso de geomembrana escura pôde proporcionar uma maior absorção de radiação nesse período e consequentemente elevar o potencial de aquecimento das biopilhas. Já Delille et. al. (2005), demonstrou que com este recurso foi possível aumentar a temperatura das biopilhas em até 2.2°C em relação à temperatura externa e que este incremento favoreceu o ambiente para a atividade microbiana, reduzindo o tempo de tratamento. Os estudos apontaram que o recobrimento induziu a uma elevação e manutenção das temperaturas nas biopilhas e contribuiu diretamente no desempenho destas em relação à biorremediação, podendo, portanto, ser utilizado como um recurso de manutenção de temperatura em regiões de climas frios, além de representar um ótimo custo-benefício, por se tratar de um material barato e de fácil aplicação quando comparado às demais tecnologias empregadas para este fim.

6 CONCLUSÃO

O uso de bioaumentação apresentou comportamentos distintos, de acordo com a configuração adotada, onde em determinadas áreas a inoculação de consórcios microbianos não obteve o efeito esperado, como por exemplo, no experimento realizado por Kauppi et. al. (2011), cuja inoculação microbiana não teve efeito relevante na degradação do diesel. Em contrapartida, foram descritos bons resultados usando a bioaumentação, principalmente, quando aplicada em conjunto com a bioestimulação, como apresentado por Gomez e Sartaj (2014), o que indica que a interação entre estas variáveis apresentou sucesso na remoção de hidrocarbonetos.

O mesmo efeito é observado quando se compara estes dois parâmetros (bioaumentação e bioestimulação) com a influência da temperatura. Observou-se uma interação positiva entre bioestimulação e temperatura na biodegradação de hidrocarbonetos, entretanto, não foi observado um efeito significativo na relação bioaumentação e temperatura.

Os estudos demonstraram que a remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos é viável, mesmo em condições onde a temperatura é inferior a 10°C, e que tal fator aliado a recursos de aquecimento da biopilha não afeta a capacidade dos microrganismos para degradar contaminantes orgânicos no solo. É importante destacar que a despeito dos métodos utilizados para manutenção e/ou aumento da temperatura, os trabalhos apontam que esta variável não oferece garantia de bons resultados se utilizada de forma independente. Em cada trabalho fica clara a necessidade de interação de técnicas que auxiliam no aumento da temperatura com outros parâmetros.

Com base no que foi observado no trabalho de Filler et. al. (2001), o qual apresentou resultados de concentração discrepantes para as análises de GRO e DRO, conclui-se que a seleção adequada do tipo de análise a ser realizada, ou seja, que englobe a maior faixa de carbonos possível (análise de TPH) é fundamental para conhecimento das características dos compostos presentes no solo. A adoção de análises cujas faixas de carbono são mais restritivas podem mascarar a real concentração de hidrocarbonetos e levar a uma seleção de métodos e técnicas para otimização da biopilha equivocados.

A análise de taxas de remoção de contaminantes como forma de demonstrar os resultados do tratamento por biopilha não reflete os reais resultados do tratamento, pois altas taxas de remoção não significam necessariamente baixas concentrações finais e sistemas com baixas taxas de remoção podem ter alcançado índices de concentração final dentro dos valores de referência locais. Portanto o uso deste indicador auxilia no entendimento da eficiência do

processo de biopilha e na tomada de decisões quanto à sua otimização, mas não deve ser utilizado como garantia de sucesso na remoção de contaminantes.

Portanto, um sistema de biopilha eficiente requer um estudo detalhado das condições locais, bem como dos aspectos físicos, químicos, microbianos e características da área contaminada, além das condições climáticas. Esses são fatores essenciais para definir métodos adequados, a fim de se obter os melhores resultados, especialmente quando aplicada em regiões que apresentam climas mais frios e rigorosos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISLABIE, J., SAUL, D.J., FOGHT, J.M. Bioremediation of hydrocarbon contaminated polar soils. *Extremophiles*, 2006, 10:171–179.
- AZUBUIKE, C.C., CHIKERE, C.B., OKPOKWASILI, G.C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. 2016.
- 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.
- CHEMLAL, R., ABDI, N., LOUNICI, H., DROUCHE, N., PAUSS, A., MAMERI, N. Modeling and qualitative study of diesel biodegradation using biopile process in sandy soil. *Int Biodeterior Biodegradation*, 2013, 78:43–48.
- DELILLE, D., COULON, F., PELLETIER, E. The influence of temperature on bacterial assemblages during bioremediation of a diesel fuel contaminated subAntarctic soil. *Cold Regions Science and Technology* 48 (2007) 74– 83. 2004.
- DIBBLE, J.T. & BARTHA, R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied Environmental Microbiology*, 1979, 37, 729–739.
- ECODEAL. Descontaminação de Solos [online]. [Acesso em: 08 jul. 2020]. Disponível em: <https://www.ecodeal.pt/unidades-de-tratamento/unidade-de-descontaminacao-de-solos>.
- ENVIRONMENT PROTECTION AUTHORITY – EPA NSW. Best Practice Note: Landfarming. State of NSW and Environment Protection Authority, 2014.
- FILLER, D. M., CARLSON, R.F. Thermal insulation systems for bioremediation in cold regions. *Journal of cold regions engineering*, 2000, 119.
- FILLER, D. M., LINDSTROM, J.E., BRADDOCK, J.F., JOHNSON, R.A., NICKALASKI, R. Integral biopile components for successful bioremediation in the Arctic. *Cold Regions Science and Technology*. 2001, 32, 143–156.
- FRANKENBERGER, W.T. The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons, 1991, pp. 237–293. In: Calabrese, E.J., Kostecki, P.T. (Eds) *Hydrocarbon Contaminated Soils and Groundwater*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.
- GOMEZ, F., SARTAJ, M. Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 103 e 109.
- HOWARD, P. H., 1990, *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals - Vol. I and II*. Chelsea, Lewis Publishers, Inc.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS - IPT. Guia de elaboração de planos de intervenção para o gerenciamento de áreas contaminadas. 1ª ed. rev. São Paulo, 2014. (Publicação IPT; 4374).

INTERNATIONAL CENTRE FOR SOIL AND CONTAMINATED SITES – ICSS. Manual For Biological Remediation Techniques. ICSS at the German Federal Environmental Agency. Dessau – Germany, 2006.

JØRGENSEN, K., PUUSTINEN, J., SUORTTI, A.M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environ. Pollut.* 2000, 107, 245 e 254.

JUWARKAR, A., SINGH, S., MUDHOO, A. A comprehensive overview of elements in bioremediation. *Environ. Sci. Biotechnol.* 2010, 9, 215 e 288.

KAUPPI, S., SINKKONEN, A., ROMANTSCHUK, M. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: comparison of biostimulation and bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65, 359 - 368.

KHAN, F.I., HUSAIN, T., HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. *J Environ Manag*, 2004, 71:95–122.

KIRK, J.L., BEAUDETTE, L.A., HART, M., MOUTOGLIS, P., KLIRONOMOS, J.N., LEE, H., TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods*, 2004, 58, 169 e 188.

KRIIPSALU, M., NAMMARI, D. Monitoring of biopile composting of oily sludge. *Waste Management & Research*, 2010: 28: 395–403.

MARGESIN, R., SCHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 56, 650 e 663.

MARTINEZ ALVAREZ, L.M., LO BALBO, A., MAC CORMACK, W.P., RUBERTO, L.A.M. Bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: optimization of a biostimulation strategy using response-surface methodology (RSM). *Cold Reg. Sci. Technol.* 2015, 119:61–67.

MARTÍNEZ ÁLVAREZ, L.M., RUBERTO, L.; LO BALBO, A., MAC CORMACK, W.P. *Science of the Total Environment*, 2017, 590–591.

SANDVIK, S., LODE, A. & PEDERSON, T.A. Biodegradation of oily sludge in Norwegian soils. *Applied Microbial. Biotechnology*, 1986, 23, 297–301.

SANSCARTIER, D., LAING, T., REIMER, K., ZEEB, B. Bioremediation of weathered petroleum hydrocarbon soil contamination in the Canadian high Arctic: laboratory and field studies. *Chemosphere*, 2009, 77, 1121 e 1126.

THOMASSIN-LACROIX, E. J. M., ERIKSSON, M., REIMER, K. J., MOHN, W. W. Biostimulation and bioaugmentation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59:551–556.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites: A Guide For Corrective Action Plan Reviewers. 1994.

WESTLAKE, D.W.S., JOBSON, A., PHILLIPPE, R. & COOK, D.F. Biodegradability and crude oil composition. Canadian Journal of Microbiology, 1974, 20, 915–928.