

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA POLITÉCNICA

AMZY TANIA VALLENAS ARÉVALO

**BIORREMEDIAÇÃO NA GESTÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS:
PRINCÍPIOS, APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS**

São Paulo
2020

AMZY TANIA VALLENAS ARÉVALO

Biorremediação na gestão de áreas contaminadas: princípios, aplicações e perspectivas

Versão Corrigida

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 Sustentável e Revitalização de Brownfields.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marilda Mendonça Guazzelli Ramos Vianna

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

Vallenas-Arevalo, Amzy Tania

Biorremediação na gestão de áreas contaminadas: princípios, aplicações e perspectivas / A. T. Vallenas-Arevalo -- São Paulo, 2020.

48 p.

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

1.Biodegradação 2.Biorremediação 3.Áreas contaminadas 4.Bioprocessos
5.Contaminação do Solo I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica.
Departamento de Engenharia Química II.t.

RESUMO

VALLENAS-ARÉVALO, Amzy Tania. Biorremediação na gestão de áreas contaminadas: princípios, aplicações e perspectivas. 2020. 48 f. Monografia (MBA em Gestão de Áreas Contaminadas, Desenvolvimento Urbano Sustentável e Revitalização de Brownfields) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Atualmente, a descontaminação de solo e água afetados por atividades industriais passadas e presentes é um dos maiores desafios ambientais. A remoção de poluentes do ambiente, visando eliminar riscos à saúde humana e aos ecossistemas, demanda a utilização de técnicas de engenharia para remediação. As técnicas convencionais de processos químicos e físicos, comumente utilizadas no passado, estão sendo substituídas por técnicas de processos biológicos, uma alternativa sustentável e de baixo custo para a remediação de sítios contaminados. A biorremediação é um processo no qual os microrganismos, como as bactérias e os fungos, degradam os poluentes através de rotas bioquímicas. Na remediação de áreas contaminadas, a biorremediação pode ser feita *in situ* e *ex situ* utilizando os processos de degradação naturais ou aumentando a velocidade dos mesmos mediante estratégias de engenharia. O presente trabalho apresenta uma revisão da literatura em relação aos princípios, aplicações e perspectivas das técnicas biotecnológicas na remediação de poluentes como uma ferramenta para a gestão de áreas contaminadas.

Palavras-chave: Biodegradação. Biorremediação. Áreas contaminadas. Bioprocessos. Contaminação do solo.

ABSTRACT

VALLENAS-ARÉVALO, Amzy Tania. Bioremediation of contaminated sites: Principles, applications, and future perspectives. 2020. 48 p. Monografia (MBA em Gestão de Áreas Contaminadas, Desenvolvimento Urbano Sustentável e Revitalização de Brownfields) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Currently, the decontamination of soil and water affected by past and present industrial activities is one of the greatest environmental challenges. The removal of pollutants from the environment, in order to eliminate risks to human health and ecosystems, requires the use of engineering techniques for remediation. Conventional techniques of chemical and physical processes, commonly used in the past, are being replaced by biological process techniques, a sustainable and low-cost alternative for the remediation of contaminated sites. Bioremediation is a process in which microorganisms, such as bacteria and fungi, degrade pollutants through biochemical routes. In the remediation of contaminated areas, bioremediation can be done *in situ* and *ex situ* using natural degradation processes or increasing their speed through engineering strategies. The present work presents a literature review regarding the principles, applications, and perspectives of biotechnological techniques in the remediation of pollutants as a tool for the management of contaminated areas.

Keywords: Biodegradation. Bioremediation. Contaminated sites. Bioprocess. Soil Pollution.

SUMÁRIO

1	Introdução	9
2	Objetivo.....	10
3	Justificativa	11
4	Conceitos básicos de biotecnologia aplicados ao tratamento de contaminantes.....	13
4.1	Interação microbiana com os poluentes.....	13
4.1.1	Poluentes Orgânicos	15
4.1.2	Poluentes Inorgânicos.....	18
4.2	Técnicas de identificação de microrganismos	20
5	Fatores que influenciam a eficiência da biorremediação	23
5.1	Características do poluente	23
5.2	Características da biota nativa	24
5.3	Características do ambiente	26
5.3.1	Biodisponibilidade.....	26
5.3.2	Presença de nutrientes	27
5.3.3	Temperatura.....	27
5.3.4	pH	28
5.3.5	Toxicidade	28
6	Aplicação da biorremediação na gestão de áreas contaminadas.....	30
6.1	Técnicas de biorremediação <i>in situ</i>	30
6.1.1	Atenuação natural ou remediação passiva.....	30
6.1.2	Bioventilação	31
6.1.3	Bioestimulação	31
6.1.4	Bioaumentação	32
6.1.5	Barreiras Reativas Permeáveis	32
6.2	Técnicas de biorremediação <i>ex situ</i>	33
6.2.1	Land Farming	33
6.2.2	Biorreatores	34
7	Casos de aplicação e sucesso	35
8	Potencialidades e desafios futuros	37
9	Conclusão.....	42
10	Referências Bibliográficas	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Poluentes orgânicos e seus respectivos microorganismos degradadores.....	17
Tabela 2. Microorganismos utilizados no tratamento de metais potencialmente tóxicos.	20
Tabela 3. Microorganismos biodegradadores de poluentes reportados na literatura.....	25
Tabela 4. Vantagens e desvantagens da biodegradação na gestão de áreas contaminadas.	37
Tabela 5. Técnicas de remediação de águas subterrâneas reportadas em documentos de tomada de decisão (Ano 2015-2017).	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo básico bacteriano.....	14
Figura 2. Esquema geral da biodegradação de contaminantes orgânicos.....	16
Figura 3. Processos de detoxificação microbiana de metais.	19
Figura 4. Representação da possível distribuição do poluente no ambiente do solo.....	27
Figura 5. Diagrama esquemático de um tratamento por bioventilação	31
Figura 6. Esquema de Barreiras Reativas Permeáveis (BRP).	33
Figura 7. Tratamento de solos contaminados com <i>Land farming</i>	34
Figura 8. Tendências na distribuição de tecnologias de tratamento de águas subterrâneas aplicadas em sítios contaminados nos EUA (1982-2017).	38

1 INTRODUÇÃO

A poluição do solo e das águas subterrâneas é um problema mundial causado pelo acúmulo de químicos tóxicos que colocam em risco a saúde humana e os ecossistemas. Mesmo que muitos avanços tenham sido realizados na gestão de áreas contaminadas, os sítios contaminados geralmente representam um grande desafio para atuais e futuras gerações devido à presença de diferentes contaminantes e dificuldades na aplicação de técnicas de tratamento e o risco que representa à contaminação das fontes de água doce.

Nesse contexto, a degradação de poluentes nos sítios contaminados demanda a aplicação de estratégias de descontaminação que atinjam resultados eficientes a um baixo custo e em períodos de tempo apropriados. Assim, as técnicas químicas e físicas são normalmente as primeiras opções de tratamento considerando o tempo e eficiência do processo. Porém, os processos biológicos, sozinhos ou em combinação com outras técnicas, têm se desenvolvido nos últimos anos como uma alternativa sustentável e eficiente para a remoção de poluentes nas áreas contaminadas (SCHENBERG, 2010). Em condições favoráveis, os microrganismos são capazes de degradar uma ampla variedade de poluentes de origem humana em moléculas inorgânicas não tóxicas como o dióxido de carbono e o nitrogênio molecular (HATZINGER; KELSEY, 2005).

Os processos de biorremediação referem-se à utilização de rotas metabólicas e reações bioquímicas naturais para a degradação de poluentes, seja através da adição de nutrientes ao solo ou da adição de microrganismos especializados para a biorremediação (SUTHERSAN *et al.*, 2017). Esse processo utiliza os microrganismos capazes de degradar contaminantes em sistemas passivos ou ativos, os quais precisam de diferentes graus de engenharia. Assim, a aplicação da biorremediação na gestão de áreas contaminadas está ligada ao entendimento dos processos geoquímicos, hidrogeológicos e microbiológicos do ambiente contaminado e, por isso, o desenho e implementação de estratégias de tipo biológico estão limitados pelo conhecimento nessas ciências para alcançarem soluções eficazes (ROCKNE; REDDY, 2003).

Assim, o presente trabalho apresenta as informações disponíveis na literatura em relação a utilização de estratégias de biorremediação na gestão de áreas contaminadas. Isto com a finalidade de entender os princípios nos quais as tecnologias são baseadas, as opções de tratamento disponíveis, os casos de sucesso e as oportunidades e desafios futuros da remoção de contaminantes utilizando bioprocessos.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo reunir informações disponíveis na literatura acerca dos princípios da biorremediação, aplicação de técnicas biológicas na gestão de áreas contaminadas tanto por contaminantes orgânicos como inorgânicos e as perspectivas futuras da biotecnologia aplicada a estes problemas ambientais.

3 JUSTIFICATIVA

Embora os esforços para diminuir o fluxo de contaminantes ao ambiente têm sido significativos nas últimas décadas, ainda são liberadas no meio ambiente substâncias tóxicas para os organismos vivos. No mundo, existem milhões de sítios contaminados identificados. Por exemplo, nos países de Ásia-Pacífico, existem aproximadamente 3 milhões de sítios contaminados incluindo minas abandonadas e aterros fechados (SINHA *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo, nos Estados Unidos existem perto de 400 mil sítios contaminados (ROCKNE; REDDY, 2003). Retirar o material contaminado para dispô-lo em aterros significaria uma inversão econômica gigante e poderia não resolver o problema completamente. Por outro lado, não realizar um tratamento colocaria em risco os ecossistemas e a saúde humana.

No desafio da gestão de áreas contaminadas e na restauração ambiental, a remoção de componentes tóxicos é uma tarefa desafiadora que precisa do desenvolvimento de ferramentas tecnológicas eficientes e de baixo custo para viabilizar economicamente a recuperação dos espaços contaminados e o fechamento de atividades industriais. Os processos de remediação têm sido comumente realizados mediante aplicação de técnicas de tratamento químico e técnicas de tratamento comumente realizadas fora do local de contaminação que evitam a disposição final, mas ainda necessitam de transporte do material a ser tratado (SINHA *et al.*, 2009).

Porém, a biotecnologia aplicada ao tratamento de sítios contaminados tem crescido muito nas últimas décadas como uma alternativa viável para a degradação de poluentes. Sempre que em condições favoráveis, os microrganismos podem degradar os contaminantes em produtos não tóxicos (ROCKNE; REDDY, 2003) e a biorremediação faz referência à otimização desses processos naturais.

As técnicas convencionais para o tratamento de poluentes em áreas contaminadas, podem ser caras e complexas, além de nem sempre oferecer uma solução completa (KUMAR; SHAHI; SINGH, 2018). Assim, a aplicação de processos microbiológicos é um requisito do desenvolvimento sustentável e é uma ferramenta versátil, no entanto, limitada no desenvolvimento de soluções de tratamento para locais contaminados.

É por isso que o modo como os microrganismos interagem com os poluentes e quais fatores influenciam na remoção dos contaminantes, precisam ser estudados em detalhe a fim de analisar de forma integrada os parâmetros que determinam a resposta do

tratamento microbiológico e os critérios que devem ser utilizados ao escolher ou desenvolver biotecnologias para o tratamento de áreas contaminadas. Assim, as estratégias de remediação de sítios contaminados utilizando técnicas biológicas serão cada vez mais utilizadas em processos confiáveis e eficientes.

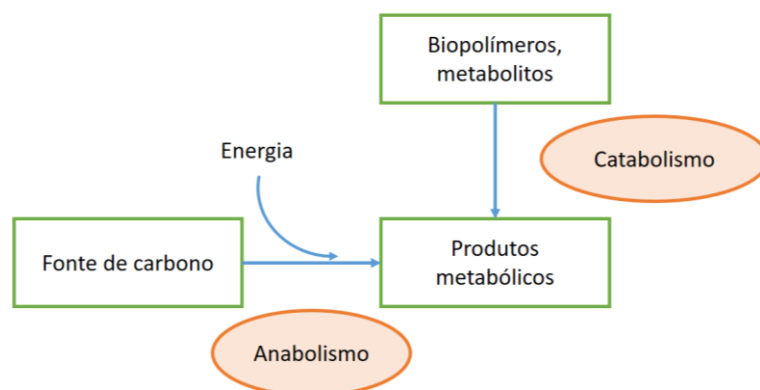
4 CONCEITOS BÁSICOS DE BIOTECNOLOGIA APLICADOS AO TRATAMENTO DE CONTAMINANTES

A biodegradação pode ocorrer por ação de diversos microrganismos. No ambiente, existem bactérias, algas, fungos e outros microrganismos com a capacidade de remover ou degradar contaminantes da água e do solo. Na maioria dos casos, a biodegradação por ação bacteriana é considerada a mais importante do ponto de vista ambiental (JØRGENSEN, 2008), e é considerada uma ferramenta da biotecnologia que depende de várias condições como a presença ou ausência de oxigênio, o microrganismo em estudo, as condições ambientais, entre outras. Assim, é preciso entender como ocorre essa interação entre os microrganismos e os poluentes e os fatores que influenciam os processos de biodegradação para uma posterior aplicação da ferramenta no tratamento de poluentes.

4.1 Interação microbiana com os poluentes

Como outros organismos vivos, as bactérias assimilam nutrientes e substratos para convertê-los em biomassa e excretar os resíduos. O metabolismo microbiano inclui reações bioquímicas que são parte essencial nos processos celulares e podem consumir ou gerar energia (Figura 1). Quando as rotas metabólicas dos microrganismos são utilizadas para construir material celular, o processo é chamado de *anabólico* e normalmente precisa de energia obtida da oxidação do trifosfato de adenosina (ATP); quando o processo libera energia e é assistido por enzimas degradadoras, é chamado de *catabólico* (ALVAREZ; ILLMAN, 2005). Porém, existem casos onde as bactérias transformam os poluentes sem produzir energia nem biomassa, conhecido como *cometabolismo* (HATZINGER; KELSEY, 2005), o qual acontece quando uma molécula reage com uma enzima que tinha outro propósito original.

Figura 1. Metabolismo básico bacteriano.



Fonte: Adaptado de Kataria e Ruhel (2014).

A biodegradação dos poluentes pode: (1) oxidar completamente as moléculas orgânicas (mineralização), (2) biotransformar os poluentes em compostos de menor tamanho ou (3) reduzir grupos transferindo elétrons aos contaminantes, resultando em um composto não biodisponível ou não tóxico (ROCKNE; REDDY, 2003). Para isso, os organismos utilizam as suas enzimas e a suas rotas metabólicas para obter um dos resultados antes descritos.

Entretanto, as interações que os microrganismos têm com o poluente podem ou não estar ligados ao metabolismo microbiano e, portanto, podem resultar ou não no crescimento da biomassa bacteriana, podendo ou não precisar de células vivas para acontecer.

Quando a degradação dos poluentes depende do metabolismo, os microrganismos degradam os poluentes utilizando enzimas que catalisam as reações bioquímicas. Essas enzimas, que são polímeros de aminoácidos, estão codificadas no material genético das bactérias e definem a habilidade do organismo de realizar determinadas funções (SAMANTARAY; MOHAPATRA; MISHRA, 2014). Por exemplo, na presença de poluentes no meio em concentrações tóxicas, os mecanismos de resistência dos microrganismos são ativados como a produção de proteínas ligantes de metais ou proteínas de estresse metabólico, mecanismos de homeostases, mecanismos de regulação da concentração intracelular do poluente, e a expressão de proteínas transportadoras de poluentes do citoplasma para o interior de vacúolos (VALLS; LORENZO; GONZALEZ-DUARTE, 2000).

A produção de enzimas pode variar de acordo com a demanda e as necessidades do organismo, ou pode ser que sejam produzidas apenas em condições particulares de crescimento, por exemplo, quando existe a presença de poluentes no meio e as bactérias os utilizam como fonte de energia ou nutrientes (ALVAREZ; ILLMAN, 2005; KATARIA; RUHAL, 2014). Todos esses mecanismos são ferramentas ligadas ao metabolismo microbiano e são ativadas em resposta à presença de poluentes no meio permitindo a adaptação e o desenvolvimento mesmo em presença de altas concentrações

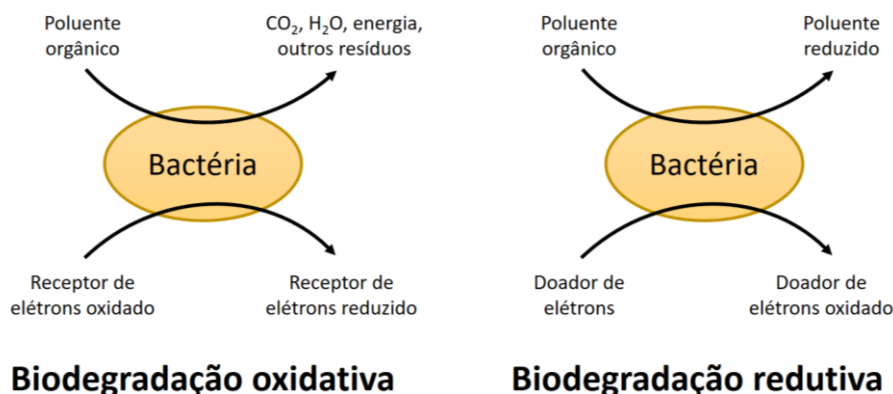
Entretanto, a biomassa da célula, de acordo com a suas características físico-químicas, interage com os poluentes mesmo que as celular não estejam vivas, por meio de mecanismos como a adsorção física e a troca iônica independentemente de que a biomassa esteja ativa ou não (BALTAZAR, 2017).

4.1.1 Poluentes orgânicos

Todas as substâncias orgânicas naturais são biodegradáveis. Porém, dependendo das condições ambientais, esses processos naturais podem ser muito demorados de acontecer. Existem também microrganismos identificados na natureza como capazes de decompor substâncias orgânicas perigosas, incluindo compostos xenobióticos, como os pesticidas, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), os hidrocarbonetos derivados do petróleo e compostos organoclorados como os PCBs (SINHA *et al.*, 2009).

Durante a degradação de poluentes orgânicos, o carbono necessário para o crescimento da biomassa bacteriana vem dos poluentes degradados (ROCKNE; REDDY, 2003). Esse processo é o mais importante na biodegradação bacteriana no ambiente natural (CRAWFORD, 2011). Na oxidação de poluentes orgânicos, os microrganismos oxidam o contaminante transferindo elétrons do contaminante para um receptor de elétrons a fim de ganhar energia, ao passo que reduzem o receptor de elétrons que pode ser oxigênio, nitrato, Fe (III) ou sulfato. Nos processos redutivos de biodegradação, os microrganismos utilizam metabólitos de menor tamanho, como carboidratos simples ou ácidos graxos simples, e transferem os elétrons para o contaminante enquanto ganham energia a partir da oxidação das fontes de carbono (Figura 2) (ROCKNE; REDDY, 2003).

Figura 2. Esquema geral da biodegradação de contaminantes orgânicos.



Fonte: Adaptado de Rockne e Reddy (2003).

Os microrganismos podem decompor os contaminantes utilizando três processos metabólicos: a respiração aeróbica, a respiração anaeróbica e a fermentação (SINHA *et al.*, 2009). No primeiro, é necessário a presença do oxigênio molecular no ambiente para decompor os compostos orgânicos e obter energia do processo. Os processos aeróbios naturais podem decompor materiais orgânicos perigosos em moléculas de CO₂ e água. Porém, a presença do oxigênio em profundidades maiores no solo é limitada, por isso, a degradação biológica aeróbica no solo é limitada com a profundidade (MAJONE *et al.*, 2015). Por outro lado, na ausência de oxigênio, os microrganismos acetogênicos e metanogênicos atuam reduzindo moléculas de grande tamanho para compostos orgânicos simples como acetato e ácidos graxos, através da fermentação, e reduzindo essas moléculas em metano e outros produtos via respiração anaeróbica (SINHA *et al.*, 2009).

A utilização desses processos na degradação do poluente é específico de cada sistema e depende, entre outros fatores, do microrganismo utilizado e o poluente de interesse. Os microrganismos diminuem a concentração do contaminante no ambiente mediante a transformação do composto em outros menos perigosos, transformando-os em compostos de menor tamanho que podem ser utilizados por outros microrganismos heterótrofos (SINHA *et al.*, 2009; FALKIEWICZ-DULIK; JANDA; WYPYCH, 2015).

A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de poluentes orgânicos que podem ser degradados por atividade microbiana e os genera reportados como capazes de essa degradação.

Tabela 1. Poluentes orgânicos e seus respectivos microorganismos degradadores.

Poluente	Gênero	Referência
Tolueno, fenol	<i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i>	(LI; WACKETT, 1992)
HPAs	<i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Rhodococcus</i>	(SUTHERSAN <i>et al.</i> , 2017)
Tolueno, fenol	<i>Burkholderia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i>	(ZHANG <i>et al.</i> , 2013)
Metano, formiato, metanol	<i>Methylosynus</i> , <i>Methylococcus</i> , <i>Methylomicrobium</i>	(ALVAREZ; ILLMAN, 2005)
Amônia	<i>Nitrosomonas</i>	(CHAWLEY; BANERJEE; JAGADEVAN, 2020)
Bifenila	<i>Burkholderia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Comamonas</i>	(MARCON <i>et al.</i> , 2007; REHMANN; DAUGULIS, 2006)
Propano	<i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Rhodococcus</i>	(WANG; CHU, 2017)
Cianeto	<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i>	(ROSARIO, 2017)

4.1.2 Poluentes inorgânicos

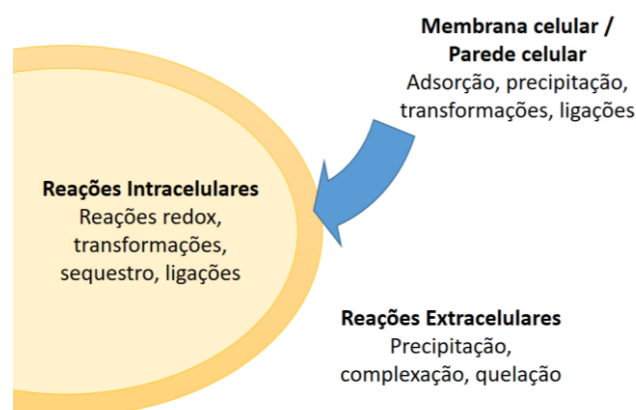
Do mesmo jeito, os microrganismos podem atuar sobre os metais potencialmente tóxicos presentes no ambiente. Alguns metais têm um papel muito importante nos bioprocessos e alguns deles são micronutrientes essenciais, como o cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), sódio (Na), níquel (Ni), zinco (Zn), manganês (Mn) e o cromo (Cr). Porém, outros como o chumbo (Pb) e o mercúrio (Hg) não tem um papel biológico e podem ser tóxicos para as comunidades microbianas (SINHA *et al*, 2009). Assim, a interação dos microrganismos com os metais tem sido estudada para aplicações de detoxificação e recuperação de metais nas indústrias e no ambiente (SCHENBERG, 2010).

Em condições de estresse, os microrganismos ativam mecanismos de resistência que incluem a produção de peptídeos ligantes de metais, a regulação intracelular de metais, ou a expressão de proteínas transportadoras de complexos ligantes que facilitam a tolerância aos metais (BALTAZAR, 2017). Do mesmo jeito, os microrganismos conseguem interagir com os metais de acordo com a características químicas e físicas da sua biomassa, ainda quando as células não forem viáveis.

Os microrganismos utilizam uma variedade de mecanismos para resistir e conseguir se desenvolver na presença de metais potencialmente tóxicos. Os processos que permitem a adsorção e detoxificação microbiana de metais segundo Gadd; White (1993) são divididos de acordo com o local onde ocorre o processo: reações extracelulares, reações intracelulares e as reações que ocorrem na membrana ou parede celular (Figura 3). Essas reações químicas incluem a oxidação ou redução dos metais, a metilização, a redução enzimática, a formação de complexos, a ligação metálica, a quelação e outras reações intra e extracelulares (SINHA *et al*, 2009). Adicionalmente, os microrganismos também causam a detoxificação indireta de metais potencialmente tóxicos mediante reações químicas dos metais com os produtos do metabolismo microbiano. Por exemplo, as bactérias redutoras de sulfato produzem sulfeto (H_2S) e precipitam os metais presentes no meio (POSTGATE, 1979).

Um ou mais mecanismos permitem que as bactérias resistam à presença de metais potencialmente tóxicos no meio e eles podem ou não ser dependentes do metabolismo microbiano. Entre os processos mais importantes de biorremediação de metais estão a bioadsorção, a bioacumulação, a bioimobilização e a solubilização.

Figura 3. Processos de detoxificação microbiana de metais.



Fonte: Adaptado de Gadd e White (1993).

A bioacumulação é o transporte de cátions através da membrana celular ocasionando acúmulo intracelular, um processo dependente do metabolismo (VOLESKY, 2007). A biossorção, por sua vez, pode ser independente do metabolismo e é um processo no qual a biomassa microbiana retém ou remove os metais potencialmente tóxicos do ambiente líquido e permite a recuperação de metais (SCHENBERG, 2010). Com relação ao processo de bioimobilização, o mesmo ocorre quando os íons metálicos são fixados em coloides orgânicos por redução enzimática dos metais (SINHA *et al.*, 2009). Por último, a solubilização dos metais é realizada por bactérias redutoras de metais que, em condições apropriadas podem solubilizar metais oxidados, como é o exemplo das bactérias pertencentes ao gênero *Closteridium* spp (HATZINGER; KELSEY, 2005).

Porém, é importante ressaltar que os microrganismos não podem biodegradar metais potencialmente tóxicos, mas sim mudar o estado de oxidação, fazendo com que o poluente metálico esteja mais ou menos biodisponível, solúvel ou que seja transformado em complexos orgânico-metálicos. Inclusive, em alguns casos, os processos de transformação microbiana e aumento da biodisponibilidade dos metais no solo são utilizados em conjunto com técnicas de fitorremediação com plantas que bioacumulam os metais no tecido vegetal e removem o contaminante do solo (WEISS; COZZARELLI, 2008). A

Tabela 2 apresenta alguns exemplos recentes de microorganismos utilizados no tratamento de metais potencialmente tóxicos.

Tabela 2. Microorganismos utilizados no tratamento de metais potencialmente tóxicos.

Poluentes	Microorganismo	Referência
Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn	Bactérias redutoras de sulfato incluindo <i>Desulfovibrio spp.</i>	(KIRAN; PAKSHIRAJAN; DAS, 2017)
Cr(VI), As (II)	<i>Bacillus firmus TE7</i>	(BACHATE <i>et al.</i> , 2013)
Fe, Zn, Pb	<i>Candida sphaerica UCP0995</i>	(SANTOS <i>et al.</i> , 2017)
Pb, Cd	<i>Staphylococcus hominis AMB-2</i>	(RAHMAN, 2020)
Cd, Cu, Pb, Zn, Nd, Yb	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(OJIMA <i>et al.</i> , 2019)
Cr, Cu, Pb	<i>Aspergillus lentulus FJ172995</i>	(MISHRA; MALIK, 2012)
Pb, Zn, Cd	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) depois de expressão do gene metalothionein	(JAFARIAN; GHAFFARI, 2017)
Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	<i>Aspergillus fumigatus</i>	(DEY <i>et al.</i> , 2016)
As, U	<i>Micrococcus sp.</i>	(BHAKAT; CHAKRABORTY; ISLAM, 2019)

4.2 Técnicas de identificação de microrganismos

Para que os poluentes possam ser biodegradáveis, eles devem ser o suficientemente similares com compostos que estão naturalmente presentes na natureza e

assim, poder substituir substratos nas reações enzimáticas (CRAWFORD, 2011). Além disso, é sabido que as reações de biodegradação dos poluentes acontecem devido à atividade enzimática microbiana. Essas rotas metabólicas têm sido estudadas desde diferentes pontos de vista na ciência incluindo a enzimologia, a química analítica, genômica e proteômica em estudos que podem utilizar microrganismos individuais e isolados ou complexos consórcios que incluem várias espécies diferentes de microrganismos. Por isso, identificar e entender as espécies envolvidas, e sobretudo, os genes que expressam as enzimas de interesse é uma parte muito importante da biodegradação de contaminantes.

A identificação de microrganismos individualmente isolados (ou por técnicas *culture-based*) pode ser realizada com a técnica da amplificação do gene 16s que é a mais comum entre a comunidade científica. A técnica é baseada no sequenciamento do gene 16S rDNA da bactéria e a comparação das sequências obtidas é realizada em grandes bases de dados, o qual é altamente conservado entre organismos vivos do mesmo gênero e espécie e permite a identificação segura de organismos isolados (BALTAZAR, 2017). Para tanto, é necessária a utilização da técnica de PCR (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*) e do sequenciamento automatizado do DNA para conseguir o sequenciamento do gene 16s rDNA de bactérias.

A comparação das sequências obtidas demonstrou que elas são conservadas entre organismos da mesma espécie, permitindo a identificação de espécies bacterianas. Contudo, novas técnicas de identificação de microrganismos são necessárias a fim de agilizar os resultados. Nesse contexto, a espectrometria de massa (EM) é uma ferramenta utilizada para obter espectros de proteínas, os quais são característicos de cada espécie, mediante a utilização de espectrômetros do tipo MALDI-ToF (KAROLSKI *et al.*, 2018). A técnica baseada na EM, utiliza um processo de ionização por dessorção de laser assistida por um ácido orgânico o qual facilita a ionização da amostra. A metodologia baseia-se na obtenção do perfil das proteínas e a comparação deste com todos aqueles registrados no projeto BioTyper 2.0. Aliás, a técnica de MALDI-ToF pode ser utilizada para identificar perfis proteômicos e reconhecer as enzimas envolvidas na degradação de contaminantes e a adaptação nas situações de estresse.

Porém, nem todos os microrganismos presentes no ambiente são cultiváveis e muitas vezes, consórcios bacterianos, que incluem uma variedade de espécies, apresentam melhores resultados de biodegradação que a utilização de organismos

individuais. Nesse sentido, a metagenômica estuda os genes expressados numa fonte ambiental de material genético (CRAWFORD, 2011) e ajuda a identificação dos genes responsáveis da degradação dos poluentes sem precisar do cultivo de cepas bacterianas individuais, mas precisando de complexas ferramentas de bioinformática (RAYU; KARPOUZAS; SINGH, 2012). Além disso, a metagenômica oferece a oportunidade de identificar genes e enzimas cruciais nas estratégias de biodegradação incorporando a perspectiva da engenharia enzimática. Estudando as sequências de genes produzidas nos ambientes poluídos, podem ser identificados as características que permitem a adaptação dos microrganismos presentes ao meio poluído (WEISS; COZZARELLI, 2008).

Na biodegradação de áreas contaminadas, especialmente quando forem utilizadas técnicas *in situ*, é preciso que os processos utilizem a microbiota nativa já que a introdução de espécies é restrita e pode alterar os ecossistemas microscópicos naturais. Por isso, é necessário conhecer o potencial inerente das espécies nativas no lugar a ser remediado, a suas formas de interação química e bioquímica com o contaminante e os genes e enzimas envolvidas nesses processos.

5 FATORES QUE INFLUENCIAM A EFICIÊNCIA DA BIORREMEDIAÇÃO

A ocorrência da biodegradação de poluentes depende amplamente das condições ambientais do local, das características do poluente e das condições internas do processo. Assim, mesmo se um microrganismo é capaz de degradar o poluente presente no solo, a biodegradação do mesmo pode não ocorrer devido às características do meio incluindo a permeabilidade, a presença ou ausência de nutrientes e oxigênio, o pH, etc. Por isso, as características do sítio contaminado e o conhecimento disponível sobre os fatores que influenciam na eficiência do bioprocessos determinarão a taxa de remoção final do contaminante e a eficácia do método aplicado (HATZINGER; KELSEY, 2005).

Entre os parâmetros que afetam a biorremediação de poluentes encontram-se as características do solo, do poluente e dos agentes degradadores. Neste trabalho, são descritos a seguir a influência das características do poluente, a características da biota nativa e a características do ambiente incluindo biodisponibilidade, presença de nutrientes, temperatura, pH e toxicidade.

5.1 Características do poluente

Como detalhado anteriormente, os microrganismos possuem diferentes rotas metabólicas de interação com poluentes orgânicos e inorgânicos. Portanto, o principal fator que influencia na eficiência da biorremediação é precisamente, o poluente a ser tratado. Por exemplo, os compostos que contêm lignina, como a madeira, levam muito tempo para serem degradados devido à complexidade das moléculas de lignina (SINHA *et al.*, 2009), sendo estas polímeros e não monômeros os quais seriam aproveitados com maior facilidade por os microrganismos.

Entre as características do composto, alguns parâmetros importantes para entender a eficiência e velocidade de degradação dos poluentes são o peso molecular, o tipo, número de átomos, a presença ou ausência de substitutos moleculares, o tipo de ligações presentes na molécula e a ramificação do composto (HATZINGER; KELSEY, 2005). Essas características determinarão a rapidez com que os compostos serão degradados pelos microrganismos ou se serão poluentes persistentes. Por exemplo, muitos pesticidas são compostos muito estáveis e resistentes aos ataques microbianos, como o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), por exemplo. Esses pesticidas têm sido proibidos na maioria de países devido aos efeitos ao longo prazo da sua utilização. Da mesma forma, as

moléculas com um peso molecular maior ou que apresentam baixa solubilidade em água, podem ser mais difíceis de degradar porque essas características dificultam o ingresso ao espaço celular. Alguns exemplos de poluentes orgânicos e inorgânicos foram listados nas tabelas 1 e 2.

5.2 Características da biota nativa

Por outro lado, as características dos microrganismos a serem protagonistas do processo de degradação determinam as rotas metabólicas que serão utilizadas e portanto, os mecanismos químicos de biodegradação do poluente. A expressão dos genes e as proteínas específicas em situações de estresse podem diferenciar um processo do outro inclusive quando ambos estivessem tratando o mesmo poluente. Por isso, o estudo dos genes envolvidos na biodegradação de contaminantes e as proteínas responsáveis da degradação bacteriana tem sido realizado em profundidade pela comunidade científica atualmente.

Nesse aspecto, é importante consultar a literatura para conhecer os estudos previamente realizados que identifiquem os microrganismos capazes de degradar o poluente de interesse do projeto e as suas rotas metabólicas. Por exemplo, as bactérias *Pseudomonas spp* têm sido reportadas como degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo mediante oxidação aeróbica. Por outro lado, as bactérias do gênero *Bukholderia* têm sido reportadas de utilizar uma rota de decloração redutiva para a degradação de PCBs altamente clorados (ROCKNE; REDDY, 2003). Do mesmo jeito, estão mais ou menos reportados na literatura as espécies capazes de degradar os poluentes mais comuns e as suas rotas metabólicas têm sido estudadas pela comunidade científica no mundo. Um resumo de estudos prévios em identificação de microrganismos degradadores é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Microrganismos biodegradadores de poluentes reportados na literatura

Microrganismo	Poluente	Descrição	Referência
<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlamydomonas spp</i> , <i>Arthrobacteres</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Arsênico (As), Cromo (Cr), Mercúrio (Hg), Uranio (U), Selênio (Se)	Redução microbiana de metais. Detoxificação microbiana por redução.	(RAMASAMY <i>et al.</i> , 2006)
<i>Geobacter spp.</i>	Uranio (U)	Precipitação intracelular de urânio. Encontrou-se que os microrganismos foram capazes de remover o urânio das águas subterrâneas.	(ANDERSON <i>et al.</i> , 2003)
<i>P. chrysosporidium</i>	Plásticos PEBD	Os microrganismos conseguiram degradar sacolas plásticas que contêm 12% de amido.	(SINHA <i>et al.</i> , 2009)
<i>Candida tropicalis</i>	Tintas têxteis	A biomassa isolada de esgoto foi utilizada na biosorção de tintas têxteis incluindo cores azuis, vermelhos e pretos.	(DONMEZ <i>et al.</i> , 2002)
<i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Mycobacterium</i>	PAHs	Bactérias reportadas capazes de degradar PAHs e utilizá-lo como única fonte de carbono e energia.	(SURTHERLAND <i>et al.</i> , 1992)
<i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Bacillus pumilus</i>	Cianeto	Degradação de cianeto em amônia e dióxido de carbono através da enzima cianeto desidrogenase	(BAXTER; CUMMINGS, 2006)
<i>Phodococcus erythropolis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Hidrocarbonetos de petróleo	Bactérias reportadas como capazes de degradar poluentes de hidrocarbonetos.	(ROLLING <i>et al.</i> , 2004; STELIGA, 2012)

5.3 Características do ambiente

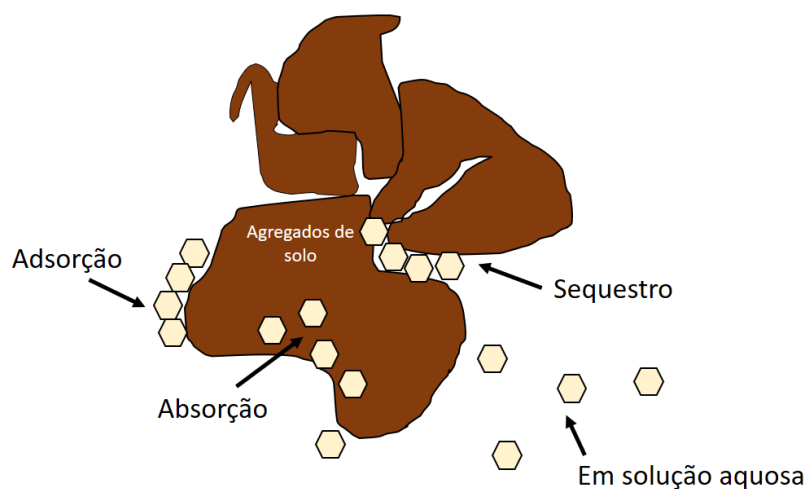
Do mesmo modo, as características do ambiente onde é realizado a remediação afeta diretamente aos resultados do processo. A não ser que os contaminantes estejam acessíveis aos microrganismos e que as condições ambientais permitam a biotransformação de poluentes, os contaminantes não serão degradados. Esses parâmetros precisam ser controlados durante os processos de tratamento e geralmente são determinados em testes de microcosmos em escala laboratorial (ROCKNE; REDDY, 2003).

5.3.1 Biodisponibilidade

Os poluentes no solo não serão biodegradados se não estiverem disponíveis biologicamente para os microrganismos (HATZINGER; KELSEY, 2005). Os poluentes podem estar presos no espaço poroso ou adsorvidos na superfície das partículas do solo e, nesses casos, apenas uma parte do contaminante está em fase aquosa (Figura 4).

Como os poluentes devem, em sua maioria, estar na fase aquosa para entrar no espaço celular, a adsorção dos poluentes às partículas do solo dificulta a biodegradação do mesmo (CRAWFORD, 2011). Por exemplo, os metais apresentam regularmente uma baixa biodisponibilidade na matriz solo. Porém, essa biodisponibilidade aumenta em condições de pH ácido porque os metais são mais solúveis nessas condições (SINHA *et al.*, 2009). No entanto, os microrganismos também podem mudar o estado de oxidação dos metais fazendo que estes fiquem disponíveis na fase aquosa do solo. Nesses casos, o usual é complementar o tratamento com a estratégia da fitorremediação para que as plantas tenham o trabalho de adsorver os poluentes pelas raízes (RAYU; KARPOUZAS; SINGH, 2012). A biodisponibilidade também é influenciada pelo conteúdo de matéria orgânica e argila no solo. As argilas, com uma grande capacidade de troca de cátions reduzem a biodisponibilidade de metais e reduzem a toxicidades destes no solo (SINHA *et al.*, 2009).

Figura 4. Representação da possível distribuição do poluente no ambiente do solo.



Fonte: Adaptado de Hatzinger e Kelsey (2005).

5.3.2 Presença de nutrientes

Os microrganismos heterótrofos precisam de micro e macronutrientes, uma fonte de energia, e um doador e receptor de elétrons para abastecer os seus processos bioquímicos. Os contaminantes podem atuar comumente como fonte de carbono, mas todos os outros requerimentos da biodegradação devem ser atendidos para a eficácia do processo (HATZINGER; KELSEY, 2005). Durante a biorremediação de áreas contaminadas, a adição de nitrogênio (N), fósforo (P) e outros nutrientes limitantes podem estimular o crescimento de microrganismos nativos e agregados. Uma adição apropriada de nutrientes como vitaminas, Mg, Mn, Cu, enxofre (S), potássio (K) e fósforo (P) permite o desenvolvimento dos microrganismos para a degradação dos poluentes (SINHA *et al.*, 2009).

5.3.3 Temperatura

O crescimento microbiano é muito dependente da temperatura. Portanto, a temperatura do solo na biodegradação de áreas contaminadas é um fator decisivo no controle da velocidade de degradação dos poluentes. A maioria dos microrganismos são mesófilos, ou seja, preferem uma temperatura entre 25 e 35 °C e podem sobreviver em temperaturas entre os 15 e 45 °C (FALKIEWICZ-DULIK; JANDA; WYPYCH, 2015).

Porém, isso não indica que a degradação biológica dos poluentes não possa acontecer em valores diferentes de temperatura, mas sim que com frequência, a temperatura ótima do processo será nesse intervalo. Inclusive, nos tratamentos *ex situ*, em que os parâmetros de temperatura podem ser melhor controlados, tem sido reportado a utilização de microrganismos termófilos, devido a sua grande capacidade de degradar poluentes rapidamente em temperaturas acima de 35 °C (HATZINGER; KELSEY, 2005).

5.3.4 pH

Os processos de biodegradação são conduzidos por enzimas que dirigem as reações bioquímicas bacterianas. A atividade enzimática é susceptível ao nível de pH, inclusive quando os microrganismos são resistentes e podem se desenvolver em ambientes alcalinos ou básicos (LIMA *et al.*, 2007). O pH ótimo para a maioria de processos biológicos é o neutro, embora existam reações bioquímicas em organismos acidófilos que precisem de valores mais baixos de pH. Exceto para o caso dos extremófilos, valores extremos de pH podem desnaturizar as enzimas necessárias para a degradação dos poluentes e degradar outros componentes celulares (HATZINGER; KELSEY, 2005). Por isso, os processos de biodegradação normalmente ocorrem com maior velocidade em ambientes neutros e tendem a ser inibidos em ambientes alcalinos ou ácidos.

Do mesmo modo, o pH também influencia na biodisponibilidade dos metais e outros poluentes no solo. Portanto, para promover a biodegradação bacteriana é necessário medir e controlar o pH do solo ou do ambiente a ser tratado de forma que se ajuste ao pH ótimo do processo de biodegradação do contaminante (JØRGENSEN, 2008).

5.3.5 Toxicidade

A rotas metabólicas microbianas podem ser afetadas pela presença de outros poluentes tóxicos no solo. Inclusive, é muito comum que os contaminantes não sejam encontrados isolados no ambiente, e sim, em misturas de diferentes poluentes. Por exemplo, alguns solos contaminados por hidrocarbonetos têm apresentado concentrações de chumbo (Pb) e outros metais potencialmente tóxicos que inibem a atividade microbiana e não permite o correto desenvolvimento dos microrganismos

(HATZINGER; KELSEY, 2005). Além disso, podem estar presentes no ambiente compostos que interagem com a célula de forma similar aos contaminantes, ocasionando a redução da velocidade de biodegradação ou a inibição das rotas metabólicas. Por exemplo, alguns microrganismos têm sido reportados como degradadores de cianeto (CN), porém, na mineração de ouro e prata os resíduos que contêm cianeto estão frequentemente associados a metais como o arsênico ou o mercúrio que são tóxicos para esses microrganismos (GUIMARAES *et al.*, 2011). Por outro lado, existem casos em que a presença de alguns componentes pode favorecer a degradação microbiana como a adição de bifenil aos solos para a degradação de PCBs pouco clorados (HATZINGER; KELSEY, 2005).

6 APLICAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO NA GESTÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS

A biorremediação na gestão de áreas contaminadas aparece como um método ecoamigável que utiliza as reações bioquímicas do metabolismo microbiano para a remediação de poluentes no ambiente. A utilização de microrganismos para remediação de sítios contaminados e detoxificação de contaminantes é uma tecnologia que vem sendo aplicada cada vez mais na transformação a ambientes mais sustentáveis. As tecnologias de biorremediação podem ser agrupadas em técnicas aplicadas no local, conhecidas como *in situ*, e em técnicas que retiram o meio contaminado e o tratam fora do local, conhecidas como *ex situ*.

6.1 Técnicas de biorremediação *in situ*

As técnicas de remediação *in situ* são realizadas no local da contaminação principalmente para tratamento do solo e a água subterrânea (U. S. EPA, 2006). Na maioria dos casos, a tecnologia consiste em adicionar oxigênio e nutrientes ao solo para promover o crescimento de microrganismos nativos que degradem os contaminantes.

6.1.1 Atenuação natural ou remediação passiva

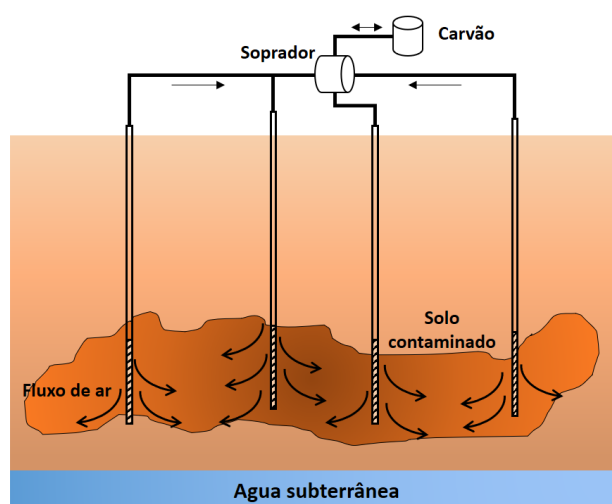
É a degradação natural dos contaminantes que ocorre devido à atividade dos microrganismos nativos sem adições de nutrientes ou similares (KUMAR; SHAHI; SINGH, 2018). O processo depende por completo da atividade metabólica dos microrganismos nativos e da sua capacidade de transformar os contaminantes perigosos sem a utilização de passos artificiais adicionais (RAYU; KARPOUZAS; SINGH, 2012).

Para que a atenuação natural seja um sucesso, quatro requisitos são necessários: (1) uma adequada população de microrganismos capazes de degradar os contaminantes presentes, (2) a disponibilidade natural de nutrientes no solo, (3) condições ambientais idôneas e (4) tempo adequado para que os microrganismos possam degradar os contaminantes de forma natural (KUMAR; SHAHI; SINGH, 2018). Durante esse processo, os poluentes são monitorados para acompanhamento da atividade microbiana e atenuação dos contaminantes de forma biológica e não biológica (U. S. EPA, 2006).

6.1.2 Bioventilação

A bioventilação é uma técnica de remediação *in situ* que consiste na adição de oxigênio ao solo para promover as rotas metabólicas aeróbicas de degradação dos contaminantes (U. S. EPA, 2006). A degradação dos poluentes é realizada por microrganismos nativos presentes na zona não saturada do sítio contaminado. Normalmente, são degradados compostos orgânicos como os compostos orgânicos voláteis (COV) e os derivados do petróleo situados nas zonas não saturadas. A bioventilação fornece o fluxo de ar necessário para o desenvolvimento da atividade microbiana sem promover a volatilização dos contaminantes (Figura 5). É uma técnica que normalmente funciona melhor em solos com uma temperatura do ar elevada e com o nível freático mais distante da superfície (KUMAR; SHAHI; SINGH, 2018).

Figura 5. Diagrama esquemático de um tratamento por bioventilação



Fonte: Adaptado de Kumar, Shahi e Singh (2018).

6.1.3 Bioestimulação

A bioestimulação refere-se à adição de nutrientes, doadores de elétrons ou receptores de elétrons ao sítio contaminado com a intenção de estimular o crescimento microbiano e a atividade metabólica dos microrganismos nativos (SINHA *et al.*, 2009). As adições ao solo podem ser líquidas ou gasosas e injetadas mediante poços superficiais ou profundos. Adicionalmente, mediante a injeção em poços, podem ser controlados outros parâmetros como o pH, o potencial redox, a temperatura, a umidade, a presença de

nutrientes, entre outros, a fim de melhorar a performance de degradação dos microrganismos nativos (KUMAR; SHAHI; SINGH, 2018; MADSEN, 1991).

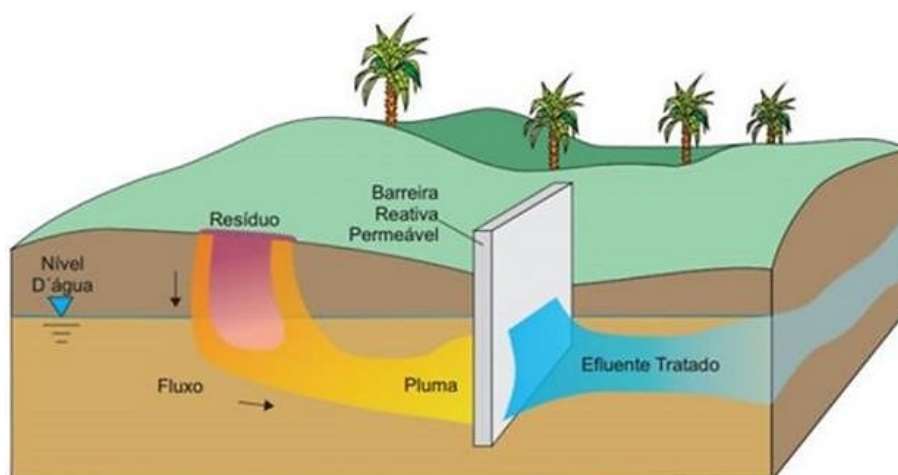
6.1.4 Bioaugmentação

Na bioaugmentação procura-se melhorar a capacidade de biodegradação dos poluentes no solo mediante o inóculo de microrganismos em forma de cepas nativas ou geneticamente alteradas ou em consórcios bacterianos que possuam as capacidades metabólicas para a detoxificação do sítio contaminado. Pode-se assumir que a bioaugmentação é sempre executada junto à bioestimulação. Neste caso, muitas vezes é utilizado um inóculo com um consórcio bacteriano capaz de realizar diferentes reações químicas para a degradação de um mesmo contaminante (U. S. EPA, 2006). O principal benefício deste processo é que pode ser selecionado e inoculado microrganismos específicos para a degradação dos poluentes críticos identificados na área (KUMAR; SHAHI; SINGH, 2018).

6.1.5 Barreiras reativas permeáveis

As barreiras reativas permeáveis (*Permeable Reactor Barriers*, PRB, em inglês) são uma zona de remediação ativa construída numa área contaminada (Figura 6). Estas barreiras são construídas para acolher reações bioquímicas aeróbicas ou anaeróbicas dependendo das necessidades do sítio contaminado. Para a construção, realiza-se uma escavação que será recheada com areia previamente misturada com materiais que contenham os nutrientes para formar uma zona de biorremediação (U. S. EPA, 2006). Logo, o material da barreira pode ser renovado, trocado ou removido conforme a necessidade do plano de remediação. Comumente, é utilizado material residual, como fonte de carbono incluindo adubo orgânico, biosólidos ou palha que reduzem os custos da tecnologia. Assim, as PRBs são desenhadas de forma que o fluxo da água subterrânea atravesse a barreira estimulando o crescimento de microrganismos nativos para a biorremediação.

Figura 6. Esquema de Barreiras Reativas Permeáveis (PRB).



Fonte: Adaptado de U. S. EPA (1998).

6.2 Técnicas de biorremediação *ex situ*

As tecnologias *ex situ* são aquelas que precisam do traslado do material contaminado, seja solo, sedimento, lama ou água, para uma instalação que permita o tratamento de contaminantes. Geralmente, a técnica utilizada depende do conteúdo de umidade do solo e da necessidade de separar a fase líquida da fase sólida do solo (KUMAR; SHAHI; SINGH, 2018).

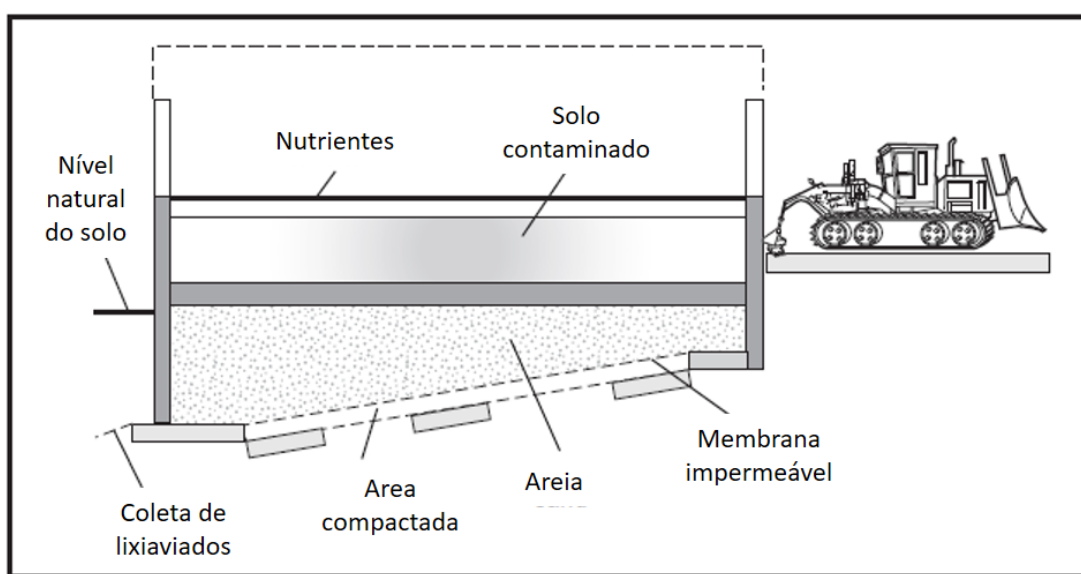
6.2.1 Land farming

Land farming é o processo que envolve a extensão do solo contaminado num campo a céu aberto, por vezes, distribuído em camadas de tratamento. É utilizado um maquinário, geralmente de construção, para distribuir o solo no espaço. Durante o processo, o solo contaminado é removido e são formadas pilhas, as quais são regularmente molhadas e oxigenadas para favorecer os processos metabólicos das bactérias (ROCKNE; REDDY, 2003). Adicionalmente, podem se agregar nutrientes, água ou microrganismos que acelerem o processo de biodegradação do contaminante.

A técnica do *land farming* é conveniente quando são tratados contaminantes não voláteis e que são facilmente degradados por rotas metabólicas aeróbicas (U. S. EPA, 2006). Entretanto, os espaços onde se realiza o *land farming* devem possuir a infraestrutura necessária para atender à legislação, incluindo a impermeabilização do

terreno através da utilização de capas de argila ou concreto para diminuir a erosão, controlar os lixiviados e o escoamento superficial (SINHA *et al.*, 2009). A técnica tem se mostrado como uma tecnologia viável no tratamento de contaminantes derivados do petróleo de forma eficaz e econômica (U. S. EPA, 2006), porém apresenta alguns desafios como a ocupação de grandes espaços para tratamento, a necessidade de maquinário pesado para sua execução e o tempo necessário para atingir os resultados desejados (CHIKERE; TEKERE; ADELEKE, 2019).

Figura 7. Tratamento de solos contaminados com *Land farming*.



Fonte: Adaptado de U. S. EPA (2006).

6.2.2 Biorreatores

Os reatores de lodo ou aquáticos são reatores utilizados para o tratamento da água e do solo *ex situ*. Os biorreatores envolvem o bombeamento e tratamento (P&T) da água subterrânea para ser tratada num sistema desenhado da engenharia. Do mesmo modo acontece como os lodos, os quais criam três fases durante o tratamento, as fases sólida, líquida e gasosa. Assim, as taxas de degradação são elevadas e promovidas para remoção de contaminantes devido a que os reatores operam em condições favoráveis para que os poluentes estejam mais biodisponíveis para os microrganismos e assim, estes possam os tratar (DAS; DASH, 2014).

7 CASOS DE APLICAÇÃO E SUCESSO

Casos de aplicação de técnicas de biodegradação na remediação de áreas contaminadas estão documentados em vários países. Porém, as soluções biológicas na gestão de áreas contaminadas são soluções que devem ser desenhadas e estudadas caso a caso devido à grande variabilidade e aos diferentes resultados que podem ser obtidos considerando os fatores que afetam os sistemas biológicos. Mesmo assim, a biodegradação de poluentes para a recuperação de sítios contaminados é uma alternativa de baixo custo de instalação e que gera resultados eficazes, porém as vezes a longo prazo.

Na cidade de Salem em New Hampshire, UK, uma planta de tratamento de esgoto mostrou indícios de contaminação do solo e água subterrânea no ano de 1987. A contaminação era por solventes clorados e o risco era o potencial impacto às águas subterrâneas que abasteciam a cidade. Assim, o prefeito solicitou a remediação da área de 2 a 3ha implementando um sistema de biorremediação com injeção de fermento e lactose para a destruição anaeróbica dos solventes clorados da água. O custo da descontaminação da área utilizando a técnica de bioestimulação foi de US\$ 300 000, eximindo a prefeitura de um investimento estimado em US\$ 2 milhões para utilização de tratamentos convencionais (SCHAFFNER, 2004).

Plantas piloto desenvolvidas pela Shell Research Ltd e Budelco BV na França, usaram um consórcio de bactérias redutoras de sulfato (SRB) para remover com sucesso zinco e sulfato. Além disso, o ácido acético produzido pelas SRB foi removido por bactérias metanogênicas presentes no consórcio. A tecnologia piloto foi escalada para tratar 7000 metros cúbicos de solo contaminado por dia (BRUSCHI E GOULHEN, 2006).

Durante aproximadamente 30 anos, uma companhia de preservação da madeira chamada Brown Wood em Live Oak, Flórida, utilizou creosoto em seus processos. Os efluentes da produção eram jogados numa lagoa. Assim, a água e o solo em torno da lagoa (incluindo sedimentos de areia e argila) foram contaminados com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) que estavam presentes no creosoto. O sistema de tratamento tinha como objetivo reduzir a concentração de seis HPAs de aproximadamente 208 mg/kg para 100 mg/kg. A técnica de remediação escolhida foi o *land farming*. O tratamento incluía uma camada de impermeabilização com argila e um sistema de escoamento superficial. Um sistema de irrigação encarregou-se de manter as condições de umidade perto de 10% durante o processo. As pilhas de solo eram viradas a cada duas

semanas. Entre janeiro de 1989 e julho de 1990, foram tratados 8100 metros cúbicos de solo em três lotes, reduzindo a concentração de HPAs para valores entre 23 e 92 mg/kg no solo. O custo total do programa de remediação foi de \$565 400, aproximadamente \$70 por metro cúbico de solo tratado (ROCKNE; REDDY, 2003).

Poços severamente contaminados com derivados de petróleo (TPH) em concentrações de até 170 000 mg/kg e compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) em concentrações de até 95,5 mg/kg foram recuperados durante um período de 3 anos em 3 fases: remediação inicial, biorremediação básica e inoculação com um biopreparado. No lugar, 14 microrganismos não patogênicos nativos foram identificados. As bactérias eram pertencentes à espécie *Actinomycetales*. Os organismos conseguiram degradar 75% de C9-C20, 51% de C21-C36, 36% de BTEX e o 20% dos PAHs. Porém, ensaios de toxicidade foram realizados, mas não mostraram uma relação com a redução de poluentes no solo, possivelmente devido à formação de metabolitos tóxicos durante a biorremediação (STELIGA; JAKUBOWICZ; KAPUSTA, 2012).

O cianeto é um composto químico altamente tóxico muito utilizado nas indústrias de mineração de ouro e processamento de peças metálicas. Além disso, o cianeto é produzido naturalmente por algumas plantas. Existem microrganismos adaptados a uma respiração celular resistente ao cianeto, os quais podem reduzir o composto utilizando-o como fonte de nitrogênio. Nesse sentido, bactérias nativas presentes em rejeitos de mineração foram isoladas e testadas na sua capacidade para degradar cianeto. Os microrganismos foram adaptados para condições alcalinas e foram identificados através da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF como pertencentes às espécies de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus licheniformis*. As cepas isoladas conseguiram degradar a totalidade do cianeto em condições experimentais de laboratório demonstrando o seu uso potencial na remediação de cianeto em resíduos e áreas contaminadas por atividades de mineração (ROSARIO, 2017).

8 POTENCIALIDADES E DESAFIOS FUTUROS

Existem inúmeras vantagens e desvantagens relacionadas ao uso de microrganismos na remediação de sítios contaminados, os pontos mais importantes estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4. Vantagens e desvantagens da biodegradação na gestão de áreas contaminadas.

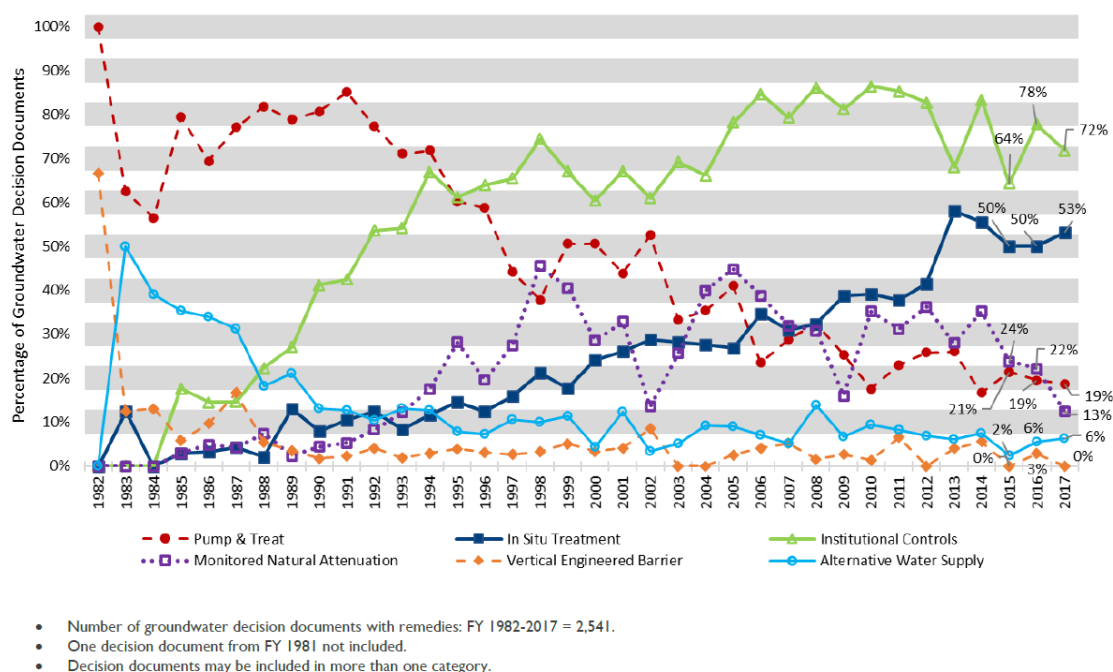
Vantagens	Desvantagens
Utiliza a habilidade natural dos microrganismos para degradar os poluentes.	O processo é lento. Normalmente precisa de um tempo maior quando comparado a outras tecnologias de tratamento.
É uma tecnologia economicamente mais vantajosa que outras tecnologias convencionais.	Não é aplicável para qualquer concentração de contaminante no solo.
Normalmente, não necessita de outros tratamentos posteriores.	Quando aplicada <i>in situ</i> , é necessário que o solo seja muito permeável.
Podem ser aplicadas <i>in situ</i> e costumam ter custos de instalação menores que as tecnologias convencionais.	A performance ambiental do tratamento é difícil de monitorar e sua medição pode significar um alto custo devido ao tempo que precisa ser realizado.
Aceitação pública e legal.	Em alguns casos, os poluentes podem ser degradados em compostos ainda mais tóxicos, os quais podem contaminar as águas subterrâneas se não forem controlados.

Fonte: Adaptado de Kumar, Shahi e Singh (2018).

Um análise realizada por Majone et al. (2015) sobre a biorremediação *in situ* de águas subterrâneas e sedimentos na Europa evidenciou que as tecnologias de bioprocessos estão em crescimento e são uma alternativa promissora na gestão de sítios contaminados. Porém, os autores também afirmaram que a biotecnologia precisa de um entendimento amplo da geoquímica, hidrologia, microbiologia e ecologia dos sítios contaminados e que, por isso, o seu potencial ainda é parcialmente explorado.

Por outro lado, nos Estados Unidos, o relatório bianual de remediação de águas subterrâneas mostrou que durante muito tempo as tecnologias de remediação *ex situ* de *pump and treat* (P&T) foram as mais utilizadas nos EUA (EPA, 2020). Entre os anos 1982 e 2005, aproximadamente 80% dos projetos aplicavam a estratégia de P&T de remediação. No entanto, de 1997 até 2017, a tendência é o crescimento na utilização de técnicas de remediação *in situ* como mostrado na Figura 8.

Figura 8. Tendências na distribuição de tecnologias de tratamento de águas subterrâneas aplicadas em sítios contaminados nos EUA (1982-2017).



Fonte: EPA, (2020).

Dentro das tecnologias *in situ* utilizadas, a biorremediação tem superado as técnicas químicas e térmicas nos tratamentos selecionados entre os anos 2015 e 2017 (Tabela 5).

Alguns dos motivos que favorecem a utilização de técnicas de biorremediação de sítios contaminados e, especialmente, as técnicas de remediação *in situ*, é que elas consomem menos energia e causam menores perturbações no local a ser tratado. Além disso, a injeção de substâncias químicas no solo é normalmente regulada e limitada, estimulando o uso de biotecnologias baseadas em organismos nativos do sítio contaminado.

Tabela 5. Técnicas de remediação de águas subterrâneas reportadas em documentos de tomada de decisão (Ano 2015-2017).

Técnica de Remediação	Número de Documentos de Decisão (2015-2017)	Porcentagem
Remediação Ex Situ (P&T)	22	20%
Remediação In Situ	56	51%
Biorremediação	30	27%
Tratamento químico	26	24%
Tratamento térmico	6	5%
Barreiras reativas permeáveis	5	5%
Extração multi-fase	4	4%
Injeção de ar	3	3%
Estabilização/solidificação	2	2%
Eletrocinética	1	1%
Flushing	1	1%
Fitorremediação	1	1%
Extração de vapor	1	1%
Não especificado	3	3%
Atenuação Natural Monitorada	22	20%
Contenção	1	1%
Controles institucionais	78	71%
Fonte alternativa de água	5	5%

Fonte: (EPA, 2020)

Entre os desafios futuros dos bioprocessos na gestão de sítios contaminados estão a preocupação geral na falta de efetividade das técnicas biológicas e os seus possíveis efeitos secundários como a acumulação de patógenos ou metabólitos tóxicos (MAJONE *et al.*, 2015). Os microrganismos não degradam os metais e existe o risco desses metais

serem liberados novamente no ambiente após a morte dos microrganismos (SINHA *et al.*, 2009).

Em geral, as técnicas *in situ* são mais específicas do local e precisam de um entendimento profundo dos processos geológicos, químicos e biológicos da metodologia. Por isso, alguns pesquisadores (KUMAR; SHAHI; SINGH, 2018) ressaltam a importância da pesquisa prévia à aplicação em campo para o entendimento das rotas metabólicas, a bioquímica e genética do processo e a ecologia microbiana de cada sítio contaminado, antes e durante a aplicação de técnicas de biorremediação.

Por esses motivos, nos últimos anos, várias novas tecnologias têm se dedicado a superar os desafios da aplicação das biotecnologias no tratamento de sítios contaminados. Essas estratégias procuram melhorar a eficiência e a velocidade de biorremediação incluindo, por exemplo, estratégias de engenharia genética. A adaptação de microrganismos em ambientes contaminados pode ser um processo lento, por isso, pesquisas que prometem melhorar esse parâmetro estão sendo amplamente realizadas. Entre elas, ressalta-se a aplicação da metagenômica no entendimento dos genes responsáveis da síntese de enzimas que realizam a degradação de poluentes. Além disso, as técnicas de metagenômica podem ser utilizadas na produção a escala industrial de enzimas para o desenvolvimento de tecnologias de tratamento enzimático (WEISS; COZZARELLI, 2008). Por outro lado, as técnicas de bioinformática e de clonagem e expressão de genes, por exemplo, ainda precisam se desenvolver na área ambiental para poder contribuir à sua aplicação na gestão de sítios contaminados (RAYU; KARPOUZAS; SINGH, 2012).

Outra estratégia para o desenvolvimento das técnicas de biorremediação é a combinação das análises das rotas metabólicas com as técnicas biológicas de melhoramento genético introduzindo a utilização de organismos geneticamente modificados (OGM) (KUMAR; SHAHI; SINGH, 2018). Assim, as características fisiológicas e metabólicas dos microrganismos poderiam ser modificadas ou selecionadas para desenhar rotas metabólicas que catalisem efetivamente a degradação de poluentes. Porém, o uso dessas tecnologias ainda precisa ser muito estudado antes da aplicação à escala de campo no ambiente. A utilização de organismos geneticamente modificados ainda representa um risco de transferência de genes horizontalmente e de proliferação não controlada dos OGM (RAYU; KARPOUZAS; SINGH, 2012).

Outros autores (RAYU; KARPOUZAS; SINGH, 2012; SINHA *et al.*, 2009) indicam o potencial de adicionar técnicas de fitorremediação para melhorar a performance das técnicas baseadas apenas no metabolismo bacteriano. As plantas podem acumular e imobilizar no tecido vegetal contaminantes persistentes presentes no solo. Assim, as técnicas de fitorremediação podem ser utilizadas como o passo final em conjunto com técnicas baseadas no metabolismo microbiano em processos conhecidos como “fitorremediação assistida por microrganismos”.

Em geral, a maioria de projetos de remediação de sítios contaminados inclui diversas estratégias para atingir a degradação de poluentes no solo. Isso demonstra que não existe uma única solução ao problema e que as estratégias transdisciplinares são as de maior potencial no futuro do biotratamento de áreas contaminadas (WEISS; COZZARELLI, 2008). A combinação de um entendimento profundo das características geoquímicas, hidrológicas e microbiológicas do sítio contaminado juntamente com a implementação de estratégias inovadoras de enfoque molecular e estratégias tradicionais de cultivo microbiano parece ser o futuro das biotecnologias aplicadas à gestão de áreas contaminadas e, portanto, exigirá a colaboração de profissionais de diferentes áreas na busca por soluções eficazes aos problemas ambientais.

9 CONCLUSÃO

A biorremediação é uma técnica adaptável, eco-amigável e eficaz de tratamento que está sendo cada vez mais utilizada na gestão de áreas contaminadas e na remediação ambiental. O potencial dos microrganismos de transformar os poluentes em compostos não tóxicos é a chave do desenvolvimento dessas tecnologias. A biorremediação baseia-se nas interações dos microrganismos com os poluentes e nas condições que influenciam nesses processos. Assim, as condições ambientais e as que influenciam na bioquímica da degradação do poluente, podem ser controladas *in situ* e *ex situ* para conseguir níveis aceitáveis de concentração de poluentes no ambiente. É importante considerar que a biorremediação de áreas contaminadas depende profundamente do entendimento dos processos bioquímicos e microbianos do solo. O fomento da utilização de técnicas biológicas na remediação de sítios contaminado pode se ver favorecido com a incorporação de técnicas de bioquímica e genética em conjunto com as técnicas de engenharia já utilizadas.

Nesse contexto, a pesquisa sobre os mecanismos bioquímicos de degradação é uma peça fundamental, incluindo também as novas abordagens enzimáticas e proteômicas da degradação de poluentes. Incorporar os conhecimentos de diferentes áreas como a biologia molecular, a química analítica, a biogeoquímica e a engenharia ambiental, são o futuro de tratamentos biológicos eficientes e a baixo custo de sítios contaminados.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, P. J. J.; ILLMAN, W. A. **Bioremediation and Natural Attenuation**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/047173862x>

BACHATE, S. P.; NANDRE, V. S.; GHATPANDE, N. S.; KODAM, K. M. Simultaneous reduction of Cr(VI) and oxidation of As(III) by *Bacillus firmus* TE7 isolated from tannery effluent. **Chemosphere**, v. 90, n. 8, p. 2273–2278, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.081>

BALTAZAR, M. D. P. G. **Estudo do potencial de bioissorção de cobre por *Rhodococcus erythropolis* e *Enterobacter cloacae* isoladas de uma área de mineração**. 2017. - Universidade de Sao Paulo, [s. l.], 2017.

BAXTER, J.; CUMMINGS, S. P. The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 90, n. 1, p. 1–17, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9057-y>

BHAKAT, K.; CHAKRABORTY, A.; ISLAM, E. Characterization of arsenic oxidation and uranium bioremediation potential of arsenic resistant bacteria isolated from uranium ore. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 13, p. 12907–12919, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04827-6>

CHAWLEY, P.; BANERJEE, C.; JAGADEVAN, S. Growth of planktonic and biofilm culture of *Nitrosomonas mobilis* Msl in response to stoichiometric ammonia consumption. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 154, n. September, p. 105080, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105080>

CHIKERE, C. B.; TEKERE, M.; ADELEKE, R. Enhanced microbial hydrocarbon biodegradation as stimulated during field-scale landfarming of crude oil-impacted soil. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 14, n. May, p. 100177, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100177>

CRAWFORD, R. L. Biodegradation: Principles, Scope, and Technologies. *En: Industrial and Toxic Waste*. USA: Elsevier B.V., 2011. v. 6p. 3–13. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00368-8>

DAS, S.; DASH, H. R. Microbial Bioremediation: A Potential Tool for

Restoration of Contaminated Areas. *En: Microbial Biodegradation and Bioremediation*. London: Elsevier Inc., 2014. p. 2–21. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00001-7>

DEY, P.; GOLLA, D.; MISHRA, A.; MALIK, A.; SINGH, D. K.; PATEL, N.; VON BERGEN, M.; JEHLICH, N. Comparative performance evaluation of multi-metal resistant fungal strains for simultaneous removal of multiple hazardous metals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 318, p. 679–685, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.07.025>

EPA, U. S. **Superfund Remedy Report, Sixteenth Edition**. 16th Edition. United States: U.S. Environmental Protection Agency (EPA), 2020.

FALKIEWICZ-DULIK, M.; JANDA, K.; WYPYCH, G. Mechanisms and Kinetics. **Handbook of Material Biodegradation, Biodeterioration, and Biostabilization**, p. 75–97, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-1-895198-87-4.50007-4>

GADD, G. M.; WHITE, C. Microbial treatment of metal pollution - a working biotechnology? **Trends in Biotechnology**, v. 11, n. 8, p. 353–359, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90158-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90158-6)

GUIMARAES, J. R. D.; BETANCOURT, O.; MIRANDA, M. R.; BARRIGA, R.; CUEVA, E.; BETANCOURT, S. Long-range effect of cyanide on mercury methylation in a gold mining area in southern Ecuador. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 23, p. 5026–5033, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.021>

HATZINGER, P. B.; KELSEY, J. W. Pollutants/Biodegradation. *En: Encyclopedia of Soils in the Environment*. [S. l.]: Elsevier, 2005. p. 250–258.

JAFARIAN, V.; GHAFARI, F. A unique metallothionein-engineered in *Escherichia coli* for biosorption of lead, zinc, and cadmium; absorption or adsorption? **Microbiology (Russian Federation)**, v. 86, n. 1, p. 73–81, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0026261717010064>

JØRGENSEN, S. E. Biodegradation. *En: Ecological Processes*. [S. l.]: Elsevier, 2008. p. 366–367.

KAROLSKI, B.; O.B.CARDOSO, L.; GRACIOSO, L. H.; NASCIMENTO, C.

A. O.; PERPETUO, E. A. MALDI-Biotyper as a tool to identify polymer producer bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 153, n. October 2018, p. 127–132, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.016>

KATARIA, R.; RUHAL, R. Microbiological Metabolism Under Chemical Stress. **Microbial Biodegradation and Bioremediation**, p. 497–509, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00021-2>

KIRAN, M. G.; PAKSHIRAJAN, K.; DAS, G. Heavy metal removal from multicomponent system by sulfate reducing bacteria: Mechanism and cell surface characterization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 324, p. 62–70, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.12.042>

KUMAR, V.; SHAHI, S. K.; SINGH, S. Bioremediation: An eco-sustainable approach for restoration of contaminated sites. **Microbial Bioprospecting for Sustainable Development**, p. 1–397, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0>

LI, S.; WACKETT, L. Trichloroethylene oxidation by toluene dioxygenase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 185, n. 1, p. 443–451, 1992.

LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial - Processos Fermentativos e enzimáticos**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2007.

MADSEN, E. L. Determining in situ biodegradation: Facts and Challenges. **Environmental Science & Technology**, v. 25, n. 10, p. 1662–1673, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es00022a001>

MAJONE, M.; VERDINI, R.; AULENTA, F.; ROSSETTI, S.; TANDOI, V.; KALOGERAKIS, N.; AGATHOS, S.; PUIG, S.; ZANAROLI, G.; FAVA, F. In situ groundwater and sediment bioremediation: Barriers and perspectives at European contaminated sites. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 133–146, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.02.011>

MARCON, R.; BESTETTI, G.; FRATI, F.; PEPI, M.; BALDI, F. Naphthalene and biphenyl oxidation by two marine *Pseudomonas* strains isolated from Venice Lagoon sediment. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 59, n. 1, p. 25–31, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.06.001>

MISHRA, A.; MALIK, A. Simultaneous bioaccumulation of multiple metals from electroplating effluent using *Aspergillus lentulus*. **WR**, v. 46, n. 16, p. 4991–4998, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.035>

OJIMA, Y.; KOSAKO, S.; KIHARA, M.; MIYOSHI, N.; IGARASHI, K.; AZUMA, M. Recovering metals from aqueous solutions by biosorption onto phosphorylated dry baker's yeast. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36306-2>

POSTGATE, J. R. **The sulphate-reducing bacteria**. Cambridge: Cambridge University, 1979.

RAHMAN, Z. An overview on heavy metal resistant microorganisms for simultaneous treatment of multiple chemical pollutants at co-contaminated sites, and their multipurpose application. **Journal of Hazardous Materials**, v. 396, n. April, p. 122682, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122682>

RAYU, S.; KARPOUZAS, D. G.; SINGH, B. K. Emerging technologies in bioremediation: Constraints and opportunities. **Biodegradation**, v. 23, n. 6, p. 917–926, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9576-3>

REHMANN, L.; DAUGULIS, A. J. Biphenyl degradation kinetics by *Burkholderia xenovorans* LB400 in two-phase partitioning bioreactors. **Chemosphere**, v. 63, n. 6, p. 972–979, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.08.076>

ROCKNE, K. J.; REDDY, K. R. Bioremediation of contaminated sites. *En*: 2003, Madras, India. **International e-Conference on Modern Trends in Foundation Engineering: Geotechnical Challenges and Solutions**. Madras, India: Indian Institute of Technology, 2003. p. 35.

ROSARIO, C. A. **Avaliação da degradação bacteriana de cianeto com cepas isoladas de rejeito de mineração**. 2017. - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, [s. l.], 2017.

SAMANTARAY, D.; MOHAPATRA, S.; MISHRA, B. B. Microbial Bioremediation of Industrial Effluents. **Microbial Biodegradation and Bioremediation**, p. 325–339, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00014-5>

SANTOS, D. K. F.; RESENDE, A. H. M.; DE ALMEIDA, D. G.; DA SILVA, R.

de C. F. S.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; BANAT, I. M.; SARUBBO, L. A. Candida lipolytica UCP0988 biosurfactant: Potential as a bioremediation agent and in formulating a commercial related product. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00767>

SCHENBERG, A. C. G. Biotecnologia e desenvolvimento sustentável. **Estudos Avancados**, v. 24, n. 70, p. 7–17, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300002>

SINHA, R. K.; VALANI, D.; SINHA, S.; SINGH, S.; HERAT, S. Bioremediation of contaminated sites: A low-cost nature's biotechnology for environmental clean up by versatile microbes, plants and earthworms. *En: FAERBER, T.; HERZOG, J. (eds.). Solid Waste Management and Environmental Remediation. [S. l.]: Nova Science Publishers, Inc., 2009. p. 1–72.*

STELIGA, T.; JAKUBOWICZ, P.; KAPUSTA, P. Changes in toxicity during in situ bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 1–10, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.092>

SUTHERSAN, S. S.; HORST, J.; SCNOBRICH, M.; WELTY, N.; MCDONOUGH, J. **Remediation Engineering**. 2nd editio ed. [S. l.]: CRC Press, 2017.

U. S. EPA. In Situ and Ex Situ Biodegradation Technologies for Remediation of Contaminated Sites. **US of Research, Office Transfer Support Division, Technology Grosse, Douglas**, p. 1–22, 2006. Disponível em: https://clu-in.org/download/contaminantfocus/dnapl/Treatment_Technologies/epa_2006_engin_issue_bio.pdf

VALLS, M.; LORENZO, D.; GONZALEZ-DUARTE, R. Engineering outer-membrane proteins in. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 79, p. 219–223, 2000.

VOLESKY, B. Biosorption and me. **Water Research**, v. 41, n. 18, p. 4017–4029, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.05.062>

WANG, B.; CHU, K. H. Cometabolic biodegradation of 1,2,3-trichloropropane by propane-oxidizing bacteria. **Chemosphere**, v. 168, p. 1494–1497, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.007>

WEISS, J. V.; COZZARELLI, I. M. Biodegradation in contaminated aquifers:

Incorporating microbial/molecular methods. **Ground Water**, v. 46, n. 2, p. 305–322, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2007.00409.x>

ZHANG, H.; PENNISI, S. V.; KAYS, S. J.; HABTESELASSIE, M. Y. Isolation and identification of toluene-metabolizing bacteria from rhizospheres of two indoor plants. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 224, n. 9, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1648-4>