

## **BIOTEHNOLOGII DE DEPOLUARE ȘI REMEDIERE A SOLULUI**

**LUCIAN GAVRILĂ**

*Universitatea din Bacău, Facultatea de Inginerie, Departamentul de Inginerie Chimică și Alimentară, Calea Mărășești 157, 600115 Bacău, Fax: 0234 580 170, email: lgavrila@ub.ro*

### **1. Introducere**

La sfârșitul celui de-al doilea război mondial, existența unei industrii în continuă expansiune era esențială pentru restaurarea și îmbunătățirea standardelor de viață și pentru stimularea activității economice în Europa. Prețul plătit pentru această industrializare excesivă, întâi în Europa de Vest (Planul Marshall), dar mai apoi și în Est, l-a reprezentat o poluare atmosferică excesivă, producerea unor impresionante cantități de deșeuri solide, precum și generarea unor debite din ce în ce mai mari de ape reziduale. Dat fiind faptul că poluanții atmosferici erau rapid diluați și dispersați, iar deșeurile solide puteau fi depozitate în relativă siguranță în zone bine delimitate, nu s-a considerat inițial că acești poluanți pot influența în mod semnificativ calitatea factorilor de mediu (apă, aer, sol), așa cum – de exemplu – calitatea apelor de suprafață și de adâncime este influențată de poluanții existenți în apele reziduale. La ora actuală, depoluarea, decontaminarea, remedierea și reintroducerea în circuitul normal a solurilor – respectiv transformarea așa-numitelor „brown-fields” în „green-fields” – este una dintre sarcinile majore avute în vedere pe multiple planuri: legislativ, tehnic, economic, social etc.

Datorită numărului practic nelimitat de poluanți și a diferitelor structuri de soluri, nu există o metodă general valabilă pentru remedierea solurilor. Alegerea unei tehnologii de remediere este o activitate complexă, care presupune luarea în considerare a numeroși factori: tipul poluanților, cantitatea de poluanți, dinamica poluanților, caracteristicile hidrogeologice ale solului, factorii climaterici. Nu în ultimul rând contează și aspectele economice, respectiv costurile remedierii.

În cadrul acestui capitol vor fi abordate problemele referitoare la biotehnologiile aplicabile în procesele de depoluare, decontaminare și remediere a solului.

## 2. Biodegradarea poluanților

Poluanții aflați în sol sunt supuși unor procese de transformare *biogeochimice*. Aceste procese afectează structura poluantului printr-un proces *chimic* care decurge într-un mediu *geologic* și poate fi realizat de către un organism *biologic*. *Biodegradarea* este definită ca fiind reacția catalizată biologic care are drept efect reducerea complexității unui compus chimic. Un compus *biodegradabil* poate fi transformat sub influența microorganismelor într-un alt compus, cu structură mai simplă, dar care nu este neapărat mai puțin toxic decât compusul de proveniență. Un compus poate fi *recalcitrant*, dacă acesta nu poate fi biodegradat sub nici o formă. Un compus este *persistent* atunci când el este biodegradabil, dar numai în anumite condiții, care favorizează biodegradarea. *Mineralizarea* înseamnă conversia completă a unui compus organic în produșii de degradare finală:  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$ . Se numește *biodegradare primară* transformarea singulară a unui compus; *biodegradarea parțială* este transformarea mai avansată decât biodegradarea primară, fără a se ajunge totuși la mineralizare.

### 2.1. Bazele metabolismului microbial

În cazul poluanților de natură organică, transformarea microbială decurge datorită faptului că microorganismele pot utiliza acești compuși pentru creștere și reproducere. Poluantul organic are un dublu rol: de sursă de carbon, piatra de temelie a oricărei construcții celulare, și de furnizor de electroni, pe care microorganismele îi pot extrage pentru a obține energie.

Microorganismele își procură energia catalizând reacții redox care decurg cu degajare de energie. Poluantul, donor de electroni, este oxidat în timp ce un acceptor de electroni este redus. Donorul și acceptorul de electroni sunt esențiali pentru creșterea celulelor, fiind cunoscute de regulă sub denumirea de *substrat primar*.

Majoritatea microorganismelor utilizează ca acceptor de electroni oxigenul molecular ( $\text{O}_2$ ). În acest caz putem vorbi despre *degradarea aerobă*, în care  $\text{O}_2$  este folosit pentru a oxida o parte din carbonul din poluant la dioxid de carbon ( $\text{CO}_2$ ), restul de carbon fiind folosit pentru producerea de masă celulară nouă. În proces  $\text{O}_2$  este redus, formând apă. Astfel produsele principale ale degradării aerobe sunt  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  și o populație crescută de microorganismele.

Există însă microorganismele care utilizează alți acceptori de electroni, putând supraviețui în lipsa  $\text{O}_2$ . Aceste microorganismele realizează *degradarea anaerobă* a poluanților, utilizând pe post de acceptori de electroni ioni de azotat ( $\text{NO}_3^-$ ), sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), fier ( $\text{Fe}^{3+}$ ), mangan ( $\text{Mn}^{4+}$ ), sau chiar  $\text{CO}_2$ . Pe lângă masa celulară nouă formată, regăsim ca produse ale degradării anaerobe azot molecular ( $\text{N}_2$ ), hidrogen

sulfurat ( $\text{H}_2\text{S}$ ), metale în formă redusă ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) sau metan ( $\text{CH}_4$ ), în funcție de acceptorul de electroni utilizat.

Unele microorganisme pot folosi ca donor de electroni și substanțe anorganice: ioni amoniu ( $\text{NH}_4^+$ ), azotit ( $\text{NO}_2^-$ ), metale în formă redusă ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ),  $\text{H}_2\text{S}$ . Când acești compuși anorganici sunt oxidați (respectiv la  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), se produce energie pentru creșterea celulelor, electronii fiind preluați de un acceptor de electroni (uzual  $\text{O}_2$ ). În majoritatea cazurilor, aceste microorganisme utilizează ca sursă de carbon dioxidul de carbon din atmosferă, realizând astfel fixarea  $\text{CO}_2$ .

O formă aparte de metabolism, care poate juca un rol important în mediile lipsite de  $\text{O}_2$  este *fermentația*. Acest proces nu necesită un acceptor extern de electroni, poluantul jucând atât rol de donor, cât și de acceptor de electroni. Printr-o succesiune de transferuri interne de electroni catalizate de către microorganisme, poluantul este transformat în produși de fermentație inofensivi: acetati, propionați, etanol, hidrogen, dioxid de carbon. Acești produși de fermentație pot fi biodegradați de către alte bacterii până la produșii finali:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ .

Uneori microorganismele pot produce transformarea poluanților, chiar dacă acest proces nu aduce decât un beneficiu minor celulei. O astfel de biotransformare este cunoscută sub denumirea generică de *utilizare secundară*, un caz particular al acesteia reprezentându-l *co-metabolismul*. În co-metabolism transformarea poluantului este urmarea unei reacții accidentale catalizate de enzimele implicate în metabolismul normal al celulelor. De exemplu, în procesul de oxidare a metanului, unele bacterii pot degrada solvenți clorurați pe care, de regulă, sunt incapabile să-i distrugă. În procesul de oxidare a metanului, microorganismele produc enzime care distrug solvenții clorurați, chiar dacă acesta nu suportă dezvoltarea microbiană. Metanul este donorul primar de electroni, fiind sursa de hrană primară a microorganismului, în timp ce solvenții clorurați sunt *substrat secundar*.

O altă formă a metabolismului microbial o reprezintă *dehalogenarea reducătoare*. Aceasta este importantă pentru distrugerea poluanților organici halogenați, în speță a solvenților clorurați. În dehalogenarea reducătoare, microorganismele catalizează o reacție prin care atomul de halogen din molecula poluantului este înlocuit cu un atom de hidrogen. Pentru a putea avea loc reacția, este necesară prezența unui donor de electroni, altul decât poluantul, care să furnizeze perechea de electroni necesară reducerii. Potențiali donori sunt hidrogenul și compușii organici cu masă moleculară mică (lactat, acetat, metanol, glucoză).

Indiferent de mecanismul prin care microorganismele produc degradarea poluanților, compoziția celulară a acestora este relativ constantă: 50% C; 14% N; 3% P; 2% K; 1% S; câte 0,5% Ca, Mg, Cl; 0,2% Fe. Dacă oricare din aceste elemente este deficitar în raport cu carbonul din poluantul organic, competiția pentru nutrienți între microorganisme poate limita creșterea globală a masei celulare și poate încetini îndepărtarea poluantului.

## 2.2. Poluanți

Poluanții existenți în sol sunt fie de natură organică, fie de natură anorganică. S-a constatat existența, atât în medii naturale cât și în medii poluate, a peste 1600 de compuși organici, de origine naturală sau antropică. Dintre aceștia, prezintă interes pentru poluarea solului și subsolului produsele obținute prin rafinarea petrolului, combustibilii, solvenții organici clorurați sau neclorurați, degresanții, compușii organici utilizați ca materii prime în diverse tehnologii. O clasificare simplificată a potențialilor compuși poluanți este prezentată în figura 1.

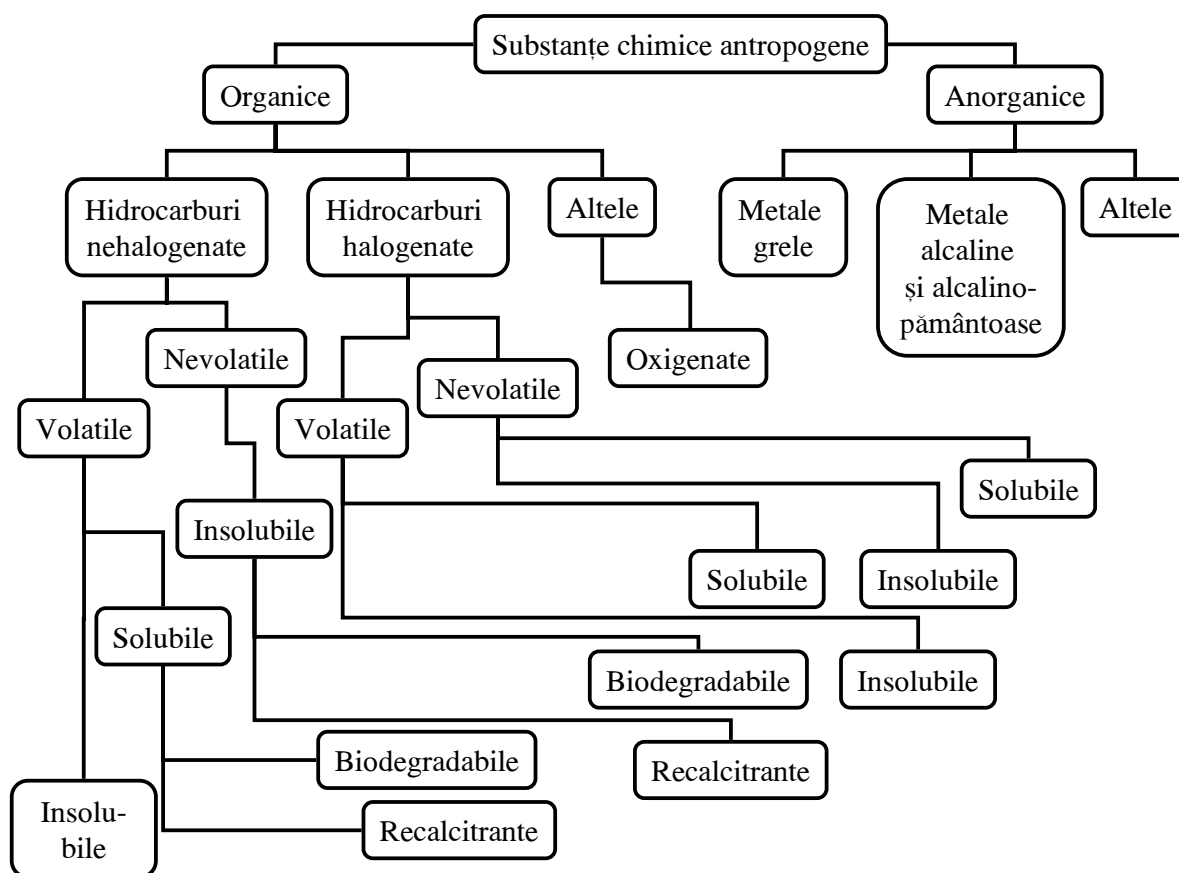


Figura 1. Clasificarea simplificată a compușilor poluanți din sol

## 2.3. Degradarea aerobă a compușilor organici

Marea majoritate a compușilor organici naturali sau antropici se degradează în condiții aerobe, cu  $O_2$  ca acceptor terminal de electroni. Atâta timp cât oxigenul este disponibil, acesta este acceptorul de electroni favorit al proceselor de degradare microbiană care au loc în natură.

Cele mai importante clase de poluanți organici sunt componentele țiteiului și produsele petrochimice halogenate. Acești compuși se degradează rapid și complet în condiții aerobe. Pentru studierea capacității microorganismelor aerobe de a degrada

astfel de compuși există numeroase cercetări care folosesc în calitate de molecule model hidrocarburi alifaticе, aromatice și derivați halogenați ai acestora.

Microrganismele capabile de degradarea poluanților organici din zonele contaminate sunt bacteriile chemo-organotrofice, care au capacitatea de a utiliza un imens număr de compuși naturali și de sinteză drept sursă de carbon și ca donori de electroni (tabelul 1). Deși multe bacterii pot metaboliza poluanții organici, o singură specie nu posedă capacitatea enzimatică de a degrada toți sau măcar o mare parte din poluanții existenți în sol. Bacteriile realizează biodegradarea poluanților atât prin mecanism de creștere, cât și prin co-metabolism. Comunitățile microbiene mixte au potențialul de biodegradabilitate cel mai puternic, întrucât pentru degradarea amestecurilor complexe de poluanți este necesară informația genetică a mai multor organisme.

**Tabel 1.** Bacterii predominante în solurile poluate cu hidrocarburi aromatice și alifaticе, hidrocarburi aromatice policiclice și derivați halogenați

Bacterii Gram-negative	Bacterii Gram pozitive
<i>Pseudomonas</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Flavobacterium/Cytophaga</i>	<i>Arthrobacter</i>
<i>Xanthomonas</i>	<i>Bacillus</i>

În cazul biodegradării alcanilor sau cicloalcanilor prin mecanismul de creștere, într-o primă etapă are loc atacul oxigenului molecular asupra unei legături C–H printr-o reacție catalizată de o monooxigenază sau dioxigenază, în funcție de natura substratului și de enzima posedată de microorganism. *n*-Alcanii cu catenă lungă (C<sub>10</sub> – C<sub>24</sub>) sunt rapid degradați până la acizi grași care sunt metabolizați (figura 2). *n*-Alcanii cu catenă scurtă (C<sub>5</sub> – C<sub>9</sub>) sunt toxici pentru majoritatea microorganismelor, însă ei se evaporă rapid din solurile contaminate cu petrol.

Cicloalcanii, aflați într-o proporție mai redusă în țiței, sunt relativ rezistenți la biodegradare. Absența unei grupări metilice îngreuiază atacul primar al oxigenului, pe când o catenă laterală facilitează biodegradarea. Întrucât sunt puține microorganisme care pot utiliza cicloalcanii ca sursă unică de carbon, cel mai adesea biodegradarea acestora are loc prin co-metabolism (figura 3).

În cazul compușilor aromatici, fie că este vorba de hidrocarburi (benzen, toluen, etilbenzen, xileni, naftalină), fenoli și clorofenoli, aminoacizi, chinone și hidrochinone, aceștia pot fi transformați pe cale enzimatică în intermediari naturali de biodegradare: 1,2 dihidroxibenzen (pirocatechină) sau acid 3,4 dihidroxibenzoic (acid protocatehic) - figura 4. Aceștia sunt descompuși ulterior, în mai multe etape, fie până la acetyl-CoA și succinat, fie până la acetaldehidă și piruvat.

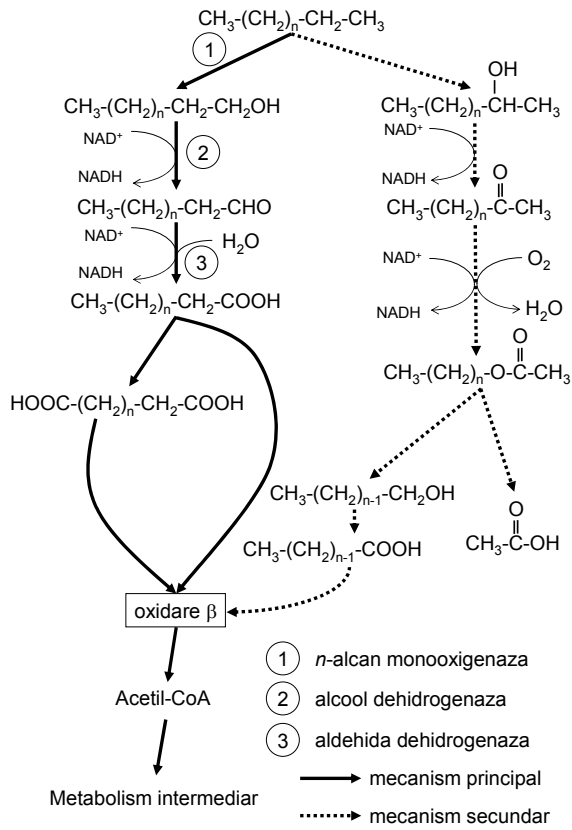


Figura 2. Mecanismele biodegradării aerobe a *n*-alcanilor

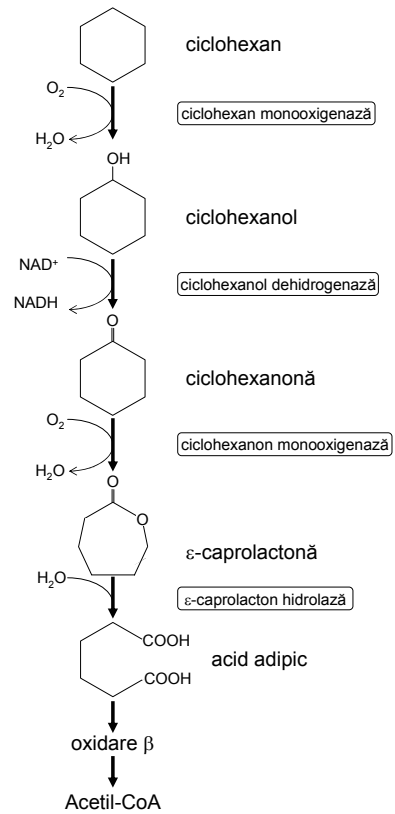


Figura 3. Mecanismul biodegradării aerobe a cicloalkanilor

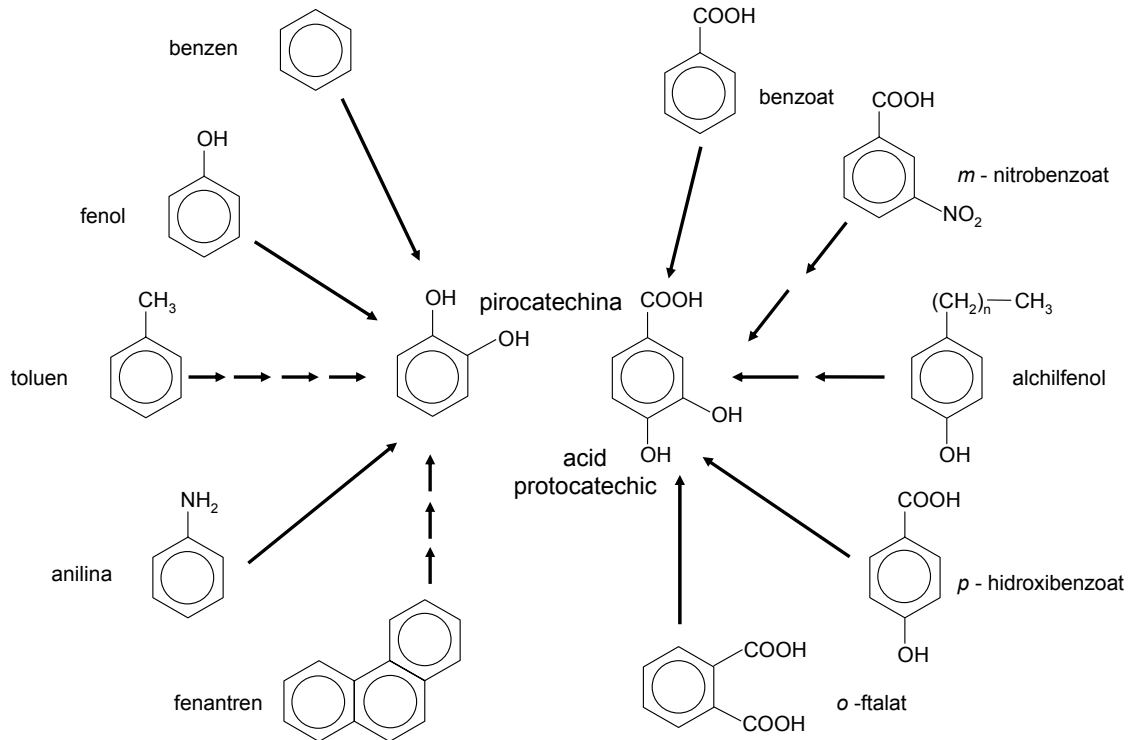
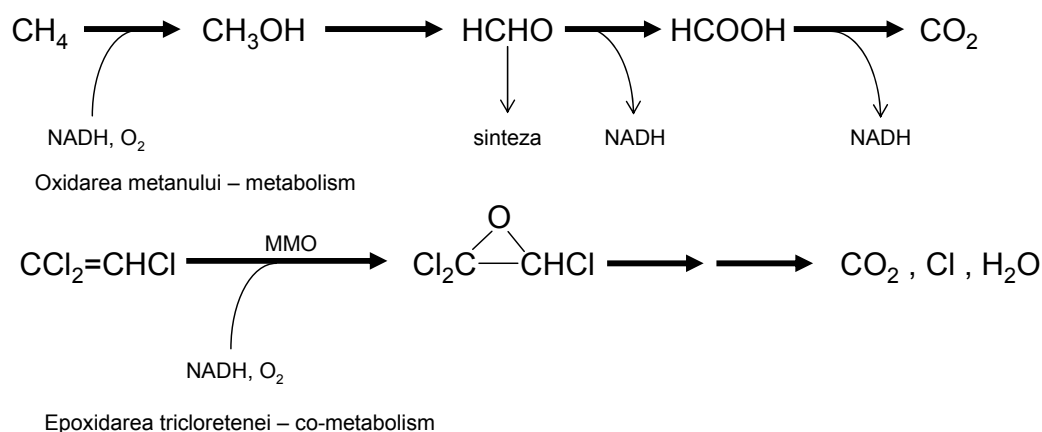


Figura 4. Degradarea diversilor compuși aromatici naturali și sintetici la pirocatechină și acid protocatehic

În general benzenul și derivații acestuia au o stabilitate termodinamică mai mare decât compușii alifatici. Oxidarea benzenului are loc prin hidroxilare catalizată de o dioxigenază. Diolul format se transformă apoi în pirocatechină. Hidroxilarea urmată de dehidrogenare se întâlnesc și în cazul biodegradării altor hidrocarburi aromatice, cum ar fi hidrocarburi aromatice policiclice (HAP) cu 3 și 4 cicluri. Existența unui substituent în nucleul benzenic permite fie atacul la catena laterală, fie oxidarea nucleului aromatic prin mecanisme alternative.

Bacteriile metanotrofe pot utiliza metanul sau alți compuși  $C_1$  drept unică sursă de carbon și energie, oxidând metanul la  $CO_2$  *via* metanol, formaldehidă și formiat, intermediarul asimilat fiind formaldehida. Prima etapă de oxidare a  $CH_4$  este catalizată de metan monooxigenază (MMO), o enzimă nespecifică aptă să oxideze și alți compuși: alcani, arene, tricloretenă (TCE). În figura 5 este reprezentat mecanismul de degradare aerobă a TCE prin co-metabolism.



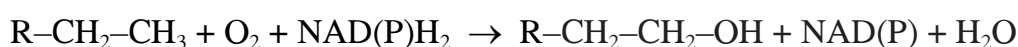
**Figura 5.** Mecanismul de degradare co-metabolică a TCE de către bacteriile metanotrofe

Ulterior s-a constatat că multe alte grupuri de bacterii aerobe care sunt apte să oxideze propanul, etena, toluenul, fenolul, amoniacul, pot co-metaboliza compuși organici halogenați. Utilizarea în practică a unui sistem de biodegradare aerobă co-metabolică a derivaților halogenați este încă dificilă: co-metabolitul trebuie să fie prezent întotdeauna pentru susținerea reacțiilor, însă excesul de metan și concentrații ridicate de oxigen inhibă oxidarea compușilor clorurați. Mai mult decât atât, există studii care arată că produșii de degradare ai TCE sunt toxici pentru anumite metanotrofe, iar percloretena (PCE) inhibă degradarea TCE. Altă limitare o constituie faptul că metanotrofele nu pot degrada PCE sau compuși policlorurați cu un număr mai mare de atomi de clor în moleculă.

O altă categorie de organisme capabile să degradeze poluanții organici sunt fungiile, existente în cele mai diverse medii (ape dulci, ape marine, sol, resturi de plante și animale, organisme vii etc.). Mucegaiurile și drojdiile pot fi considerate drept microfungii.

Este bine cunoscută capacitatea drojdiilor de a degrada hidrocarburile alifatiche existente în țiței și în produsele petroliere. Cel mai ușor se degradează *n*-alcanii C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>, în prezența drojdiilor *Candida lipolytica*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula rubra* și *Aureobasidion (Trichosporon)*, sau a mucegaiurilor *Cunninghamella blakesleeana*, *Aspergillus niger* și *Penicillium frequentans*. Ca și pentru bacterii, fracțiunile C<sub>5</sub> – C<sub>9</sub> sunt toxice și pentru fungi. Deoarece alcanii superiori sunt practic insolubili în apă, fungiile produc biosurfactanți care dispersează substratul într-o emulsie de tip ulei-în-apă, fapt care duce la creșterea ariei interfaciale și de aici la creșterea biodisponibilității hidrocarburilor.

În microfungii alcanii sunt oxidați enzimatic în prezența unei monooxigenaze până la alcoolii primari corespunzători:



Ulterior aceștia sunt oxidați la aldehide și apoi la acizi grași prin intermediul dehidrogenazelor legate de nucleotide piridinice. Acizii grași produși sunt întotdeauna metabolizați prin oxidare β ajungându-se în final la CO<sub>2</sub>. Spre deosebire de bacterii, fungiile nu pot utiliza izoalcanii sau cicloalcanii ca sursă unică de carbon.

**Tabel 2.** Specii de drojdii și mucegaiuri care folosesc compuși aromatici drept substrat de creștere

Specia	Substratul de creștere
<u>Drojdi</u>	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	fenol, <i>o</i> -crezol, <i>p</i> -crezol, acid benzoic
<i>Candida maltosa</i>	fenol, pirocatechină, acid benzoic
<i>Exophiala jeanselmei</i>	fenol, stiren, acid benzoic, acetofenonă
<i>Rhodotorula glutinis</i>	fenol, <i>m</i> -crezol, acid benzoic
<i>Trichosporon cutaneum</i>	fenol, <i>p</i> -crezol, acid benzoic, acid salicilic
<u>Mucegaiuri</u>	
<i>Aspergillus niger</i>	acid 2,4-dicloro-fenoxi acetic, acid benzoic, acid salicilic, acizi monoclorobenzoici
<i>Aspergillus fumigatus</i>	fenol, <i>p</i> -crezol, 4-etilfenol, acid fenilacetic
<i>Fusarium flocciferum</i>	fenol, rezorcină
<i>Penicillium frequentans</i>	fenol, <i>p</i> -crezol, rezorcină, floroglucină, anisol, alcool benzilic, acid benzoic, acid salicilic, acid galic, acid fenilacetic, 1-feniletanol acetofenonă
<i>Penicillium simplicissimum</i>	fenol, floroglucină, monofluorofenoli

Deși unele drojdii și mucegaiuri pot utiliza compuși aromatici drept substrat de creștere (tabelul 2), mult mai importantă este proprietatea acestora de a-i degrada prin co-metabolism. Enzimele de hidroxilare și cele de rupere a inelului aromatic ale



microfungiilor sunt relativ nespecifice, ele transformând de regulă și compuși înrudiți, inclusiv derivați halogenați și nitroderivați. De asemenea, microfungiile pot transforma co-metabolic numeroși poluanți aromatici, inclusiv hidrocarburi aromatice policiclice (HAP), bifenili, dibenzofurani, nitroaromatice, pesticide, plastifianți. Transformările tipice sunt glicozilarea, hidroxilarea și ruperea inelului aromatic, metoxilarea, reducerea grupelor nitro la grupe amino.

Este important de menționat că și *macrofungiile* (ciupercile) pot contribui la degradarea aerobă a poluanților organici. O parte dintre acestea, cele mai reprezentative fiind *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Nematoloma frowardii*, *Agaricus bisporus*, *Agrocybe praecox*, *Stropharia coronilla*, au dezvoltat un sistem enzimatic eficient de degradare și mineralizare a ligninei. Degradarea ligninei se realizează prin acțiunea sinergetică a unor oxidoreductaze, enzimele ligninolitice. Aceste enzime acționează printr-un mecanism de depolimerizare prin radicali liberi cu reactivitate ridicată, mecanism care se pretează și pentru degradarea unor poluanți organici recalcitranti și toxici, cum ar fi dibenzodioxinele policlorurate, dibenzofuranii, compușii aromatici clorurați, compușii nitroaromatici (explozivii) sau compușii aromatici cangerigeni din clasa HAP. Deși cercetări recente au arătat că este posibilă, la nivel de laborator, utilizarea macrofungiilor pentru biodegradarea anumitor poluanți (HAP, TNT, policlorofenoli), potențialul competitiv redus al acestora în sol face ca utilizarea lor să fie încă restrânsă. Totuși, s-au testat cu succes macrofungii ca *Stropharia rugosoannulata*, care se dezvoltă în porțiunile superioare ale solului și în stratul de humus, pentru decontaminarea unor soluri poluate cu TNT sau HAP.

#### ***2.4. Degradarea anaerobă a compușilor organici***

Procesele de degradare anaerobă au fost considerate dintotdeauna mai puțin eficiente decât cele de degradare aerobă, mai ales din punct de vedere cinetic. Bacteriile anaerobe obțin mult mai puțină energie prin conversia substratului decât cele aerobe, și în consecință produc mult mai puțină biomasă. Un mol de glucoză degradat aerob la 6 moli de CO<sub>2</sub> produce 2870 kJ, în timp ce același mol de glucoză degradat anaerob la 3 moli de CO<sub>2</sub> și 3 moli de CH<sub>4</sub> produce numai 390 kJ, energie care trebuie împărțită la cel puțin trei grupuri diferite de bacterii, care realizează metabolizarea.

Degradarea materiei organice în absența oxigenului poate fi cuplată cu reducerea unor acceptori de electroni alternativi într-o ordine care depinde de valorile potențialelor redox ale sistemelor respective (tabelul 3). Reducerea acestor acceptori cu electroni proveniți din materia organică (potențialul redox mediu pentru transformarea globală: glucoză → 6CO<sub>2</sub> este de -0,434 mV) va conduce la diferite cantități de energie, influențând astfel biochimismul biodegradării anaerobe.

**Tabel 3.** Potențialul redox al sistemelor implicate în degradarea anaerobă a compușilor organici

Sistemul	Potențial redox, mV	Produs final
O <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O	+810 (la pH = 7)	H <sub>2</sub> O
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+430	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NH <sub>3</sub> , N <sub>2</sub>
MnO <sub>2</sub> /Mn <sup>2+</sup>	+400	MnCO <sub>3</sub>
FeOOH/Fe <sup>2+</sup>	+150	FeCO <sub>3</sub>
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /HS <sup>-</sup>	-218	S <sup>2-</sup>
CO <sub>2</sub> /CH <sub>4</sub>	-244	CH <sub>4</sub>

Cu toate dezavantajele degradării anaerobe, prezența oxigenului nu este întotdeauna avantajoasă în procesele de degradare. Oxigenazele introduc grupări hidroxil în nucleeele aromatice; în continuare oxigenul poate conduce la formarea radicalilor fenolici care inițiază o polimerizare și policondensare necontrolată până la compuși similari derivaților humici din sol, foarte dificil de degradat, fie aerob, fie anaerob.

Hidrocarburile alifatic saturate sunt relativ stabile în condiții anaerobe. Bacteriile sulfat reducătoare și cele nitrificatoare pot asimila hidrocarburi cu catenă lungă (C<sub>12</sub> – C<sub>20</sub>) sau medie (C<sub>6</sub> – C<sub>16</sub>), însă procesul decurge foarte lent.

Pentru degradarea anaerobă a compușilor aromatici mononucleari sunt cunoscute cel puțin trei căi: prin benzoil-CoA (cea mai importantă - figura 6), prin rezorcină și prin fluoroglucină. În toate cele trei cazuri se formează într-o etapă reducătoare un compus 1,3 dioxo, care permite ulterior un atac nucleofil la unul din atomii de carboni cetonic ai nucleului, conducând la ruperea acestuia. În funcție de substratul aromatic, în final se ajunge fie la un rest pimelic (C<sub>7</sub> – dicarboxilic) legat de coenzima A, fie la un rest caproic (C<sub>6</sub> – monocarboxilic) parțial oxidat care prin oxidare β trece în acetat. Compușii aromatici care nu posedă o grupare carboxilică (fenol, anilină etc.) sunt mai întâi carboxilați la un rest *p*-hidroxil sau *p*-amino benzoic, care ulterior este activat cu coenzima A.

Dacă în ceea ce privește degradarea anaerobă a benzenului sunt puține date iar biochimia activării procesului nu este încă elucidată complet, se cunoaște mecanismul degradării anaerobe a toluenului, etilbenzenului, crezolilor, de către bacterii reducătoare de nitrați, respectiv de sulfați.

Derivații halogenați pot fi dehalogenați prin trei mecanisme de bază: oxidativ, hidrolitic și reducător. Mecanismul cel mai comun al bacteriilor anaerobe este cel de eliminare reducătoare a halogenului, pus în evidență pentru prima dată în 1982. De regulă, declorurarea reducătoare este preferată în cazul compușilor cu grad ridicat de halogenare. Potențialul redox al procesului este semnificativ (+250 ... +580 mV), iar atacul nucleofil la carbonul halogenat este mai probabil decât o reacție oxidativă. Schema globală a dehalogenării reducătoare este redată în figura 7: electronii proveniți

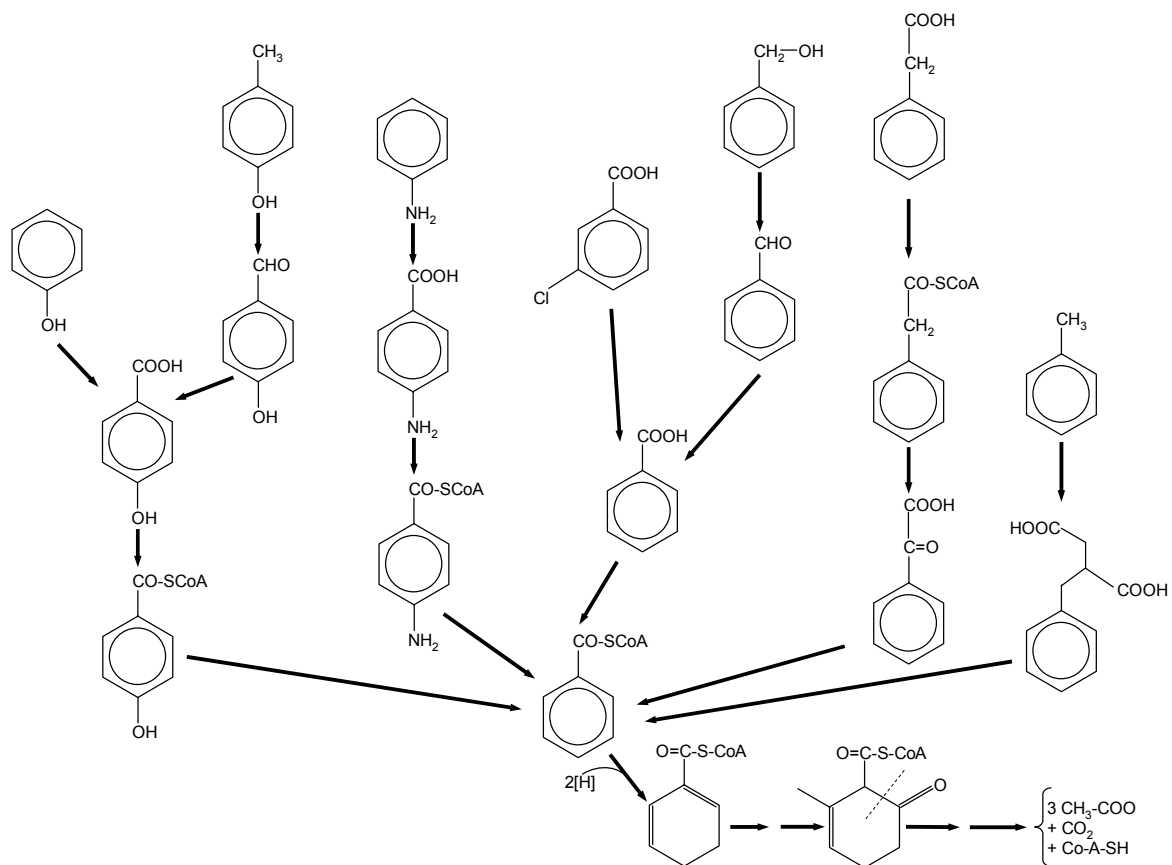


Figura 6. Degradarea anaerobă a compușilor aromatici mononucleari prin benzoil-CoA

de la hidrogen molecular, formiat sau alți compuși organici mai complecși sunt transferați substratului halogenat care eliberează restul organic într-o formă redusă, alături de clorură. În proces sunt implicate cuplurile redox  $\text{Co}^+/\text{Co}^{3+}$  din coenzime, respectiv  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  de pe suprafața mineralelor cu conținut de fier.

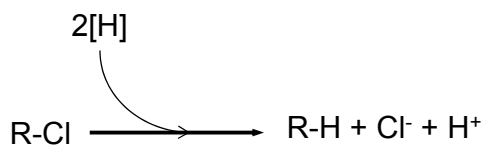


Figura 7. Dehalogenarea reducătoare a unui derivat organoclorurat

Eficiența biodegradării anaerobe a derivaților organoclorurați depinde atât de gradul de clorurare al compusului, cât și de tipul de acceptor de electroni, respectiv de tipul bacteriilor implicate în degradare (tabelul 4).

Dintre compușii nitroaromatici, ca poluant prezintă importanță deosebită 2,4,6 trinitrotoluenul (TNT), prezent în solul amplasamentelor vechilor fabrici și depozite de muniții. Efectul atrăgător de electroni al grupelor nitro face dificilă degradarea oxidativă a acestui compus. Bacterii strict anaerobe cum sunt bacteriile reducătoare de

sulfatați transformă TNT în TAT (triaminotoluen), parțial utilizat ca sursă de azot de către bacterii, restul probabil polimerizând în prezența urmelor de oxigen.

**Tabel 3.** Eficiența degradării unor compuși organici clorurați în diverse condiții anaerobe

Compusul	Eficiența degradării (%) pentru bacterii		
	Denitrificatoare	Sulfat reducătoare	Metanogene
percloretenă	0	13	86
cloroform	0	0	95
1,1,1-tricloroetan	30	72	> 99
tetraclorură de carbon	> 99	> 99	> 99

### *2.5. Degradarea mixtă a poluanților organici persistenti*

Poluanții organici sunt cu atât mai recalcitranti cu cât gradul de halogenare este mai ridicat. Substituțiile la nucleul aromatic cu halogeni, grupări nitro sau sulfonice conduc la creșterea rezistenței sistemului la atacul electrolit prin oxigenază al bacteriilor aerobe. Dintre compușii rezistenți la aceste atacuri fac parte și policloro-bifenolii (PCB), dioxinele clorurate, unele pesticide (DDT, lindan).

În cazul acestor poluanți, degradarea se face prin cooperarea între bacteriile aerobe și cele anaerobe. Într-o primă etapă are loc dehalogenarea reducătoare în condiții anaerobe a poluantului primar. Procesul reduce gradul de halogenare și face posibilă mineralizarea ulterioară în condiții aerobe. Astfel, de exemplu, are loc degradarea PCB (figura 8).

### *2.6. Mecanismul imobilizării poluanților organici și anorganici*

Pe lângă degradarea poluanților, microorganismele pot realiza imobilizarea poluanților, astfel încât aceștia să poată fi fixați în anumite zone ale solului. Există trei modalități de bază prin care poluanții pot fi imobilizați de către microorganismele:

- Biomasa microbiană poate adsorbi moleculele organice hidrofobe. O creștere suficientă a biomasei în zona de migrație a poluanților poate încetini sau chiar stopa mișcarea poluanților. Conceptul poartă denumirea de *biocortină*.

- Microorganismele pot produce specii reduse sau oxidate care provoacă precipitarea metalelor. De exemplu, oxidarea  $Fe^{2+}$  la  $Fe^{3+}$  conduce la precipitarea celui din urmă sub formă de  $Fe(OH)_3$  solid; reducerea ionilor  $SO_4^{2-}$  la sulfuri ( $S^{2-}$ ) provoacă precipitarea  $Fe^{2+}$  sau  $Hg^{2+}$  ca sulfuri; reducerea  $Cr^{6+}$  solubil și toxic la  $Cr^{3+}$  conduce la precipitarea acestuia din urmă ca oxid, sulfură sau fosfat; reducerea uraniului solubil  $U^{6+}$  la  $U^{4+}$  care precipită sub formă de  $UO_2$ .

- Microorganismele pot biodegrada compușii organo-metalici solubili, astfel încât metalul din complex să precipite și să fie imobilizat.

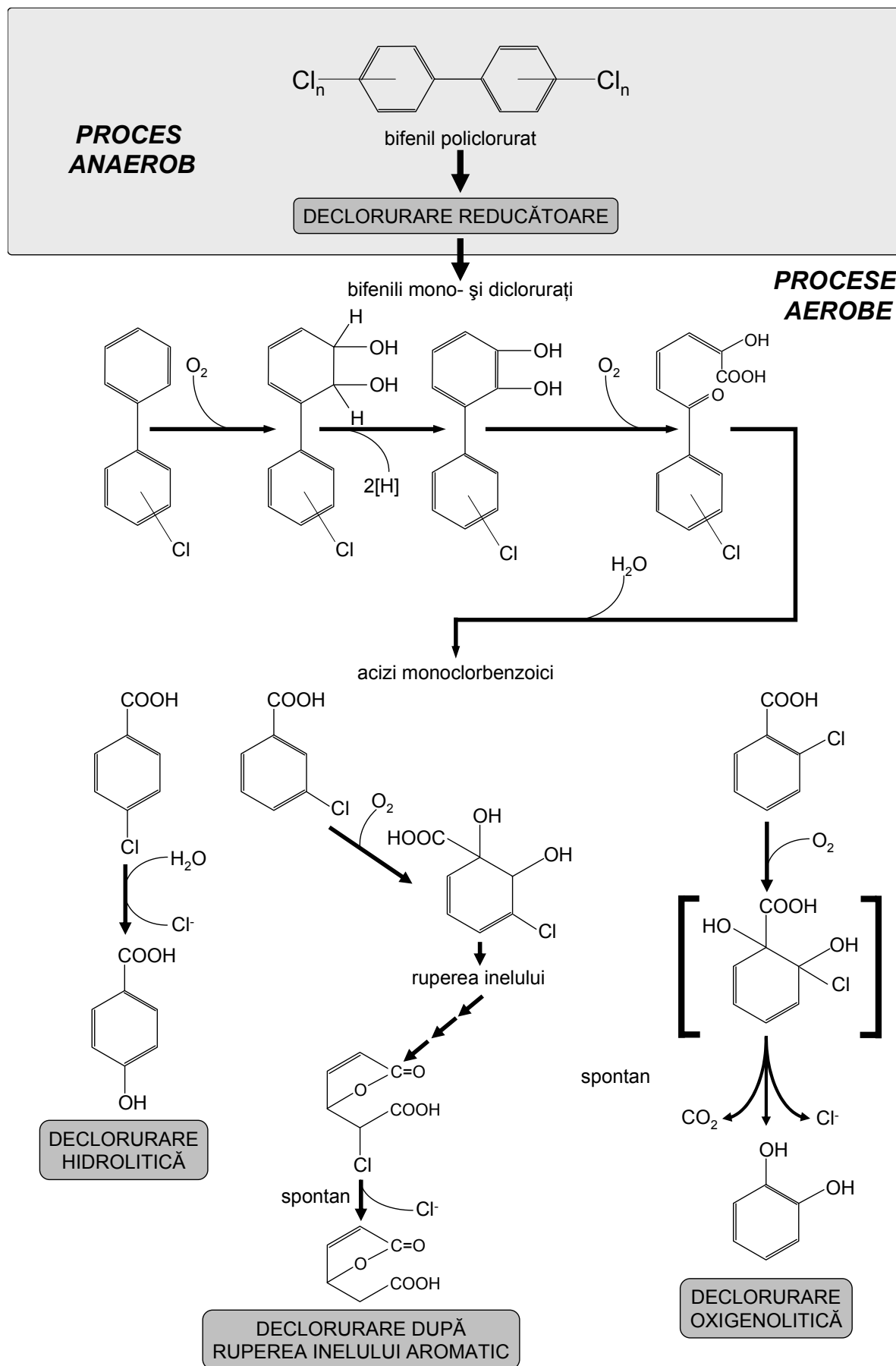


Figura 8. Degradarea policlorobifenolilor printr-o secvență de procese anaerobe și aerobe

### 3. Tehnologii de decontaminare și remediere a solurilor poluate

În cazul locațiilor contaminate cu poluanți sunt aplicate fie proceduri de securizare, fie proceduri de remediere. În timp ce remedierea asigură distrugerea sau reducerea cantitativă și calitativă a poluanților, securizarea are drept scop ridicarea de bariere pentru împiedicarea împrăstierii poluanților pe arii mai largi. Deoarece sursa de poluare rămâne, iar barierele ridicate sunt supuse degradării și îmbătrânirii, securizarea este doar o măsură temporară, tot remedierea rămânând procedura de aplicat.

Metodele de remediere se pot clasifica în funcție de locul de aplicare al acestora și în funcție de tipul proceselor implicate. Astfel, în primul caz deosebim procese *ex situ* și *in situ*, iar în al doilea caz deosebim procese termice, fizico-chimice și biologice. Procesele *ex situ* necesită excavarea solului contaminat urmată de tratarea acestuia fie pe loc (remediere *on-site*), fie într-o instalație externă de tratarea solului (remediere *off-site*). Tratamentul *in situ* se realizează fără a fi necesară excavarea solului, direct în situl contaminat.

*Procesele termice* de remediere se bazează pe transferul poluanților din matricea solului în faza gazoasă prin aport de energie termică. Poluanții sunt eliberați din sol prin vaporizare și apoi sunt incinerati, gazele reziduale fiind ulterior purificate.

*Procesele fizico-chimice* sunt, în general procese de extracție și/sau de clasare umedă. Principiul procedeelor de spălare *ex-situ* a solurilor constă în concentrarea poluanților într-o fracțiune reziduală cât mai redusă, apa fiind agentul de extracție cel mai frecvent utilizat. Pentru transferul contaminanților din sol către extractant, două mecanisme sunt importante: (i) crearea unor forțe de forfecare puternice, induse prin pompare, amestecare, vibrare sau prin utilizarea unor jeturi de apă de înaltă presiune, care să rupă aglomerațiile de particule poluate și nepoluate și să disperseze contaminanții în faza de extracție; (ii) dizolvarea contaminanților de către componentii fazei extractant. Extracția *in situ* constă în percolarea unui agent extractant apos prin solul contaminat. Percolarea se poate realiza prin șanțuri de suprafață, drenuri orizontale sau puțuri verticale de adâncime. Contaminanții solubili din sol se dizolvă în lichidul percolant care este pompat și tratat ulterior la fața locului.

*Procesele biologice* se bazează pe acțiunea microorganismelor care au capacitatea de a transforma poluanții organici în principal în CO<sub>2</sub>, apă și biomasă, sau de a immobiliza poluanții prin legare în fracțiunea humică a solului. Degradarea se realizează, de regulă, în condiții aerobe sau, mai rar în condiții anaerobe. Pentru eficientizarea procesului este esențială optimizarea condițiilor de dezvoltare a microorganismelor (aport de oxigen, pH, conținut de apă etc.). Stimularea activității biologice se poate realiza prin omogenizarea solului, aerare activă, umidificare sau uscare, încălzire, adăugare de nutrienți sau substraturi, inoculare cu microorganisme. Procesele biologice necesită un aport de energie mult mai redus decât cele termice sau fizico-chimice, dar necesită perioade de tratare mai îndelungate.

#### **4. Bioremedierea *in situ***

Principalul avantaj al procedeelor de remediere *in situ* este acela că solul poate fi tratat fără a fi necesare excavarea și transportul, reducându-se astfel semnificativ costurile tratării. Oricum, această modalitate de remediere necesită perioade mai îndelungate, iar uniformitatea tratării este mai puțin sigură, dată fiind variabilitatea caracteristicilor solurilor și acviferelor. În plus, este mai dificil de controlat eficacitatea procesului.

Tehnicile de bioremediere sunt tehnici destructive orientate către stimularea înmulțirii microorganismelor prin utilizarea contaminanților drept surse de hrană și energie. Crearea de condiții favorabile de dezvoltare microorganismelor implică, de regulă, asigurarea unor anumite combinații de oxigen, nutrienți și umiditate, precum și un control al temperaturii și pH-ului. Uneori, pentru îmbunătățirea procesului, se adaugă microorganisme adaptate pentru degradarea anumitor contaminanți.

Utilizarea proceselor biologice de remediere se realizează de regulă cu costuri scăzute. Contaminanții sunt distruși și rareori este necesară o tratare suplimentară a reziduurilor. Unele dezavantaje apar în cazul unor contaminanți specifici. De exemplu, biodegradarea HAP conduce la rămânerea în sol a HAP cu mase moleculare mari, recalcitrante și potențial cancerigene. Compușii polihalogenati sunt greu biodegradabili, iar unii dintre ei sunt transformați prin biodegradare în produși secundari și mai toxici (de exemplu, transformarea tricloretenei în clorură de vinil). Acești produși secundari pot fi mobilizați de către apele subterane, dacă nu sunt folosite tehnici de control adecvate. Bioremedierea *in situ* necesită o caracterizare amănunțită a solului, acviferului și contaminanților. Uneori poate fi necesară extracția și tratarea apei freatică, apa freatică cu grad redus de contaminare putând fi recirculată prin zona tratată pentru a-i furniza acesteia umiditatea necesară.

##### **4.1. Factori care influențează bioremedierea *in situ***

Deși nu toți compușii organici se pretează la biodegradare, bioremedierea *in situ* a fost aplicată cu succes pentru remedierea solurilor, nămolurilor și apelor subterane contaminate cu hidrocarburi din petrol, solvenți, pesticide, conservanți pentru lemn și alte produse organice. Compușii anorganici nu pot fi distruși prin bioremediere, dar pot fi extrași din sol sau imobilizați prin procese de fitoremediere.

Principalii parametri care influențează viteza cu care microorganismele degradează contaminanții sunt: natura și concentrația contaminanților, aportul de oxigen și nutrienți, umiditatea, temperatura, pH-ul, inocularea suplimentară a solului și co-metabolismul. Tehnicile de bioremediere *in situ* sunt sensibile la anumiți parametri ai solului. De exemplu, prezența compușilor argiloși sau humici provoacă variații în

performanțele procesului. Pentru a stabili eficiența bioremedierii în anumite condiții date este necesară efectuarea unor studii de tratabilitate.

Concentrația oxigenului în sol poate fi mărită prin evitarea saturării solului cu apă, evitarea compactării solului, evitarea existenței unor potențiale redox ridicate sau a unor concentrații reduse de materiale degradabile. Pentru a asigura furnizarea oxigenului cu o rată suficientă menținerii condițiilor aerobe, se poate utiliza injecția forțată de aer sau de peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ ). Utilizarea  $H_2O_2$  este limitată întrucât la concentrații ridicate (peste 100 ppm, sau 1000 ppm cu o aclimatizare propice) este toxică pentru microorganisme. În plus, peroxidul de hidrogen tinde să se descompună rapid în apă și oxigen în prezența anumitor componente ai solului.

Apa servește ca mediu de transport pentru nutrienți și contaminanții organici care pătrund în celula microbială, precum și pentru resturile metabolice care părăsesc celula. Un exces de apă poate dăuna întrucât poate inhiba circulația oxigenului prin sol, evident doar în cazul în care nu sunt dorite condiții anaerobe.

În lipsa nutrienților de creștere a celulelor (azot, fosfor, potasiu, sulf, magneziu, calciu, mangan, fier, zinc, cupru, alte elemente în urme), activitatea microbială este limitată. Azotul și fosforul sunt probabil nutrienții deficitari în mediul contaminat, ei fiind adăugați de regulă într-o formă asimilabilă: săruri de amoniu și fosfați. Fosfații pot provoca colmatarea solului ca rezultat al precipitării fosfaților de fier și de calciu stabili care umplu porii din sol și din acvifere.

Valoarea pH-ului influențează solubilitatea și, în consecință, disponibilitatea multor constituenți ai solului care pot afecta activitatea biologică. Multe metale potențial toxice pentru microorganisme sunt insolubile la valori pH ridicate; ca urmare, creșterea pH-ului sistemului de tratare utilizat poate reduce riscul otrăvirii microorganismelor.

Temperatura afectează activitatea microbială: scăderea temperaturii conduce la scăderea vitezei de biodegradare; astfel bioremedierea în zonele cu climat nordic poate fi ineficientă în anumite perioade ale anului. Microorganismele rămân însă viabile și la temperaturi sub 0 °C, reluându-și activitatea odată cu încălzirea solului. Încălzirea zonei supuse bioremedierii, prin injecție de aer cald, poate accelera procesul de remediere. Creșterea temperaturii peste un anumit prag poate fi nocivă, provocând sterilizarea solului. Creșterea temperaturii influențează și alte fenomene conexe bioremedierii, cum ar fi reducerea nebiologică a cantității de contaminanți, în special prin vaporizare. De regulă, solubilitatea contaminanților crește cu temperatura, deși solubilitatea unor hidrocarburi este mai ridicată la temperaturi joase. În plus, creșterea temperaturii micșorează solubilitatea oxigenului.

Studiile de tratabilitate sau de fezabilitate a bioremedierii se utilizează pentru a se verifica dacă bioremedierea este aplicabilă într-o situație dată. Complexitatea studiului depinde de natura contaminanților și de caracteristicile sitului. Pentru situri contaminate cu hidrocarburi obișnuite din petrol (benzină, de exemplu) este de regulă



suficientă examinarea probelor reprezentative în ceea ce privește prezența și nivelul populațiilor indigene de microorganisme, nivelul nutrienților, prezența substanțelor toxice pentru microorganisme, precum și analizarea unor caracteristici ale solului, cum ar fi: pH-ul, porozitatea, umiditatea.

Pentru a verifica eficiența bioremedierii sunt necesare caracterizări statistice privind situația în situri „înainte” și „după” tratamentul aplicat.

#### ***4.2. Atenuarea naturală monitorizată (ANM)***

Atenuarea naturală se bazează pe procese naturale de decontaminare sau atenuare a poluării în sol și ape subterane. În mod natural, în subsol pot avea loc următoarele procese prin care concentrația poluanților s-ar putea diminua sub limita admisibilă: diluția, volatilizarea, adsorbția, transformarea chimică și biodegradarea. Deși atenuarea naturală decurge în majoritatea siturilor poluate, este necesară existența unor condiții corespunzătoare pentru depoluare, altfel aceasta va fi incompletă sau insuficient de rapidă. Este necesară testarea sau monitorizarea acestor condiții pentru a verifica fezabilitatea atenuării naturale. ANM se pretează cel mai bine pentru utilizare în zonele în care sursa de poluare a fost îndepărtată.

ANM nu este sinonimă cu „neluarea nici unei măsuri”, deși aceasta este percepția cea mai frecventă. În comparație cu alte tehnologii de remediere, ANM prezintă o serie de avantaje ca: (i) generarea sau transferul redus de deșeuri; (ii) impactul redus asupra siturilor (nu se intervine cu structuri construite); (iii) aplicabilitate totală sau parțială într-un anumit sit, în funcție de condițiile concrete și de obiectivul remedierii; (iv) posibilitatea utilizării împreună sau după alte măsuri active de remediere; (v) costuri globale mai reduse decât în cazul remedierii active.

Poluanții susceptibili la eliminare prin ANM sunt compușii organici volatili și semivolatili (COV, COSV) precum și hidrocarburile existente în combustibili, anumite categorii de pesticide, precum și unele metale grele (Cr, de ex.) dacă există condiții de imobilizare a acestora prin modificarea stării de oxidare.

Printre dezavantajele ANM pot fi menționate: (i) necesitatea colectării datelor utilizate ca parametri de intrare în modelarea procesului; (ii) posibilitatea ca produșii intermediari de degradare să fie mai mobili sau mai toxici decât contaminantul inițial; (iii) posibilitatea migrării contaminanților înaintea degradării lor; (iv) posibilitatea imobilizării unor poluanți (Hg, de ex.) fără a putea realiza degradarea lor; (v) monitorizarea pe termen lung, cu costurile aferente; (vi) durata mai mare a ANM comparativ cu măsurile active de remediere; (vii) posibilitatea modificării în timp a condițiilor hidrologice și geochemice, care ar putea duce la refacerea mobilității poluanților în prealabil imobilizați; (viii) reticența opiniei publice la astfel de măsuri „pasive” de depoluare.

### **4.3. Bioremedierea îmbunătățită (BI)**

Este un proces în care microorganisme indigene sau inoculate (bacterii, fungii etc.) metabolizează poluanții organici din sol sau ape subterane, cu formare de produși stabili, nepoluanți. Pentru îmbunătățirea procesului, sau pentru desorbția poluanților din materialele subterane se pot adăuga nutrienți, oxigen, alte amendamente. BI poate implica utilizarea de culturi microbiene special cultivate pentru degradarea anumitor poluanți sau grupe de poluanți, sau pentru a rezista în condiții deosebit de severe de mediu. Uneori microorganismele din situl supus remedierii sunt colectate, cultivate separat și apoi reintroduse în sit ca mijloc de mărire rapidă a populației microbiene în situl respectiv. Alteori, deși mai rar, se pot adăuga alte tipuri de microorganisme în diferite etape ale procesului de remediere, ca urmare a modificării compoziției poluanților pe măsură ce procesul de bioremediere evoluează.

În cazul în care degradarea poluanților este un proces aerob, BI se poate realiza prin percolarea sau injecția în sol de apă freatică sau apă necontaminată cu conținut de nutrienți și saturată cu oxigen dizolvat. În locul oxigenului dizolvat se poate folosi o altă sursă de oxigen, de ex.  $H_2O_2$ . În cazul solurilor contaminate în stratul superficial, puțurile de injecție sunt înlocuite cu galerii de infiltrație sau cu sisteme de irigare la suprafață. Deoarece temperaturile scăzute încetinesc bioremedierea, solul poate fi acoperit cu diverse dispozitive de încălzire sau menținere a temperaturii, pentru accelerarea procesului.

Dacă prin degradare anaerobă rezultă intermediari sau produși mai periculoși decât poluanții inițiali (ex.: degradarea anaerobă a tricloretenei la clorură de vinil), se recomandă crearea ulterioară de condiții aerobe pentru neutralizarea acestora.

BI a fost aplicată cu succes pentru remedierea solurilor, nămolurilor și apelor subterane contaminate cu hidrocarburi din petrol, solvenți, pesticide, conservanți pentru lemn, alte substanțe organice. Studii pilot au arătat eficiența procesului la degradarea anaerobă a TNT din solurile contaminate cu reziduuri de muniții, mai ales după ce sursa a fost îndepărtată iar concentrația poluantului în sol este scăzută. Poluanții frecvent îndepărtați prin această tehnică sunt HAP, COSV nehalogenați și fracțiunile benzen-toluen-etibenzen-xileni (BTEX) din siturile poluate cu conservanți ai lemnului (creuzot) sau de pe amplasamentele unor rafinării.

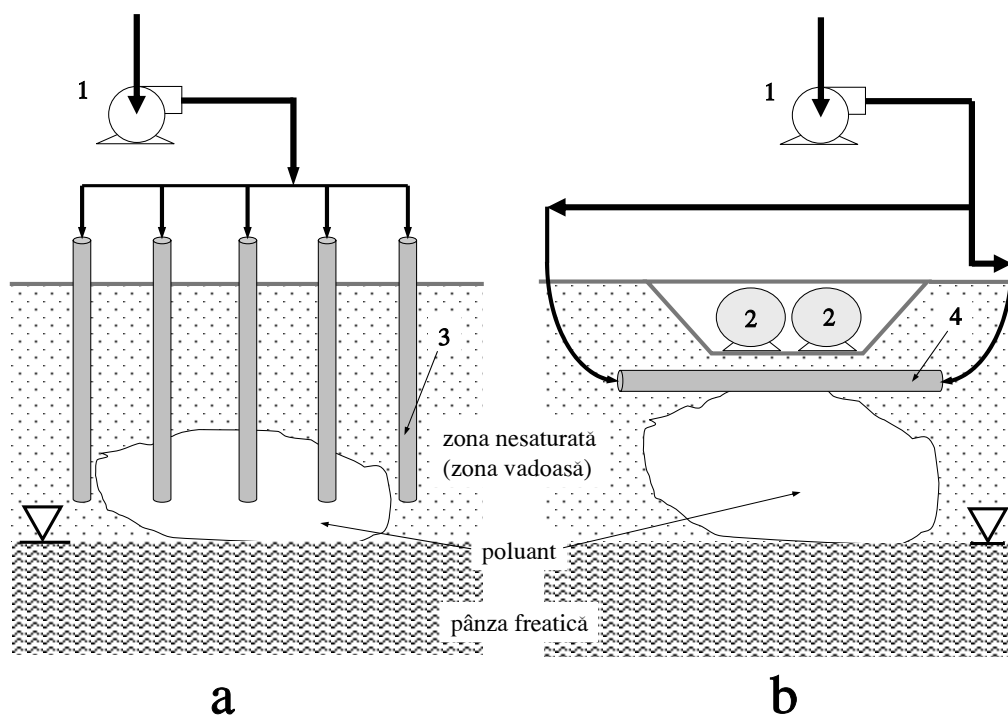
BI prezintă și o serie de limitări, cum ar fi: (i) ineficiența în cazul în care matricea solului nu permite contactul între poluanți și microorganisme; (ii) circulația soluțiilor apoase prin sol poate conduce la creșterea mobilității poluanților; (iii) colonizarea preferențială a microorganismelor poate produce înfundarea puțurilor de injecție a apei/nutrienților; (iv) curgerile preferențiale pot reduce considerabil contactul fluidelor injectate cu poluanții – procesul nu este recomandat pentru solurile argiloase, puternic stratificate sau eterogene; (v) concentrații ridicate de metale grele, compuși cu grad ridicat de clorurare, alcani cu catenă lungă, săruri anorganice sunt toxice pentru

microorganismele; (vi) scăderea vitezei procesului la scăderea temperaturii; (vii) necesitatea tratării la suprafață a apei freatică extrase (stripare cu aer sau tratare cu cărbune activ) înainte de re-injecție în sol sau depozitare.

BI poate fi considerată o tehnologie pe termen lung, curățirea unui sit putând dura între 6 luni și 5 ani, în funcție și de specificul local. Costurile aferente tehnologiei variază între 30 – 100 USD/m<sup>3</sup> de sol tratat.

#### 4.4. Bioaerarea

Bioaerarea este un procedeu prin care biodegradarea aerobă *in situ* este stimulată prin aport suplimentar de oxigen către bacteriile solului. Spre deosebire de procedeu de extracție a vaporilor din sol, bioaerarea utilizează debite scăzute de aer, atât cât să susțină activitatea microbiologică. Uzual oxigenul este adăugat în sol prin injecție directă de aer în situl contaminat. Injecția de aer se poate realiza în puțuri verticale sau în canale orizontale (figura 9). Pe lângă accelerarea degradării, bioaerarea are și un efect secundar, acela de a deplasa poluanții volatili prin solul activat. Procedeu se aplică, de regulă, în zona nesaturată a solului (zona vadoasă) și se pretează tuturor compușilor care pot fi biodegradați aerob.



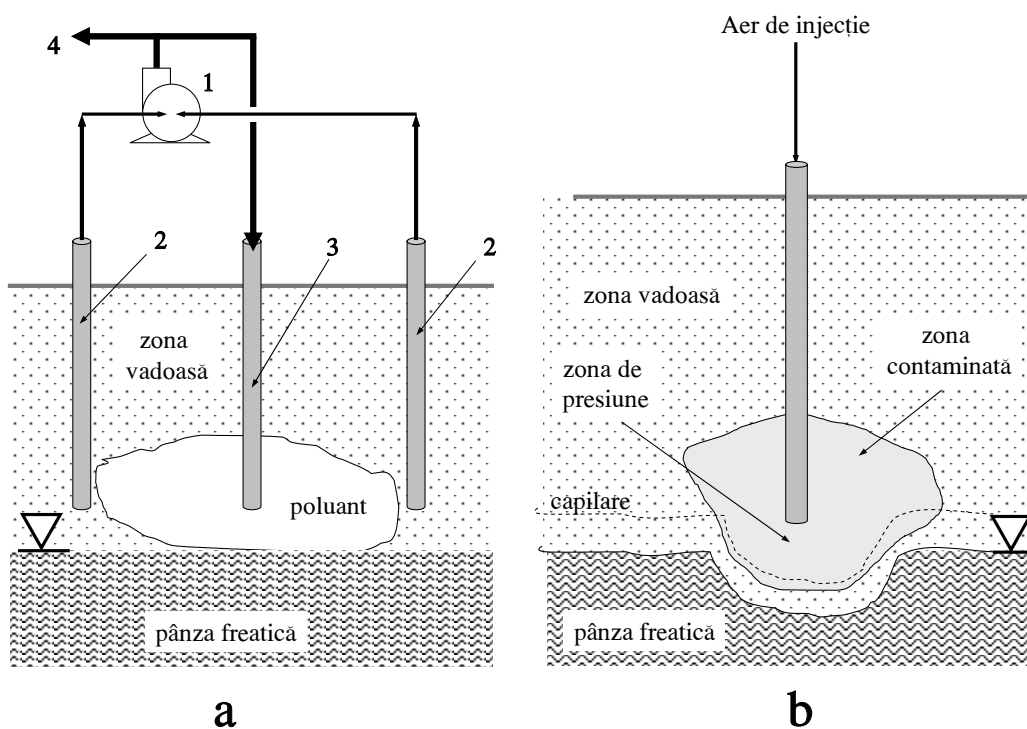
**Figura 9.** Schema de principiu a bioaerării: a – injecție verticală; b – injecție orizontală;  
 1 – compresor; 2 – rezervor de combustibil (sursă de poluare); 3 - puțuri verticale;  
 4 – conducte orizontale de injecție

Pentru realizarea corespunzătoare a procesului trebuie ca aerul să fie capabil de a traversa solul într-o cantitate suficientă pentru menținerea condițiilor aerobe, ceea ce înseamnă un conținut de minimum 2% O<sub>2</sub> în sol și în sol să fie prezente într-o

concentrație corespunzătoare populații bacteriene apte pentru degradarea poluanților organici – minim  $10^5$  UFC/g sol, optim  $10^7 - 10^8$  UFC/g sol. Sunt necesare teste prealabile pentru determinarea permeabilității solului la aer, precum și teste de respirație *in situ*.

Principalii factori care limitează bioerarea sunt: (i) condiții hidrogeologice improprii (pânza freatică foarte apropiată de suprafață, lentile de sol saturat, permeabilitate redusă a solului); (ii) umiditatea extrem de scăzută a solului (la sub 2% masice umiditate, activitatea microbiană este inhibată); (iii) umiditatea prea ridicată a solului (reduce permeabilitatea aerului și scade rata de transfer a oxigenului); (iv) temperaturile scăzute.

Pe lângă schema tehnologică tipică redată în fig. 9, există și alte posibilități tehnice de a realiza bioerarea: în circuit închis, sau prin deshidratare sub presiune (figura 10). În cazul aplicării circuitului închis se maximizează cantitatea de poluant biodegradată, prin recircularea oxigenului care nu este consumat în totalitate la o singură trecere. Solul din zona vadoasă devine un bioreactor cu recircularea fazei gazoase, în care doar 10% din debitul de aer recirculat trebuie înlocuit cu aer proaspăt. În cazul deshidratării sub presiune, aerul este injectat sub presiune chiar deasupra nivelului pânzei freactice. În zona respectivă are loc deshidratarea solului, pânza freatică se deformează, iar zona contaminată este expusă acțiunii oxigenului din aer. Se accelerează astfel degradarea poluanților din capilare, îmbunătățindu-se totodată calitatea apei subterane, fără a mai fi necesară remedierea directă a acesteia.



**Figura 10.** Tehnici alternative de bioerare: a - în circuit închis; b - prin deshidratare sub presiune; 1 - compresor; 2 - puțuri de extracție a aerului; 3 - puțuri de injecție a aerului; 4 – evacuare parțială în atmosferă

Până în prezent bioaerarea a fost utilizată cu succes la remedierea unor soluri contaminate cu produse petroliere, solvenți neclorurați, anumite pesticide, conservanți pentru lemn etc. Cele mai rapide rezultate se obțin la degradarea componentelor cele mai toxice, solubile și mobile din componența carburanților: benzen, toluen, etilbenzen, xileni. În mai puțin de un an, cantitatea acestora din sol se reduce cu peste 90%. Degradarea majorității compușilor clorurați se poate realiza numai prin utilizarea unor co-metaboliți (injectând metan în sol, de ex.), sau prin existența unui ciclu anaerob.

Bioaerarea este o tehnologie aplicabilă pe termen mediu spre lung. Rezultate vizibile se obțin în luni până la ani. Există cercetări referitoare la extinderea bioaerării la solurile cu permeabilitate scăzută, prin injecție de oxigen în loc de aer; în zone cu climă rece, prin încălzirea solului; la bioremedierea compușilor recalcitranti (HAP, pesticide), prin ozonizarea aerului injectat în sol. Costurile bioaerării scad la creșterea volumului de sol tratat: la 600 m<sup>3</sup> sol, costurile sunt de 928 – 970 USD/m<sup>3</sup>, în timp ce la 13000 m<sup>3</sup> de sol costurile scad la 79 – 109 USD/m<sup>3</sup>.

#### ***4.5. Fitoremedierea***

Sub denumirea generală de fitoremediere sunt cuprinse acele procese care utilizează plantele pentru îndepărtarea, transferul, stabilizarea și distrugerea contaminanților din sol, apă, sedimente. Metodele de fitoremediere oferă un potențial semnificativ pentru anumite aplicații și permit remedierea unor situri mult mai mari decât ar fi posibil în cazul utilizării unor tehnologii tradiționale de remediere. Un număr mare de specii de plante (peste 400 la ora actuală), începând cu ferigile pteridofite și terminând cu angiosperme ca floarea-soarelui sau plopul, pot fi utilizate pentru îndepărtarea poluanților prin intermediul mai multor mecanisme. Mecanismele fitoremedierii includ biodegradarea intensificată în rizosferă (rizodegradarea), fitoextracția (fitoacumularea), fitodegradarea și fitostabilizarea.

*Rizodegradarea* are loc în porțiunea de sol care înconjoară rădăcinile plantelor. Substanțele naturale eliberate de rădăcinile plantelor servesc drept substrat pentru microorganismele prezente în rizosferă, accelerând astfel degradarea contaminanților. Rădăcinile plantelor afânează solul, lasând loc pentru transportul apei și aerare. Acest proces tinde să împingă apa către zona de suprafață și să deshidrateze zonele saturate mai joase.

*Fitoextracția* este procesul prin care rădăcinile plantelor absorb împreună cu apa și nutrienții și contaminanții din sol (metalele, în special). Contaminanții nu sunt distruși, dar se acumulează în rădăcinile, tulpinile și frunzele plantelor, care pot fi recoltate în vederea îndepărtării și distrugerii contaminanților. Procesul de extracție depinde de abilitatea plantelor de a crește în soluri cu concentrații ridicate de metale și de capacitatea acestora de a extrage din sol metalele în condițiile climaterice specifice

solului respectiv. Pentru fitoextracție se pot folosi fie plante cu capacitate naturală excepțională de a acumula metale, așa numiții *hiperacumulatori*, fie plante care produc cantități ridicate de biomasă (porumb, orz, mazăre, ovăz, orez, muștar indian) asistate chimic cu adaosuri de substanțe care îmbunătățesc capacitatea de extracție a metalelor. Adaosurile de acid citric, acid oxalic, acid galic, acid vanilic, chelatanți clasici ca etilendiaminotetraacetat - EDTA și dietilentriaminopentaacetat - DTPA sau chelatanți biodegradabili ca etilendiaminodisuccinat – EDDS, metilglicindiacetat – MGDA îmbunătățesc substanțial extracția din sol a Zn, Cd, Cu și Ni. Aceste adaosuri prezintă însă riscul de a mobiliza metalele în apele subterane. Numărul hiperacumulatorilor în regnul vegetal este redus: circa 400 de specii de plante vasculare, marea majoritate prezentând o afinitate deosebită pentru Ni. Prin definiție, hiperacumulatorii trebuie să acumuleze cel puțin 100 mg/g Cd sau As, 1000 mg/g Co, Cu, Cr, Ni sau Pb, 10000 mg/g Mn sau Ni. Anumite specii de ferigi prezintă o capacitate deosebită de acumulare pentru As – până la 23000 mg/kg în lăstarii speciei *Pteris vitata*. Hrișca obișnuită (*Fagopyrum esculentum* Moench) poate acumula în tulpini până la 4200 mg/kg Pb, fiind prima specie hiperacumulatoare de Pb care are și o productivitate ridicată în biomasă. Alte plante cu potențial pentru fitoextracție sunt cele din genul *Brassica*: *Brassica juncea* (muștarul indian) pentru Cd, Cr(VI), <sup>137</sup>Cs, Cu, Ni, Pb, U, Zn, *Brassica napus* (napul) pentru Pb, Se, Zn, *Brassica oleracea* (varza ornamentală) pentru <sup>137</sup>Cs, Ni, As, Tl. Extracția Hg biodisponibil din sol se poate realiza cu orz, grâu, lupin galben (*Lupinus luteus*), iarba câinelui (*Cynodon dactylon*).

*Fitodegradarea* este procesul de metabolizare a contaminanților în țesuturile vegetale. Plantele produc enzime (dehalogenaze, oxigenaze) care favorizează degradarea catalitică a contaminanților ajunși în țesutul vegetal. Este studiată posibilitatea degradării concomitente a compușilor aromatici și a compușilor alifatici clorurați prin această metodă.

*Fitostabilizarea* este procesul bazat pe capacitatea anumitor plante de a produce compuși chimici care pot lega, la interfața rădăcină - sol, într-o formă inactivă, cantități importante de compuși toxici (îndeosebi metale grele), împiedicând astfel răspândirea lor în apele subterane sau în alte medii. Uzual, solul supus fitostabilizării este arat, tratat cu diverse amendamente pentru fixarea rapidă a metalelor (var, îngrășaminte fosfatice, oxihidroxizi de Fe sau Mn, minerale argiloase etc.), după care este însămânțat cu plante cunoscute ca slabi translocatori ai metalelor, astfel încât acestea să nu ajungă în părțile plantei care pot fi consumate de animale. Iarba vântului (*Agrostis tenuis*) și păiușul roșu (*Festuca rubra*) sunt folosite în aplicații comerciale pentru fitostabilizarea solurilor contaminate cu Pb, Zn sau Cu.

*Rizofiltrarea* este similară fitoacumulării, cu observația că se aplică doar efluenților lichizi. Plantele sunt crescute fără sol și sunt transportate în ariile contaminate. Pe măsură ce rădăcinile se saturează cu contaminanți, se recoltează și se depozitează.

*Fitovolatilizarea* este procesul prin care plantele absorb apa contaminată cu compuși organici pe care îi elimină apoi în atmosferă prin intermediul frunzelor. Și unele metale (Hg, As, Se) pot fi eliminate sub formă de compuși gazoși, dar toxicitatea acestora pune la îndoială eficacitatea acestei metode. Plante de tutun (*Nicotiana tabacum*) modificate genetic au fost utilizate pentru sorbția mercurului și a metilmercurului din sol, urmată de eliberarea acestora în atmosferă ca oxid de mercur.

*Influența hidrolică* este procesul prin care arborii în special facilitează procesele de remediere, influențând mișcarea apei din pânza freatică. Arborii acționează ca pompe naturale atunci când rădăcinile lor ajung sub oglinda apei freactice, stabilind o rețea densă de rădăcini care preiau cantități importante de apă. Spre exemplu, o specie de plop (*Populus deltoides*) ajunsă la maturitate poate absorbi până la 1,3 m<sup>3</sup> de apă zilnic.

În concluzie se poate defini fitoremedierea ca procesul de utilizare *in situ* a plantelor vii pentru tratarea solurilor, nămolurilor și apelor subterane, prin îndepărtarea, degradarea sau imobilizarea poluanților existenți. Tehnicile de fitoremediere sunt potrivite pentru ariile în care contaminarea este de nivel scăzut până la moderat, suficient de aproape de suprafață, și într-o zonă puțin adâncă. Cu aceste limitări, fitoremedierea poate fi aplicată pentru diferitelor categorii de poluanți: metale, pesticide, solvenți, explozivi, țiței brut, HAP, diferiți compuși organici, scurgeri de la depozitarea deșeurilor menajere. Specia vegetală frecvent utilizată în proiectele de fitoremediere este deocamdată plopul. Acest arbore crește rapid, poate supraviețui în condiții climaterice variate, iar în comparație cu alte specii poate extrage cantități mari de apă din acvifere sau din sol, extrăgând astfel și poluanții solubilizati din mediul contaminat.

Fitoremedierea este o tehnologie nouă, încă în fază de dezvoltare, aplicațiile sale practice fiind relativ recente. Primele cercetări s-au făcut la începutul anilor 1990, o serie de tehnici fiind aplicate cu rezultate rezonabile în unele situri poluate. Dintre dezavantajele fitoremedierii se pot menționa: (i) limitarea adâncimii zonei tratate în funcție de plantele utilizate - în majoritatea cazurilor procedeul este aplicabil pentru poluanți aflați aproape de suprafață; (ii) concentrații ridicate de materiale periculoase pot fi toxice pentru plante; (iii) prezintă aceleași limitări privind transferul de masă ca și celelalte tehnologii de bioremediere; (iv) poate avea caracter sezonier, depinzând de locația geografică a ariei supuse bioremedierii; (v) poate transfera poluanții între diverse medii (din sol în aer, de ex.); nu este eficientă pentru contaminanții puternic adsorbiți, cum ar fi PCB; (vi) toxicitatea și biodisponibilitatea produșilor de biodegradare nu este întotdeauna cunoscută; (vii) produșii de biodegradare pot fi mobilizați în apa freatică sau se pot bioacumula în regnul animal, prin intermediul lanțului trofic; (viii) fiind încă în fază demonstrativă, este relativ nefamiliar forurilor legislative.

Costurile fitoremedierii sunt scăzute: pentru extragerea poluanților dintr-un strat de sol de 50 cm adâncime costurile variază între 30 – 50 USD/m<sup>3</sup> (aproximativ 150000 – 250000 USD/ha). Un hectar de sol contaminat tot la 50 cm, dar tratat *ex situ* prin biodegradare în straturi excavate costă între 0,99 și 4,2 milioane USD.

## **5. Bioremedierea *ex situ***

Principala caracteristică a tehnologiilor de bioremediere *ex situ* este aceea că solul este mutat din amplasamentul său inițial, fie într-o instalație adecvată, fie în altă parte a aceluiași sit. Principalele avantaje ale tehnologiilor *ex situ* sunt optimizarea condițiilor de lucru, un mai bun control al procesului, o monitorizare mai simplă și mai precisă. În plus, adăugarea de microorganisme specializate în biodegradarea anumitor contaminanți este mai ușor de realizat și mai sigură. Aceste tehnologii sunt preferate în cazul poluărilor localizate, în zonele în care concentrația poluanților este relativ ridicată, iar adâncimea la care se găsesc nu este prea mare. Pricipalele dezavantaje sunt costurile suplimentare legate de excavare și transport, riscurile răspândirii poluanților prin aceste manevre sau poluarea secundară generată de mutarea solului. În plus, este necesar un spațiu suplimentar pentru tratare. Costurile, în general, sunt mai ridicate decât în cazul bioremedierii *in situ*.

### **5.1. Bioremedierea în mobile statice (BMS)**

Bioremedierea în mobile statice este o tehnologie în care solul excavat este amestecat cu diverse amendamente și așezat pe o zonă de tratare prevăzută cu un sistem de colectare a scurgerilor și posibilități de aerare. Se utilizează pentru reducerea concentrației produșilor petrolieri din sol prin biodegradarea acestora. Pentru îmbunătățirea biodegradării se reglează umiditatea, căldura, conținutul de nutrienți și oxigen, pH-ul.

Zona de tratare este acoperită sau inclusă într-un strat impermeabil pentru minimizarea riscului scurgerii contaminanților în solul nepoluat. Scurgerile colectate pot fi de asemenea tratate într-un bioreactor înainte de recirculare. La ora actuală există diverse variante comerciale ale procedului, în care rețete speciale de nutrienți și aditivi sunt încorporate în sol pentru stimularea biodegradării. Aceste rețete sunt de regulă elaborate în funcție de condițiile specifice ale sitului tratat.

Mobilele de sol au un sistem de aerare îngropat, prin care circulația aerului se realizează prin depresiune (vacuum) sau suprapresiune. Înălțimea mobilelor poate atinge până la 7 m, dar înălțimea recomandată este de maximum 2 – 3 m. Mobilele pot fi acoperite cu folii de plastic pentru controlul evaporării apei și volatilizării compușilor organici, precum și pentru favorizarea încălzirii solare. Dacă în sol există



COV care trec în fluxul de aer, aerul care părăsește solul poate fi tratat pentru îndepărtarea sau distrugerea COV înainte de descărcarea în atmosferă.

BMS este o tehnologie aplicabilă pe termen scurt: săptămâni până la câteva luni. Tehnologia se pretează bine la distrugerea COV monohalogați precum și a hidrocarburilor din combustibili. Poate fi aplicată și la tratarea anumitor COV halogați, COSV, pesticide, cu o eficiență variabilă.

Printre dezavantajele BMS se pot menționa: (i) necesitatea excavării solului; (ii) procesele în fază solidă au o eficiență discutabilă în cazul derivaților halogați și pot fi ineficiente în cazul reziduurilor provenite de la utilizarea explozivilor; (iii) la aceeași dimensiune a șarjei, timpul necesar decontaminării complete este mai ridicat decât în cazul bioremedierii în fază de noroi; (iv) procesul fiind static, tratarea este mai puțin uniformă decât în cazul proceselor care implică o amestecare periodică a fazei solide.

Costurile tratării depind de tipul contaminantului, necesitatea pre- sau posttratării, necesitatea unor echipamente pentru controlul emisiilor atmosferice. BMS este o tehnologie relativ simplă, cu un necesar redus de personal de operare și întreținere. Costurile tipice sunt de 130 – 260 USD/m<sup>3</sup> de sol tratat.

## *5.2. Compostarea*

Compostarea este un proces biologic controlat prin intermediul căruia o serie de contaminanți organici sunt transformați aerob sau anaerob de către microorganisme în produse netoxice. Solul contaminat excavat este amestecat cu agenți de afânare și amendamente organice (rumeguș, fân, gunoi de grajd, resturi vegetale etc.). Alegerea corectă a amendamentelor asigură o porozitate adecvată, precum și un echilibru carbon-azot care să asigure condiții termofile (54 – 65 °C) de dezvoltare a microorganismelor. O eficiență maximă a degradării se obține prin aerare (întoarcerea zilnică a mobilelor de compost), irigare (dacă este necesar) și o monitorizare atentă a temperaturii și a conținutului de umiditate. În timpul compostării pot avea loc emisii în atmosferă dacă în solul contaminat sunt prezenți COV sau COSV, caz în care sunt necesare echipamente pentru controlul emisiilor.

Există trei variante tehnologice de realizare a compostării:

- compostarea în mobile statice aerate: compostul este clădit în mobile și aerat prin intermediul unor suflante sau al unor pompe de vid;
- compostarea în reactoare cu agitare mecanică: compostul este introdus într-un vas de reacție în care este amestecat și aerat;
- compostarea în mobile lungi: compostul este clădit în mobile lungi, fiind periodic amestecat cu echipamente mobile. Aceasta este considerată ca fiind cea mai ieftină alternativă de compostare.

Compostarea se poate aplica solurilor și sedimentelor contaminate cu compuși organici biodegradabili. Studii pe instalații pilot și în teren au arătat că prin compostare

aerobă termofilă este posibilă reducerea concentrației trinitrotoluenului, picratului de amoniu, a HAP până la nivele acceptabile. În 40 de zile de operare, conținutul de TNT din sol poate fi redus cu 99,7%, mare parte a degradării având loc în primele 20 de zile de tratare.

Ca dezavantaje se pot menționa: (i) necesitatea unui spațiu substanțial pentru compostare; (ii) apariția emisiilor de COV la excavarea solului; (iii) creșterea volumului materialului solid în urma compostării, ca urmare a adaosurilor de amendamente; (iv) imposibilitatea reducerii conținutului de metale grele.

Costurile compostării sunt funcție de volumul de sol tratat, fracția de sol din compost, disponibilitatea amendamentelor, tipul contaminantului, varianta tehnologică de compostare aleasă. La un volum de sol de circa 15000 m<sup>3</sup> contaminat cu explozivi, costurile de tratare sunt de 249 USD/m<sup>3</sup> la compostarea în movile lungi, 308 USD/m<sup>3</sup> la compostarea în movile statice aerate și 380 USD/m<sup>3</sup> la compostarea în reactoare cu agitare mecanică.

### ***5.3. Biodegradarea în straturi preparate (BSP)***

Biodegradarea în straturi preparate (landfarming) este o tehnologie de bioremediere a solurilor, sedimentelor sau nămolurilor contaminate prin excavare, așezare în straturi amplasate pe un suport impermeabil. Periodic straturile sunt răsturnate sau lucrate pentru aerare. De cele mai multe ori, condițiile din strat sunt controlate pentru optimizarea vitezei de degradare a poluanților. Se practică controlul umidității (prin irigare sau pulverizare de apă), aerării (prin lucrarea solului cu o frecvență prestabilită are loc amestecarea și aerarea), pH-ului (prin neutralizare cu piatră de var sfărâmată sau cu var agricol), amendamentelor (prin adăugare de afânători, nutrienți etc.).

Mediul contaminat este tratat în straturi cu grosimea de până la 40 – 45 cm. Când este atins nivelul de tratare dorit, stratul tratat este îndepărtat, clădindu-se altul nou. Se recomandă însă doar îndepărtarea vârfului stratului tratat, noul strat clădindu-se prin adăugare de material contaminat și amestecare cu materialul rămas. În felul acesta materialul contaminat proaspăt adăugat este inoculat cu culturi microbiene active, reducându-se astfel durata tratării.

O variantă a BSP este tratarea solului (TS sau land treatment), când solurile, sedimentele sau nămolurile contaminate sunt afânate cu dispozitive mecanice mobile și lăsate să interacționeze cu solul pe care sunt amplasate. Interacțiunea dinamică dintre deșeurile, sol, climă și activitatea microbiană conduce la degradarea, transformarea și imobilizarea constituentilor poluanți. Ca și în cazul BSP, este necesar controlul umidității, aerării, pH-ului, adaosului de amendamente. În plus sunt necesare măsuri suplimentare de siguranță pentru evitarea contaminării apelor freatice și de suprafață, a aerului, sau prin intermediul lanțului trofic.

BSP și TS sunt tehnologii cu aplicabilitate pe termen mediu și lung. Ele au fost demonstrate cu succes în tratarea hidrocarburilor petroliere grele (motorine, nămoluri petroliere), reziduurilor de cocsare, a conservanților pentru lemn (pentaclorfenol, creuzot) și a anumitor pesticide. Hidrocarburiile cu masă moleculară mică se evaporă și se transferă în atmosferă înainte de a putea fi degradate prin aceste tehnologii.

Ca dezavantaje ale acestor tehnologii se pot menționa: (i) necesitatea unor spații largi; (ii) controlul precar al anumitor factori (precipitații, temperatură) care afectează biodegradarea; (iii) imposibilitatea degradării poluanților anorganici; (iv) necesitatea pretratării COV care altfel s-ar volatiliza în atmosferă provocând poluarea acesteia; (v) necesitatea controlului prafului emanat în timpul lucrării solului; (vi) necesitatea construirii și supravegherea funcționării unor dispozitive de captare a apelor meteorice; (vii) anumite deșeuri sunt restricționate la aplicarea pe sol (anumite nămoluri petroliere, de ex.), ele neputând fi tratate prin aceste tehnologii.

Aplicarea acestor tehnologii implică atât costuri anterioare aplicării și independente de volumul tratat (25000 – 50000 USD pentru studii de laborator, până la 100000 USD pentru studii pe pilot și experimentări în teren), precum și costuri de exploatare, care nu depășesc 100 USD/m<sup>3</sup>.

#### ***5.4. Bioremedierea în fază de noroi (BFN)***

Principiul tehnologiei de bioremediere în fază de noroi constă în realizarea unei suspensii consistente (noroi) alcătuită din sol, sedimente sau nămol, apă și alți aditivi. Noroiul este amestecat pentru menținerea în suspensie a solidelor și pentru a permite contactul microorganismelor cu contaminanții din sol. După realizarea biodegradării, noroiul este deshidratat, faza solidă rezultată fiind adusă pe amplasamentul original sau utilizată în alte scopuri.

BFN necesită tratarea controlată a solului excavat într-un bioreactor. În prealabil din sol se separă pietrele și molozul, după care se diluează cu apă la o concentrație depinzând de concentrația poluanților, viteza biodegradării și de natura fizică a solului. În unele variante se practică o prespălare a solului în vederea concentrării contaminanților. Nisipul curat poate fi îndepărtat, rămânând pentru alimentarea bioreactorului doar particulele fine de sol contaminat și apele de spălare. Noroaiele tipice conțin 10 – 30% masice de fază solidă. Suspensia se trece într-un bioreactor cu agitare unde se adaugă nutrienți și oxigen. Dacă este necesar, se face o corecție de pH prin adăugare de acizi sau baze. Se pot adăuga și culturi microbiene în cazul în care specia adecvată nu este prezentă în solul de tratat. La terminarea biodegradării, suspensia de sol se supune deshidratării, utilizându-se în acest scop decantoare, filtre sub presiune sau la vid, paturi uscătoare de nisip sau centrifuge.

BFN este o tehnologie pe termen scurt către mediu. Timpul de staționare în bioreactor este funcție de natura poluanților, concentrația lor și de gradul de

îndepărtare dorit. Uzual sunt necesare 5 zile pentru distrugerea pentaclorfenolului, 13 zile pentru remedierea solului contaminat cu pesticide și 60 de zile pentru decontaminarea nămolului de rafinare.

Pâna în prezent, BFN a fost aplicată cu succes la remedierea solurilor, nămolurilor și sedimentelor contaminate cu explozivi, produse petroliere, produse petrochimice, solvenți, pesticide, conservanți pentru lemn și alte substanțe organice. Bioreactoarele sunt preferate față de tehnicile de remediere *in situ* în cazul solurilor greu permeabile, a solurilor eterogene, în cazul în care apele freatice care înconjoară zona poluată sunt greu de captat, sau atunci când tratarea trebuie realizată rapid.

BFN se utilizează în special pentru tratarea COV și COSV nehalogenați din soluri excavate sau din sedimente dragate, precum și pentru tratarea solurilor contaminate din poligoanele de artilerie. Bioreactoarele în care se adaugă co-metaboliți și microorganisme special adaptate pot fi utilizate pentru tratarea COV și COSV halogenați, pesticidelor și PCB. Bioreactoare secvențiale anaerob/aerob se pot utiliza pentru tratarea PCB, COSV halogenați, pesticidelor și reziduurilor explozivilor de artilerie. Există și unități mobile de tratare, care pot fi deplasate rapid în diverse zone.

Factorii care limitează aplicabilitatea și eficiența BFN sunt: (i) necesitatea excavării, excepție făcând tratarea în lagune; (ii) clasarea materialelor înainte de introducere în reactor poate fi dificilă și costisitoare; (iii) solurile neomogene sau argiloase pot crea probleme serioase de manipulare; (iv) deshidratarea particulelor fine rezultate în urma tratării poate fi costisitoare; (v) este necesară găsirea unei metode acceptabile de utilizare a apelor uzate nereciclate în proces.

Costul tratării prin procedeul BFN variază între 130 – 200 USD/m<sup>3</sup>, respectiv între 160 – 210 USD/m<sup>3</sup> în cazul în care gazele rezultate din bioreactor trebuiesc ulterior tratate datorită prezenței compușilor volatili.

## **Bibliografie**

1. Aeckersberg F., Rainey F.A., Widdel F. - Arch. Microbiol. 1998, 170, 361.
2. Alexander M. - Biodegradation and Bioremediation, Academic Press, San Diego, 1994.
3. Al-Garni S.M. - Water SA 2005, 31, 345, disponibil la: <http://www.wrc.org.za>.
4. Al-Najar H., Schulz R., Römheld V. - Phytoremediation of Thallium Contaminated Soils by *Brassicaceae*, în: Environmental Chemistry: Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems (Ed. Lichtfouse E., Schwarzbauer J., Robert D.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2005, 187.
5. Cheremisinoff N.P. - Biotechnology for Waste and Wastewater Treatment, Noyes Publications, Westwood, 1996.
6. Cookson J.T. - Bioremediation Engineering: Design and Application, McGraw-Hill, New York, 1994.
7. do Nascimento C.W.A. - Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.) 2006, 63, 276.
8. do Nascimento C.W.A., Xing B. - Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.) 2006, 63, 299.

9. Doble M., Kruthiventi A.K., Gaikar V.G. - *Biotransformations and Bioprocesses*, Marcel Dekker, New York, 2004.
10. Douay F., Pruvot C., Dubourguier H.C., François M., Sterckeman T., Ciesielski H. - Comportement physico-chimique et transfert des métaux lourds vers l'hydrosphère et la biosphère autour des deux usines métallurgiques du nord de la France, în: *Actes du deuxième Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée COFrRoCA-2002* (Ed. Gavrilă L., Fînaru A., Grandclaudon P.), Alma Mater Bacău, Tehnica-Info Chișinău, 2002, 321.
11. Dubourguier H.C., Kahru A., Douay F. - Potentialités des traitements biologiques de sols pollués issus de cokeries, în: *Actes du deuxième Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée COFrRoCA-2002* (Ed. Gavrilă L., Fînaru A., Grandclaudon P.), Alma Mater Bacău, Tehnica-Info Chișinău, 2002, 4.
12. Ducic T., Polle A. - *Braz. J. Plant Physiol.* 2005, 17, 103.
13. Ehlers G.A., Rose P.D. – *Water SA* 2006, 32, 243, disponibil la: <http://www.wrc.org.za>.
14. Elsner M., Schwarzenbach R.P., Haderlein S.B. - *Environ. Sci. Technol.* 2004, 38, 799.
15. Evans G.M., Furlong J.C. - *Environmental Biotechnology: Theory and Application*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2003.
16. Fritsche W., Hofrichter M. - Aerobic degradation of recalcitrant organic compounds by microorganisms, în: *Environmental Biotechnology. Concepts and Applications* (Ed. Jördening H.-J., Winter J.), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2005, 203.
17. Fritsche W., Hofrichter M. - Aerobic Degradation by Microorganisms, în: *Biotechnology* (Ed. Rehm H.-J., Reed G.), Vol. 11b, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2000.
18. Gonzaga M.I.S., Santos J.A.G., Ma L.Q. - *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* 2006, 63, 90.
19. Graedel T.E. - *Chemical Compounds in the Atmosphere*, Academic Press, New York, 1978.
20. Gratão P.L., Prasad M.N.V., Cardoso P.F., Lea P.J., Azevedo R.A. - *Braz. J. Plant Physiol.* 2005, 17, 53.
21. Hofrichter M. - *Enzyme Microbiol. Technol.* 2002, 30, 454.
22. Kästner M. - Degradation of aromatic and polyaromatic compounds, în: *Biotechnology* (Ed. Rehm H.-J., Reed G.), Vol. 11b, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2000.
23. Leeson A., Hinchee R.E. - *Principles and Practice of Bioventing*, vol. I, II, Battelle Memorial Institute, Columbus, 1996.
24. Maillard J., Schumacher W., Vazquez F., Regeard C., Hagen W.R., Holliger C. - *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 4628.
25. Manji S., Ishihara A. - *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 63, 438.
26. Neumann A., Siebert A., Trescher T., Reinhardt S., Wohlfarth G., Diekert G. - *Arch. Microbiol.* 2002, 177, 420.
27. Palumbo A.V., Eng W., Boerman P.A., Strandberg G.W., Donaldson T.L., Herber S.E. - Effects of diverse organic contaminants on trichloroethylene degradation by methanotrophic bacteria and methane-utilizing consortia, în: *On Site Bioreclamation Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment* (Ed. Hinchee R.E., Offenbuttel R.F.), Butterworth-Heinemann, Stoneham, 1991.
28. Patra J., Lenka M., Panda B.B. – *New Phytol.* 1994, 128, 165.

29. Prasad M.N.V., de Oliveira Freitas H.M. - Electronic Journal of Biotechnology 2003, 6, 3, disponibil la <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol6/issue3/full/6>.
30. Rodriguez L., Lopez-Bellido F.J., Carnicer A., Recreo F., Tallos A., Monteagudo J.M. - Mercury Recovery from Soils by Phytoremediation, în: Environmental Chemistry: Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems (Ed. Lichtfouse E., Schwarzbauer J., Robert D.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2005, 197.
31. Schink B. - Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997, 61, 262.
32. Schink B. - Principles of anaerobic degradation of organic compounds, în: Environmental Biotechnology. Concepts and Applications (Ed. Jördening H.-J., Winter, J.), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2005, 229.
33. Semprini L., Roberts P.V., Hopkins G.D., McCarty P.L. - Groundwater 1990, 28, 715.
34. Steffen K., Hatakka A., Hofrichter M. - Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69, 3957.
35. Suthersan S.S. - Remediation Engineering: Design Concepts, CRC Press, 1999.
36. Tsien H.C., Bousseau A., Hanson R.S., Wackeff L.P. - Appl. Environ. Microbiol. 1989, 55, 3155.
37. Vallero D.A. - Environmental Contaminants: Assessment and Control, Elsevier, 2004.
38. Wolski E.A., Murialdo S.E., Gonzáles J.F. - Water SA 2006, 32, 1, disponibil la: <http://www.wrc.org.za>.
39. Zehnder A.J.B., Stumm W. - Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats, în: Biology of Anaerobic Microorganisms (Ed. Zehnder A.J.B.), Wiley, New York, 1988.
40. \* \* \* - In Situ Bioremediation: When Does it Work?, National Academy Press, Washington, 1993.
41. \* \* \* - Engineered Approaches to *In Situ* Bioremediation of Chlorinated Solvents: Fundamentals and Field Applications, US Environmental Protection Agency, EPA-542-R-00-008, 2000.
42. \* \* \* - Principles and Practices of Enhanced Anaerobic Bioremediation of Chlorinated Solvents, Parsons Co., 022/738863/28.doc, 2004.