

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS

Departamento de Engenharia Química

G

E

Q



Trabalho de Conclusão de Curso

**ESTUDO DA BIORREMEDIAÇÃO E TAXA DE
CORROSÃO DO AÇO CARBONO EM SOLO DO
PORTO DE SUAPE CONTAMINADO COM DIESEL S-
10, UTILIZANDO BIOESTÍMULO DE NUTRIENTES E
BIOAUMENTO COM FUNGOS**

Camila Santos Câmara

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sara Horácio de Oliveira Maciel

DEQ – Departamento de Engenharia
Química

Cidade Universitária- Recife – PE

CEP. 50640-901

Telefax: 0-xx-81- 21268717

Recife/PE

Maiο/2023

CAMILA SANTOS CÂMARA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ESTUDO DA BIORREMEDIAÇÃO E TAXA DE CORROSÃO DO AÇO CARBONO EM SOLO DO PORTO DE SUAPE CONTAMINADO COM DIESEL S-10, UTILIZANDO BIOESTÍMULO DE NUTRIENTES E BIOAUMENTO COM FUNGOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Sara Horácio de Oliveira Maciel

Coorientador (a): Larissa Oliveira da Silva

Recife/PE

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Câmara, Camila Santos.

Estudo da biorremediação e taxa de corrosão do aço carbono em solo do Porto de Suape contaminado com diesel S- 10, utilizando bioestímulo de nutrientes e bioaumentamento com fungos / Camila Santos Câmara. - Recife, 2023.

69 : il., tab.

Orientador(a): Sara Horácio de Oliveira Maciel

Cooorientador(a): Larissa Oliveira da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, , 2023.

Inclui referências, apêndices.

1. Biorremediação. 2. Diesel S-10. 3. Bioestímulo. 4. Bioaumentamento. 5. Taxas de corrosão. I. Maciel, Sara Horácio de Oliveira. (Orientação). II. Silva, Larissa Oliveira da. (Cooorientação). III. Título.

620 CDD (22.ed.)

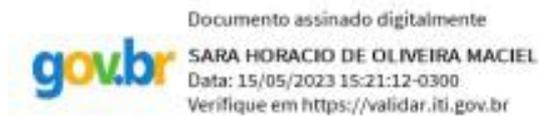
CAMILA SANTOS CÂMARA

ESTUDO DA BIORREMEDIAÇÃO E TAXA DE CORROSÃO DO AÇO CARBONO EM SOLO DO PORTO DE SUAPE CONTAMINADO COM DIESEL S-10, UTILIZANDO BIOESTÍMULO DE NUTRIENTES E BIOAUMENTO COM FUNGOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

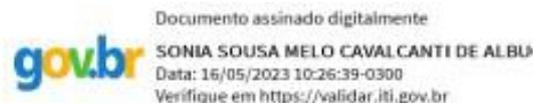
Aprovado em: 12/05/2023

BANCA EXAMINADORA



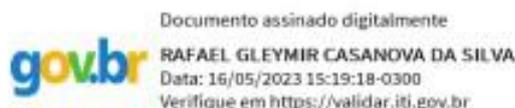
Prof^ª. Dr^ª. Sara Horácio de Oliveira Maciel (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco



Prof^ª. Dr^ª. Sônia Melo C. de Albuquerque (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco



Me. Rafael Gleymir Casanova da Silva (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, o Senhor da minha vida, pois sem dúvidas até aqui Ele tem me ajudado. Obrigada por sempre me abençoar e cuidar perfeitamente de mim, me dando condições mentais, físicas e intelectuais, me abençoando com pessoas maravilhosas que muito me abençoaram e me ajudaram ao longo dessa longa caminhada de estudos. Obrigada por me proporcionar essa conquista e pela certeza de que em Ti eu posso confiar, descansar e prosseguir. Eu nada seria sem Ti.

Aos meus pais, Luiz e Maria, que sempre me apoiaram e incentivaram. Sempre deram o seu melhor para investir da melhor forma em meu futuro. Obrigada pai, por inúmeras vezes deixar de viver os seus sonhos para que pudesse dar o melhor para mim. Obrigada, mãe, por todo cuidado e investimento, desde os cuidados na casa até as inúmeras orações, que me mantém de pé. As minhas irmãs, Ana Lygia e Julia, que sempre estiveram ao meu lado, me ajudando e dando todo suporte. Vocês são meus amores e meu alicerce.

A minha orientadora incrível, Professora Sara. Que durante todos esses anos sempre foi muito solícita e prestativa. Que muito me ensinou, ajudou e aconselhou. Sem dúvidas é uma das mulheres que mais admiro, não apenas por toda inteligência, mas mais ainda pelo seu coração. Obrigada pela amizade e conselhos.

A minha co-orientadora maravilhosa, Larissa Oliveira. Obrigada por toda parceria e amizade, pela paciência ao me ensinar, responder as minhas mensagens de socorro e por tanto me ajudar, de todas as formas possíveis.

A Professora Sônia Albuquerque, pela sua disponibilidade em ajudar e contribuir com o meu crescimento.

Aos meus amigos do laboratório, João Henrique, José Cláudio, Danilo e Karyne. Obrigada pela parceria, pelos momentos compartilhados no experimento e ajuda durante todo o tempo de pesquisa.

Aos meus amigos da igreja, que estiveram orando por mim e escutando meus desabafos e anseios, em especial Duda, Ketlin, Leozão, Vitinho, Juninho, Bela e Bodinho, meus amigos mais chegados que irmãos.

Ao melhor amigo que a vida acadêmica me trouxe, Lucas Calado. Muito obrigada por todo o suporte e parceria. Por sempre aguentar a barra nas vezes que eu pensava em desistir e por nunca permitir que desistisse.

RESUMO

As atividades relacionadas à exploração do petróleo vêm trazendo grande preocupação devido aos riscos de derrames acidentais. O estudo do solo para avaliar sua capacidade corrosiva é muito importante em função do grande número de reservatórios e tubulações instaladas sob o solo. Os aços carbono ASTM A36 sofrem uma grande deterioração, o que representa um real problema para a economia e o meio ambiente ao passar dos anos. Estas deteriorações são causadas por diversos fatores, como interações físico-químicas e microbiológicas entre o aço e o meio, alterando a composição química e as propriedades do metal, podendo causar danos como vazamento dos derivados de petróleo. Inúmeras pesquisas de remediação de áreas contaminadas por petróleo e derivados têm sido realizadas. Dentre as alternativas de tratamento, a biorremediação surge como a menos agressiva e a mais adequada para manutenção do equilíbrio ecológico. O objetivo desta pesquisa foi investigar a biodegradação do óleo Diesel S-10 em solo do Porto de Suape - PE, utilizando as técnicas de bioestímulo e bioaumento, conferindo também os impactos da utilização destas técnicas nas taxas de corrosão do aço carbono ASTM A36, durante 35 dias. Os experimentos foram conduzidos em biorreatores e os corpos de provas foram previamente jateados, limpados e pesados. As amostras de solo do Porto de Suape – PE, foram coletadas e analisadas (parâmetros físico-químicos e microbiológicos). As análises para quantificação dos microrganismos do solo (bactérias heterotróficas aeróbias e anaeróbias, hidrocarbonoclasticas e os fungos filamentosos) foram realizadas durante todo o experimento. Também foram retirados cupons para avaliação das taxas de corrosão. Para quantificação de perda de massa. Concluiu-se que as técnicas de bioestímulo e bioaumento utilizadas na pesquisa demonstraram aplicabilidade nos solos do Porto de Suape - PE, no entanto fica a recomendação para serem utilizadas *ex-situ* e não *in-situ*, pois foi constatado que a inserção de produtos químicos, assim como o aumento da concentração celular no solo, aumentou as taxas de corrosão dos aços.

Palavras-chave: Biorremediação; Diesel S-10; Bioestímulo; Bioaumento; Taxas de corrosão; Aço Carbono.

ABSTRACT

The activities related to oil exploration have brought great concern due to the risks of accidental spills. The study of the soil to evaluate its corrosive capacity is very important due to the large number of reservoirs and pipes installed under the soil. ASTM A36 carbon steels suffer great deterioration, which represents a real problem for the economy and the environment over the years. These deteriorations are caused by several factors, such as physical-chemical and microbiological interactions between the steel and the environment, changing the chemical composition and the properties of the metal, and can cause damage such as leakage of petroleum products. Numerous researches on the remediation of areas contaminated by oil and derivatives have been carried out. Among the treatment alternatives, bioremediation emerges as the least aggressive and the most appropriate for maintaining ecological balance. The objective of this research was to investigate the biodegradation of S-10 Diesel oil in soil from the Port of Suape - PE, using the techniques of biostimulation and bioenhancement, also checking the impacts of the use of these techniques in the corrosion rates of ASTM A36 carbon steel, during 35 days. The experiments were conducted in bioreactors and the specimens were previously blasted, cleaned, and weighed. The soil samples from the Port of Suape - PE, were collected and analyzed (physicochemical and microbiological parameters). The analyses for quantification of soil microorganisms (aerobic and anaerobic heterotrophic bacteria, hydrocarbonoclastic and filamentous fungi) were performed throughout the experiment. Coupons were also taken for evaluation of corrosion rates. For quantification of mass loss. It was concluded that the techniques of biostimulation and bioaugmentation used in the research demonstrated applicability in the soils of the Port of Suape - PE, however, it is recommended to be used *ex-situ* and not *in-situ*, because it was found that the insertion of chemicals, as well as increasing the cell concentration in the soil, increased the corrosion rates of steels.

Keywords: Bioremediation; S-10 Diesel; Biostimulus; Bioenhancement; Corrosion rates; Carbon Steel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Coleta do solo do Complexo de Suape	27
Figura 2 - Amostra de solo dispersa em bancada	28
Figura 3 - Peneiramento do solo em malha 2,0 mm	28
Figura 4 - Análise da capacidade de retenção de água	30
Figura 5 - Crescimento das colônias de fungos: A. em meio Sabouraud; B. em meio BH	32
Figura 6 - A. Inóculo preparado; B. Células do inóculo inicial de fungos	33
Figura 7 - Sistema de respirômetros, na sequência: branco, solo estéril e bioaumento com fungos	34
Figura 8 - Biorreator	36
Figura 9 - Esquema para isolamento de microrganismos	36
Figura 10 - Estante contendo os meios aeróbios em triplicata e a água de diluição	37
Figura 11 - Bandeja com os meios aeróbios em triplicata e a solução redutora	38
Figura 12 - Cupons enterrados no biorreator com bioaumento	39
Figura 13 - Sistema da decapagem ácida, na sequência: solução de HCL 15%, álcool isopropílico e acetona	39
Figura 14 - Respirômetro montado: o recipiente da esquerda contendo o solo e o braço lateral contendo a solução de KOH 0,2 N	40
Figura 15 - Câmara úmida, aumento de 40x: A,B,C: meio Sabouraud; D: meio BH	43
Figura 16 - Tubos contendo meios aeróbios	46
Figura 17 - Bactérias Heterotrófas Aeróbias	47
Figura 18 - Tubos contendo meios anaeróbios	48
Figura 19 - Bactérias Heterotróficas Anaeróbicas	49
Figura 20 - Fungos filamentosos	50
Figura 21 - Fungos no solo com menor concentração celular	51
Figura 22 - Fungos do solo com bioaumento com fungos	51
Figura 23 - Hidrocarbonoclasticas	52
Figura 24 - Produção total de CO ₂	53
Figura 25 - Produção diária de CO ₂	53
Figura 26 - Eficiência da biodegradação	54
Figura 27 - Taxa de corrosão do biorreator do solo controle	56
Figura 28 - Taxa de corrosão do biorreator do solo com bioaumento de fungos	57

Figura 29 - Cupom desenterrado após 7 dias. Antes e após a decapagem ácida, respectivamente	58
Figura 30 - Cupom desenterrado após 14 dias. Antes e após a decapagem ácida, respectivamente	58
Figura 31 - Cupom desenterrado após 21 dias. Antes e após a decapagem ácida, respectivamente	58
Figura 32 - Cupom desenterrado após 28 dias. Antes e após a decapagem ácida, respectivamente	59
Figura 33 - Cupom desenterrado após 35 dias. Após a decapagem ácida	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio para bactérias aeróbias heterotróficas	38
Tabela 2 - Composição do meio para bactérias heterotróficas anaeróbias	38
Tabela 3 - Composição da solução redutora	38
Tabela 4 - Composição do meio para fungos - <i>Sabouraud</i> dextrose	39
Tabela 5 - Composição do meio para fungos - caldo glicosado	39
Tabela 6 - Composição do meio BH para contagem em placas	39
Tabela 7 - Resultados analíticos da granulometria do solo	45
Tabela 8 - Resultados analíticos físico-químicos do solo	46
Tabela 9 - Caracterização físico-química do óleo Diesel S-10	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH	Bushnell-Hass
BHA	Bactérias heterotróficas aeróbias
BHAn	Bactérias heterotróficas anaeróbias
MO	Matéria orgânica
NMP	Número mais provável
TFSA	Terra fina seca ao ar
UFC	Unidade formadora de colônia

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVO GERAL	16
1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1. CONTAMINAÇÃO E CORROSIVIDADE DO SOLO	18
2.2. PETRÓLEO E SEUS CONTAMINANTES	19
2.3. DIESEL	20
2.4. BIORREMEDIAÇÃO	22
2.5. BIOAUMENTO COM FUNGOS	23
2.6. CARACTERIZAÇÃO DO SOLO	24
2.6.1. Umidade	24
2.6.2. Capacidade de retenção	25
2.6.3. Densidade de partículas	25
2.6.4. Densidade aparente	26
2.6.5. Porosidade	26
2.6.6. Óleos e graxas	26
2.7. Determinação da biodegradação pelo método respirométrico	27
3. METODOLOGIA	28
3.1. COLETA E PREPARO DO SOLO	28
3.2. ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DO SOLO	29
3.2.1. Análise da granulometria	30
3.2.2. Análise de umidade	30
3.2.3. Análise de curva de neutralização	30
3.2.4. Análise de capacidade de retenção de água no solo	30
3.2.5. Análise do pH	31
3.2.6. Análise do carbono orgânico total	31

3.2.7. Análise da densidade de partículas	31
3.2.8. Análise da densidade aparente	31
3.2.9. Análise da porosidade	32
3.2.10. Análise de óleos e graxas	32
3.2.11. Análises microbiológicas	32
3.3. ISOLAMENTO DO FUNGO USADO PARA BIOAUMENTO	33
3.4. PREPARO DO INÓCULO DE FUNGOS	34
3.5. PREPARO DO SOLO	34
3.5.1. Respirômetros	35
3.5.2. Biorreatores	36
3.6. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS NOS SOLOS	37
3.6.1. Meios de culturas e soluções	37
3.6.1.1. Bactérias Heterotróficas Aeróbias (BHA)	37
3.6.1.2. Bactérias Heterotróficas Anaeróbias (BHAn)	38
3.6.1.3. Fungos	39
3.6.1.4. Bactérias Hidrocarbonoclásticas	39
3.6.2. Quantificação das bactérias heterotróficas aeróbias	40
3.6.3. Quantificação das bactérias anaeróbias (BHAn)	41
3.6.4. Quantificação dos fungos	41
3.6.5. Quantificação das hidrocarbonoclásticas	42
3.7. TAXA DE CORROSÃO	42
3.8. LEITURA DOS RESPIRÔMETROS	44
4. RESULTADOS	45
4.1. CARACTERIZAÇÃO	45
4.1.1. Caracterização físico química do solo	45
4.1.2. Isolamento e caracterização do fungo	47
4.1.3. Caracterização físico-química do óleo diesel	48
4.2. QUANTIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS	49

4.2.1. Bactérias Heterotróficas Aeróbias	49
4.2.2. Bactérias Heterotróficas Anaeróbios	51
4.2.3. Fungos filamentosos	53
4.2.4. Hidrocarbonoclasticas	55
4.3. DETERMINAÇÃO BIODEGRADAÇÃO PELO MÉTODO RESPIROMÉTRICO	57
4.4. TAXAS DE CORROSÃO	59
5. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

Atualmente os derivados de petróleo são uma das principais fontes de energia, assim como uma das principais fontes de poluição mundial. Com o crescimento do uso de automóveis das últimas décadas, houve um aumento progressivo de postos revendedores e de postos de abastecimento, o que aumentou o número de acidentes com derivados de petróleo. No Brasil, os maiores responsáveis por esses acidentes são os postos de combustíveis devido a vazamentos acidentais e os derrames em tanques de armazenagem, que em geral possuem combustíveis e óleos lubrificantes (MONTAGNOLLI; BIDOIA, 2012). Com o passar dos anos as preocupações com o meio ambiente se tornaram uma das questões mais relevantes para a sociedade, sendo alvo de debates, discussões e pesquisas em todo o mundo, com o objetivo de buscar formas de desenvolvimento mais sustentáveis ou técnicas de tratamento que auxiliem na remoção ou redução de poluentes de áreas contaminadas (CAMPOS, 2014).

A contaminação do solo por esses produtos retrata uma enorme ameaça a sua qualidade e também a das águas subterrâneas, uma vez que ambos estão interligados. Esse tipo de contaminação pode resultar de forma imediata, ou não, em graves danos à vida e à saúde da população (FINOTTI; CAICEDO, 2001; GOUVEIA; NARDOCCI, 2007). Acidentes ambientais com petróleo e derivados causam danos consideráveis ao meio ambiente, assunto que tem gerado uma enorme preocupação pública, sendo necessário soluções rápidas e econômicas.

Com o objetivo de reduzir essa problemática, inúmeras pesquisas de remediação de áreas contaminadas por petróleo e derivados têm sido realizadas. Dentre as alternativas de tratamento, a biorremediação representa uma opção menos agressiva e a mais adequada para manutenção do equilíbrio ecológico, por serem consideradas mais seguras, menos custosas, menos agressivas ao meio ambiente e uma relativa simplicidade de execução (MARCHAL et al., 2003; MARIANO; BONOTTO; ANGELIS; PIRÔLLO; CONTIERO, 2008; BESKOSKI et al., 2011; RODRIGUES et al., 2015; BALDAN et al., 2015; PACWA-PLOCINICZAK; PLAZA; PIOTROWSKA-SEGET, 2016).

A biorremediação microbiana é um tratamento que envolve um grupo de técnicas, que ligadas a diferentes estratégias de tratamento, exploram a diversidade e a multifuncionalidade metabólica que os microrganismos possuem para transformar contaminantes ambientais em produtos finais menos tóxicos ou inofensivos, os quais podem

ser integrados aos ciclos biogeoquímicos (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005; SEPÚLVEDA; TREJO, 2002).

Dentre as estratégias de biorremediação, o bioestímulo e o bioaumento têm sido as mais reportadas na literatura atual. O bioestímulo envolve a adição de agentes estimulantes à atividade microbiana, como nutrientes e oxigênio, tornando o sistema a ser biorremediado, mais adequado ao metabolismo dos microrganismos remediadores, e o bioaumento consiste na inoculação de culturas puras de microrganismos ou consórcios microbianos com potencial para degradar o contaminante alvo (BENTO et al., 2005; DIAS, 2007; JACCQUES et al., 2007).

As ligas metálicas são bastante utilizadas nos vários segmentos industriais. Um desses segmentos são as petroquímicas, naval, indústrias de petróleo, que por conta do grande desgaste das ligas metálicas utilizadas, com o passar do tempo apresentam problemas e ocasionam prejuízos. Por isso é importante o conhecimento do ambiente em que estes materiais serão utilizados, assim como a correta medida protetiva.

A corrosão, processo onde ocorre a deterioração dos materiais metálicos, podem ocorrer via mecanismos químico ou eletroquímico, podendo estar associados, ou não, a esforços mecânicos (GENTIL, 2022). Na presença de microrganismos, esse processo pode ser ainda mais intensificado, por causa da ação do metabolismo realizado na superfície do material, como por exemplo, produção de material polimérico extracelular, redução de íons sulfato a sulfeto, variação do pH (em áreas localizadas) dentre outros (VIDELA, 2003; RAJASEKAR GANESH BABU; KARUTHA PANDIAN, 2007).

Outra alternativa são os aços carbonos, uma liga de ferro-carbono, que é muito utilizados na construção de estruturas e também equipamentos, por causa da sua alta resistência a impactos, ductilidade, facilidade de soldagem e ao seu custo relativamente baixo. Na maioria das aplicações, o aço é utilizado com proteção, por ser um metal que apresenta uma baixa resistência à corrosão. Contudo, o aço carbono é susceptível as corrosões eletroquímicas e microbiológicas nos mais diversos meios aquosos. Apesar de ser resistente à corrosão, esse tipo de aço não está isento da corrosão, principalmente quando o íon cloreto e os microrganismos estão presentes no ambiente (VIDELA, 2003; NASCIMENTO, 2008). Para que se possa minimizar, e até mesmo evitar os efeitos de íons agressivos e a ação dos microrganismos, existem técnicas para monitoramento e controle da corrosão, mesmo mediada por microrganismos.

Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar o processo de biorremediação por meio de bioestímulo e bioaumento com fungos na degradação dos hidrocarbonetos do solo do Porto de Suape (PE), contaminado com Diesel S-10. Foram obtidos resultados do potencial microbiano em degradar o contaminante no solo, por meio das taxas de biodegradação do óleo Diesel S-10 durante 35 dias, via inferência do CO₂ produzido nos biorreatores. Além disso, também foram quantificadas as concentrações celulares das bactérias heterotróficas aeróbias e anaeróbias, as hidrocarbonoclasticas e os fungos filamentosos dos solos, assim como as taxas de corrosão do aço-carbono nos diferentes biorreatores.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a biodegradação do óleo Diesel S-10 em solo, utilizando as técnicas de bioestímulo e bioaumento e verificar os impactos da utilização destas técnicas nas taxas de corrosão do aço carbono.

1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Amostragem e caracterização do solo do Porto de SUAPE;
- Preparar inóculos de fungos para o bioaumento nos solos do respirômetro de Bartha e biorreator utilizado;
- Preparar os respirômetros de Bartha e os biorreatores para o estudo;
- Avaliar o potencial microbiano do solo com e sem contaminação do Diesel S-10, através da quantificação das concentrações celulares das bactérias heterotróficas aeróbias e anaeróbias, as hidrocarbonoclasticas e os fungos filamentosos dos solos;
- Analisar as taxas de biodegradação do óleo Diesel S-10, através da inferência do CO₂ produzido nas biodegradações dos solos nos respirômetros de Bartha;
- Avaliar as taxas de corrosão dos aço-carbono no solo contaminado com Diesel S-10, através da correção de nutrientes ao solo e bioaumento com fungos, em relação a um solo controle;
- Avaliar a aplicabilidade das técnicas de biorremediação na degradação dos hidrocarbonetos do solo do Porto de Suape (PE), contaminado artificialmente com Diesel S-10.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. BIORREMEDIAÇÃO

Entre as muitas técnicas para remediar os impactos provenientes da indústria petrolífera, tem-se a biorremediação, que é o processo de descontaminação de áreas impactadas por poluentes, que se dá por meio de microrganismos (fungos e bactérias) e/ou plantas, a fitorremediação. Em geral, os microrganismos utilizados são bactérias, fungos filamentosos e leveduras. O que irá determinar este processo são as características químicas e físicas do ambiente, assim como a composição do contaminante, mas para se ter eficiência no processo, alguns fatores como temperatura, presença de oxigênio, nutrientes, e pH, tornam-se condicionantes (BERGER, 2005; MUTECA, 2012).

Com relação aos locais de tratamento, pode ser *in-situ* (a mais empregada), *ex-situ* ou as duas combinadas, porém independentemente do local de aplicação, a biorremediação tornou-se o aprimoramento da biodegradação, e os seus três principais agentes desta aceleração são o bioestímulo (acrécimo de nutrientes), o bioaumento (introdução de microrganismos) e a biorremediação intrínseca (atenuação natural/monitorada). Os processos relacionados à biorremediação podem ser classificados de acordo com o tratamento e a fase empregada.

Seu principal objetivo é a mineralização completa dos contaminantes, ou seja, transformá-los em produtos com pouca ou nenhuma toxicidade, como CO₂ e água. Os microrganismos metabolizam as substâncias orgânicas, das quais se obtêm nutrientes e energia. Sendo que, para que isso ocorra, os microrganismos devem estar ativos para desempenharem a sua tarefa de biodegradação.

Este processo biotecnológico é alternativa viável para a descontaminação de ambientes como águas superficiais, subterrâneas e em solos, além de efluentes e resíduos industriais em aterro ou áreas de contenção. Além de ser uma alternativa eficaz para o combate de ambientes contaminados com moléculas de difícil degradação denominadas “recalcitrantes”, bem como também os metais tóxicos.

Como vantagens tem-se o fato da remediação ocorrer *in-situ*, eliminando o transporte de resíduos perigosos e custos, os adicionais resíduos orgânicos perigosos podem ser destruídos em vez de transferidos de uma fase para outra, os processos de biodegradação

endógenos podem ser mais rápidos e mais baratos (no mínimo dez vezes menos caro), o distúrbio ambiental e do solo é mínimo e além do fato de poder ser usado em conjunto com outras tecnologias de tratamento (DECESARO, 2013).

Porém, como desvantagens tem-se o fato de que certos resíduos, como metais pesados, não são eliminados pelos processos biológicos (embora muitos metais possam ser biorreduzidos ou bio-oxidados para menos tóxicos e formas menos móveis), pode requerer monitoramento extensivo, os requisitos e eficiência de remoção podem variar consideravelmente de um local para outro, alguns contaminantes podem estar presentes em altas concentrações que inibem os microrganismos e a possibilidade de um risco para acumulação de produtos tóxicos da biodegradação (DECESARO, 2013).

O bioaumentamento é uma técnica que pode ser utilizada tanto *in situ* quanto *ex situ*, na qual consiste na adição de microrganismos específicos das regiões impactadas, sendo adequadas às condições do ambiente em laboratório. Garantindo dessa forma que o consórcio adequado de microrganismos estará presente em tipo, número e compatibilidade suficientes, a fim de metabolizar o poluente de forma eficaz (MARIANO; KATAOKA; ANGELIS; BONOTTO, 2007; YAKUBU, 2007).

O bioestímulo também pode ser utilizado tanto *in situ* quanto *ex situ*, porém só há eficácia quando existem populações microbianas degradadoras no contaminante (YAKUBU, 2007). Esta técnica realiza o estímulo microbiano nativo, otimizando suas condições de crescimento por intermédio da adição de nutrientes orgânicos e inorgânicos, regulação de pH, temperatura e aeração (MARIANO; KATAOKA; ANGELIS; BONOTTO, 2007; YAKUBU, 2007).

2.2. BIOAUMENTO COM FUNGOS

O emprego dos fungos na remoção dos poluentes começou a ser estudado nos últimos trinta anos do século XX. Eles estão amplamente distribuídos na natureza, são encontrados na água, no ar atmosférico, no solo, sobre os animais e vegetais vivos parasitando-os, na matéria orgânica em decomposição, nos produtos alimentícios e produtos industriais.

São biodegradadores naturais, que encontram as substâncias necessárias para o seu desenvolvimento na natureza, principalmente, macromoléculas insolúveis, que precisam ser primeiramente degradadas em unidades monoméricas solúveis antes de sua assimilação.

Polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, lignina, lipídios e outros compostos de grande peso molecular, ou insolúveis, não podem ser incorporados diretamente sem antes terem sido reduzidos. Os fungos absorvem nutrientes através da membrana plasmática, como compostos de baixo peso molecular dissolvidos em água, o que justifica essa necessidade.

Os fungos também necessitam de duas classes de nutrientes de acordo com a quantidade necessária em suas dietas: os macronutrientes e os micronutrientes. Os macronutrientes são: carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, potássio, nitrogênio, enxofre e magnésio, dos quais o primeiro é mais exigido, por ser um elemento estrutural, associado ao hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Entre os micronutrientes, são citados: ferro, cobre, manganês, zinco e molibdênio (PUTZKE, 2002). Em geral, a necessidade de adição de macroelementos como requisito nutricional para o crescimento de fungos em laboratório.

A adsorção de nutrientes pelos fungos é auxiliada por enzimas secretadas no meio, que hidrolisam as moléculas orgânicas em porções menores e, conseqüentemente, podem ser transportadas mais facilmente para dentro da célula. Todos os fungos são heterotróficos e podem crescer no laboratório em uma mistura simples, contendo uma fonte de carbono orgânico, geralmente um açúcar, uma fonte de nitrogênio inorgânico ou orgânico e alguns minerais.

Além das fontes de carbono e nitrogênio, o ágar, por exemplo, permite aos fungos filamentosos o desenvolvimento e o aumento do número de colônias. O meio de cultivo mais utilizado para os fungos é o meio glicosado de Sabouraud, que possui uma concentração maior de açúcar que o meio de cultivo para as bactérias (4%), e um pH de 5,6, características que dificultam o crescimento bacteriano.

2.3. CONTAMINAÇÃO E CORROSIVIDADE DO SOLO

É muito comum, e necessário, a utilização de estruturas de metal enterradas em solo, como tubulações, tanques metálicos, dutos entre outros. Essas estruturas são projetadas para uma longa vida útil. O que faz com que a corrosão provocada pelo solo em dutos enterrados seja um assunto de grande interesse e importância para diversos setores industriais, por conta do elevado número de tubulações e reservatórios instalados no solo.

A corrosão pode ser definida como o processo de deterioração dos materiais, principalmente os metálicos. Sua forma de ocorrência irá depender de algumas variáveis, tais

como o material, o meio corrosivo e as condições operacionais do meio no qual o material está inserido (FRAUCHES-SANTOS et al., 2013; GENTIL, 2022; SILVA et al., 2015).

A ocorrência de acidentes por vazamentos ou derramamentos de produtos químicos próximos a tanques enterrados é um fator preocupante, já que causam poluição do solo, gerando impactos negativos. Com relação a corrosão, a adição de produtos químicos ao solo pode aumentar a sua agressividade, acelerando o processo de corrosão em estruturas enterradas e levando a possíveis vazamentos de produtos, agravando ainda mais o dano ambiental (LOUREIRO; BRASIL; YOKOYAMA, 2007). Uma grande parcela dos custos globais desses setores é a corrosão pelo solo, justamente por conta da grande malha dutoviária existente. Por isso que tem sido cada vez mais importante os estudos nessa área.

O solo é formado por uma mistura de compostos orgânicos e minerais, formada pela ação de agentes físicos, químicos e biológicos inicialmente sobre a rocha primária (LUCHESE; FAVERO; LENZI, 2002). Ele é constituído pela matéria em suas três fases fundamentais: sólida, líquida e gasosa. Na qual 45% correspondem a fase sólida, que são provenientes do intemperismo sofrido por rochas locais ou até mesmo mais distantes. A fase gasosa corresponde a 25% da composição do solo é proveniente do ar existente na superfície, acrescido de quantidades variadas de gases biodegradados de matéria orgânica, sendo mais abundante o dióxido de carbono (biodegradação aeróbia) e outros como, o metano (biodegradação anaeróbia). Já a fase líquida, que também corresponde a 25% da composição, proveniente de águas de chuvas, orvalho sereno, neblina e degelo, que em solução contém substâncias originalmente presentes nas fases sólidas e líquidas. Os outros 5% da composição do solo, referem-se à matéria orgânica, que são folhas, frutos, galhos, ramos, resto de animais, excrementos, entre outros resíduos. A biodegradação da matéria orgânica é responsável pela formação do húmus, que geralmente, determina as propriedades físicas e características agrícolas do solo (SHUKLA, 2011).

Devido a sua complexidade, o solo merece um destaque ainda maior quando se fala da corrosão, por conta das suas variações na composição, a riqueza de suas propriedades e o fato de possuir interação com o meio ambiente. (LOUREIRO, 2007).

A presença de contaminantes no solo causa a perda e danos de algumas ou várias das suas funções. Acima de determinados níveis, podem causar várias consequências negativas nos organismos da cadeia alimentar e nos ecossistemas naturais. Uma das mais comuns fontes de contaminação é o vazamento de tanques reservatórios. O estudo do comportamento do solo

é uma prévia determinação da ação agressiva destes contaminantes, sendo possível criar mecanismos preventivos que visem minimizar ou até extinguir os possíveis danos à construção, evitando acidentes e desperdícios financeiros (GENTIL, 2022; NÓBREGA et al., 2003; SILVA; BRASIL, 2010).

Os ensaios de perda de massa de materiais metálicos, por exemplo, é um dos métodos para determinação da corrosividade de solos, sua desvantagem é exigir longos períodos, pois uma de suas variáveis é o tempo, sendo pouco compatível com os projetos da engenharia. Por isso existe uma série de parâmetros para avaliação da corrosividade do solo, que são baseados nas propriedades físico-químicas, biológicas e um número determinado de variáveis que ao serem avaliadas em conjunto, são capazes de determinar o nível de corrosividade global do solo (SILVA; BRASIL, 2010).

2.4. PETRÓLEO E SEUS CONTAMINANTES

O petróleo é formado a partir de uma mistura complexa de vários compostos, na qual os hidrocarbonetos representam a maior parte. De acordo com a sua origem de formação, existirão mudanças de composição química e propriedades físicas, que variam de um campo petrolífero para outro. Por isso, o tratamento de áreas contaminadas por essas substâncias acaba se tornando complexo, devido a sua diversificada da composição (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). No geral, a composição é de: 11-14% de hidrogênio, 83-87% de carbono, 0,006-8% de enxofre, 0,11-1,7% de nitrogênio, 0,1-2% de oxigênio e até 0,3% de metais (THOMAS, 2004). A elevada porcentagem de hidrogênio e carbono na composição do petróleo cru típico, demonstra que os seus principais constituintes são os hidrocarbonetos.

Em solos contaminados por petróleo e seus derivados, o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos conhecidos como hidrocarbonetos monoaromáticos, se destacam negativamente no Brasil e no mundo por serem tóxicos tanto para o meio ambiente como ao ser humano (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). A maior parte dos compostos de petróleo é suscetível a biodegradação, porém trata-se de um processo lento, quando feito de forma natural, sem a utilização de bioaumento e bioestímulo, podendo levar décadas até a total descontaminação do ambiente.

O petróleo põe em risco todo o ecossistema ao seu redor, pois é uma substância tóxica. A falha na exploração e na exploração de petróleo são um dos principais causadores dos impactos ambientais, causando acidentes e vazamentos que podem contaminar todo

ecossistema presente (SANTOS, 2012). Este efeito nocivo ao meio ambiente pode se apresentar de várias maneiras: derramamento de óleo ocasionado por vazamento, ocasionando desastres ecológicos como, poluição ambiental; degradação ambiental; destruição da fauna e da flora. A comercialização da gasolina, por exemplo, tem como consequências negativas, a possibilidade de derramamento nos solos e em águas regionais.

2.5. DIESEL

Depois da produção de automóveis a motor de combustão em longa escala, as indústrias petroquímicas alcançaram o auge nos séculos XX e XXI, por conta dos avanços tecnológicos e as inovações industriais proporcionados pelos combustíveis fósseis. Com o desenvolvimento do motor de combustão interna e o sistema de injeção direta de combustível, houve a larga produção de um dos subprodutos da destilação do petróleo, o diesel (SOUZA, 2008).

O diesel é caracterizado quimicamente por frações leves de querosene e naftas (5% a 10% da concentração) e frações mais pesadas, como óleo leve, que são obtidos após o craqueamento catalítico do petróleo (temperatura de destilação entre 160 e 380 °C). Além da mistura complexa de *n*-parafinas, cicloalcanos, parafinas ramificadas, aromáticos mono e polinucleados, o diesel é completado com aditivos anticorrosivos, antiespumantes, desativadores de metais, dissipadores de cargas elétricas, detergentes, desemulsificantes, antioxidantes, melhoradores de lubricidade, dispersantes, escoamento e cetano (LAURO, 2006; SOUZA, 2008).

De acordo com a Resolução ANP n°. 65/2011 (BRASIL, 2011), o diesel rodoviário no Brasil é classificado da seguinte forma:

- a) Óleo diesel tipo A: combustível proveniente de processos de refino de petróleo, centrais de matérias-primas petroquímica ou autorizadas, sem adição de biodiesel;
- b) Óleo diesel tipo B: é o óleo diesel tipo A com adição de biodiesel.

Estes tipos de diesel são subclassificados de acordo com seu teor de enxofre, seguindo a nomenclatura adotada pela Resolução ANP n°. 65/2011 (BRASIL, 2011) válida a partir do dia 1° de janeiro de 2012:

- a) Óleo diesel A S10 e B S10: contendo no máximo 10 mg.kg⁻¹ de enxofre;

- b) Óleo diesel A S50 e B S50: contendo no máximo 50 10 mg.kg⁻¹ de enxofre;
- c) Óleo diesel A S500 e B S500: contendo no máximo 500 10 mg.kg⁻¹ de enxofre;
- d) Óleo diesel A S1800 e B S1800: contendo no máximo 1800 10 mg.kg⁻¹ de enxofre.

A combustão do óleo diesel libera para o meio ambiente gases poluidores e causadores do efeito estufa. Além disso, as suas impurezas, como o enxofre, formam óxidos de enxofre que são lançados na atmosfera e reagem com a água, formando a chamada chuva ácida. A fim de diminuir esses impactos ambientais causados pela utilização do óleo diesel como combustível, no ano de 2004, o governo brasileiro instituiu o Programa de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), que tornou obrigatória a adição de 2% de biodiesel, o chamado B2, ao diesel de petróleo a partir de 2008. Esse percentual aumentou para 5% (B5), e há metas para aumentá-lo gradativamente até atingir 20%.

A substituição do diesel S1800 pelo S500 foi iniciada em 2012, ficando vedado o comércio do primeiro a partir de 2014. Em relação aos diesel com menores concentrações de enxofre, o período de adaptação para o S50 ocorreu em 2012 e que está sendo substituído totalmente pelo diesel S10 até o fim de 2013. Esta alteração de concentração de enxofre no diesel foi feita visando reduzir a poluição do ar nos centros urbanos. Porém, vale salientar que apesar de benéfico à saúde e ao meio ambiente, a redução de enxofre diminui a lubricidade do combustível, acarretando problemas de desgaste em algumas partes do motor e sua estabilidade à oxidação, já que alguns compostos sulfurados funcionam como lubrificante e antioxidante inerentes do diesel (SOARES, 2002; KARAVALAKIS et al., 2010).

2.6. CARACTERIZAÇÃO DO SOLO

A caracterização do solo é realizada por meio das análises de umidade (EMBRAPA, 2017), curva de neutralização do solo (ABNT-NBR-14283:1999), capacidade de retenção de água no solo (LUCHESE, 2002), pH (LUCHESE, 2002), carbono orgânico total, densidade de partículas (EMBRAPA, 1997), densidade aparente (EMBRAPA, 1997), porosidade (EMBRAPA, 1997) e óleos e graxas (STANDARD, 1999).

2.6.1. Umidade

O teor de umidade na amostra é dado pela seguinte expressão:

$$Wg = \frac{Pu - Ps}{Pu} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

W_g = Teor de água na amostra úmida, em percentagem em peso;

P_u = Peso da amostra de TFSA úmido;

P_s = Peso da amostra seca.

2.6.2. Capacidade de retenção

A capacidade de retenção de água na amostra é dada pela seguinte expressão:

$$\text{Capacidade de retenção água (Cr \%)} = V_i - V_f \quad (2)$$

Onde:

V_i = Volume inicial;

V_f = Volume final.

2.6.3. Densidade de partículas

A densidade de partículas é dada pela Equação 4:

$$V_s = V_B - V_A \quad (3)$$

Onde:

V_s = volume do solo (cm³);

V_B = volume do balão (ml);

V_A = volume do álcool etílico (ml)

$$D_p = M \cdot V_s \quad (4)$$

Onde:

D_p = densidade da partícula;

M = massa de solo;

V_s = volume do solo.

2.6.4. Densidade aparente

A densidade aparente é dada pela equação abaixo:

$$D_A = \frac{B - A}{100} \quad (5)$$

Onde:

D_A = densidade aparente (g.cm^{-3});

A = peso da proveta (g);

B = peso da proveta + solo (g).

2.6.5. Porosidade

A porosidade é a razão entre o volume ocupado pelos poros e o volume aparente do solo. Para efetuar o cálculo da porosidade, utiliza-se os dados obtidos nos cálculos da densidade de partícula (D_p) e o da densidade aparente (D_A) devem ser utilizados, conforme a equação abaixo:

$$P (\%) = \frac{(D_p - D_A)}{D_p} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

P = porosidade (%);

D_p = densidade da partícula;

D_A = densidade aparente

2.6.6. Óleos e graxas

Os óleos e graxas são obtidos pela equação abaixo:

$$O\&G = \left(\frac{P_1 - P_2}{m} \right) \cdot 1000 \quad (7)$$

Onde:

P_1 = massa do balão + óleo extraído (g);

P_2 = massa do balão vazio (g);

m = massa do solo utilizada (g);

O&G = teor de óleos e graxas no solo ($g \cdot g^{-1}$).

2.7. Determinação da biodegradação pelo método respirométrico

A determinação da biodegradação da matéria orgânica contida em resíduos a serem tratados em solo é possível através do método respirométrico de Bartha, por meio da quantificação da produção de gás carbônico (CO_2), em condições padronizadas, pelos microrganismos do solo.

Através desse método é possível avaliar a tratabilidade de resíduos em solo, assim como compreender as condições de manejo de sistema de tratamento de resíduos em solo em escala piloto: a taxa de aplicação, as condições ideais de umidade, a necessidade de correção do pH do solo e balanceamento de nutrientes, além das práticas que promovam a mistura do resíduo ao solo, de uma maneira que torne possível a manutenção de condições aeróbias necessárias à degradação (ABNT-NBR-14283:1999).

Para a aplicação deste método, é muito importante seguir a sequência: preparação da mistura solo-resíduo, o balanceamento dos nutrientes no solo, o ajuste da umidade do solo, a montagem dos respirômetros.

3. METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Materiais Compósitos, Biocorrosão e Corrosão (CompoLab-LBC), no Instituto de Petróleo e Energia (LITPEG), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), situado na cidade de Recife – PE.

Os experimentos foram divididos em 5 etapas: 1) amostragem e caracterização dos solos; 2) preparo do bioaumento; 3) montagem dos respirômetros de Bartha e biorreatores; 4) análise microbiológica dos solos; 5) análise da taxa de corrosão do solo com bioaumento com fungo.

3.1. COLETA E PREPARO DO SOLO

O solo do Porto de Suape foi coletado no Complexo Portuário, localizado no município de Ipojuca (PE). A coleta foi feita conforme ABNT-NBR-14283:1999. A área de estudo correspondia a aproximadamente de 400 m². Foram coletadas 5 amostras em diferentes regiões, com o auxílio de um cavador de solo, em uma profundidade de 15 cm e armazenadas em um recipiente limpo, conforme Figura 1.

Figura 1 - Coleta do solo do Complexo de Suape



Fonte: Autora (2023).

As amostras individuais foram bem misturadas e o solo homogeneizado foi espalhado em mesa de laboratório, conforme Figura 2, em temperatura ambiente por 4 dias.

Figura 2 - Amostra de solo dispersa em bancada



Fonte: Autora (2023).

Após os 4 dias o solo foi peneirado em malha 2,0 mm (ABNT-NBR-14283:1999), conforme Figura 3. Em seguida, o solo foi armazenado em uma caixa de plástico com tampa, em temperatura ambiente, até a realização dos experimentos. O solo assim peneirado foi chamado de Terra Fina Seca ao Ar (TFSA)

Figura 3 - Peneiramento do solo em malha 2,0 mm



Fonte: Autora (2023).

3.2. ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DO SOLO

Depois da homogeneização, separou-se uma quantidade de aproximadamente 500g para as análises de caracterização do solo, que constituíram em análises de granulometria, umidade, curva de neutralização do solo, capacidade de retenção de água no solo, pH,

carbono orgânico total, densidade de partículas, densidade aparente, porosidade e óleo e graxas residuais.

3.2.1. Análise da granulometria

As análises da granulometria e classificação do solo foram feitas segundo a metodologia proposta pela EMBRAPA.

3.2.2. Análise de umidade

A análise de umidade foi realizada calculando-se a umidade por meio da diferença gravimétrica após secagem da amostra do solo (EMBRAPA, 2017).

Pesou-se 10g de TFSA, ao centésimo de grama (Pu), em placa de Petri. Em seguida secou-se em estufa a 105°C durante 24h, retirando para resfriar em dessecador, durante 3 horas. Na sequência, pesou-se e repetiu a operação de secagem em estufa a 105°C, durante 1h. Repetiu-se as etapas de secagem e pesagem até a obtenção de peso constante (Ps).

3.2.3. Análise de curva de neutralização

A curva de neutralização foi realizada conforme adaptação da ABNT-NBR-14283:1999, em que a menor massa de CaCO_3 foi adicionada, o suficiente para elevar o pH do solo a 7.

Pesou-se $10 \pm 0,1$ g da amostra para cada ponto de curva de neutralização. Adicionou-se 50 mg, 100 mg, 150 mg, 300 mg e 500 mg de carbonato de cálcio (CaCO_3). Misturou-se bem, cobriu-se para que as amostras não ressecassem. Após 1 semana de repouso, o pH foi medido.

3.2.4. Análise de capacidade de retenção de água no solo

A análise de capacidade de retenção foi realizada sobre um papel filtro em funil de vidro, onde foram pesados 100 g de TSFA, dispostos sobre uma proveta graduada de 100 ml, em triplicata, conforme Figura 4. Vertereu-se 100 ml de água destilada sobre a amostra de solo, de forma que a água percolada alcançasse a proveta, por 24 horas, pesando-se o percolado no final (LIMA, 2004; CIANNELA, 2010).

Figura 4 - Análise da capacidade de retenção de água



Fonte: Autora (2023).

3.2.5. Análise do pH

A análise do pH foi realizada conforme ABNT-NBR-14283:1999. Na qual foram pesados 10 g de TFSA, juntamente com 25 ml de água destilada, deixando a mistura sob agitação por 15 minutos. Após descansar por 1 hora, foram medidos o pH das amostras, realizadas em triplicata.

3.2.6. Análise do carbono orgânico total

A análise de carbono orgânico total foi realizada utilizando-se o método da mufla, com incineração do carbono orgânico da amostra de solo (GOLDIN, 1987) e a de óleo e graxas residuais foi realizada pela metodologia 5520 D e E (CONAMA N°393/07).

3.2.7. Análise da densidade de partículas

A análise da densidade de partículas foi realizada em um balão volumétrico de 50 ml, na qual transferiu-se 20,0 g de TSFA, previamente seca em estufa a 105°C por 24h. Adicionou-se o volume de álcool etílico P.A. até atingir a aferição do frasco e anotou-se o volume gasto (EMBRAPA, 1997).

3.2.8. Análise da densidade aparente

A análise da densidade aparente foi realizada pesando-se uma proveta de 10 ml e, na sequência adicionou-se solo até atingir o nível de aferimento. Pesou-se a proveta contendo a amostra de solo (EMBRAPA, 1997).

3.2.9. Análise da porosidade

A porosidade é a razão entre o volume ocupado pelos poros e o volume aparente do solo. Para efetuar o cálculo da porosidade, utilizou-se os dados obtidos nos cálculos da densidade de partícula (D_p) e o da densidade aparente (D_A) (EMBRAPA, 1997).

3.2.10. Análise de óleos e graxas

Pesou-se 5 g de TSFA e transferiu-se para cartuchos específicos para extração. As amostras foram levadas ao extrator Soxhlet a 80°C, reciculada com velocidade de 3 ciclos.min⁻¹, durante 4 horas, utilizando-se como solventes a acetona e o hexano (1:1). Após a evaporação dos solventes, calculou-se o teor de óleos e graxas (SECLKER, 2004).

3.2.11. Análises microbiológicas

Foram realizadas caracterizações das concentrações microbiológicas iniciais no solo, antes dos processos de esterilização e bioaumentação com fungos, que se denominou solo controle. Pesou-se 500 g de solo e retirou-se amostras com o objetivo de analisar o solo sem correção de nutrientes e sem contaminação de Diesel-S10, solo controle. Foram feitas as análises de Bactérias heterotróficas aeróbias (BHA) pelo método de número mais provável (NMP) em caldo nutriente, bactérias heterotróficas anaeróbias (BHAn) pelo método de NMP em meio tioglicolato, fungos pelo método *pour-plate* em meio *Sabouraud* e as hidrocarbonoclasticas em meio Bushnell- Hass (BH).

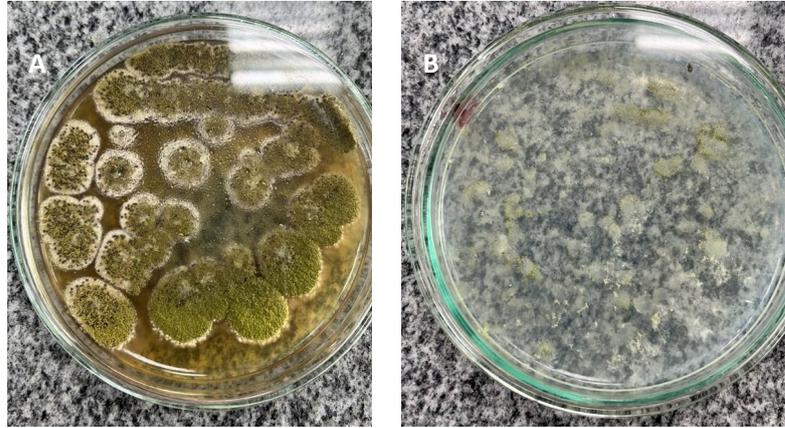
No solo que passou por esterilização, pesou-se 500 g de solo e transferiu-se para um saco plástico a autoclavável, o qual foi esterilizado a 121°C por 30 minutos, dois dias seguidos. Após o processo, amostras de solo foram retiradas para conferência da esterilidade através de quantificações de microrganismos, bactérias aeróbias e fungos, nos meios de *Plate Count Agar* (PCA) e *Sabouraud*, respectivamente.

3.3. ISOLAMENTO DO FUNGO USADO PARA BIOAUMENTO

Foi isolado uma colônia de fungo, que havia crescido em meio BH para crescimento de bactérias hidrocarbonoclasticas. O crescimento de fungo no meio BH não era esperado, por ser um meio adequado para o crescimento de bactérias. Essa colônia foi repicada em meio *Sabouraud* e novo meio BH. O fungo cresceu nos dois meios (Figuras 5a e 5b). Os meios,

com os respectivos fungos foram separados para serem analisados por microscopia óptica, cultivo *in vivo* em câmara úmida.

Figura 5 - Crescimento das colônias de fungos: A. em meio *Sabouraud*; B. em meio BH



Fonte: Autora (2023).

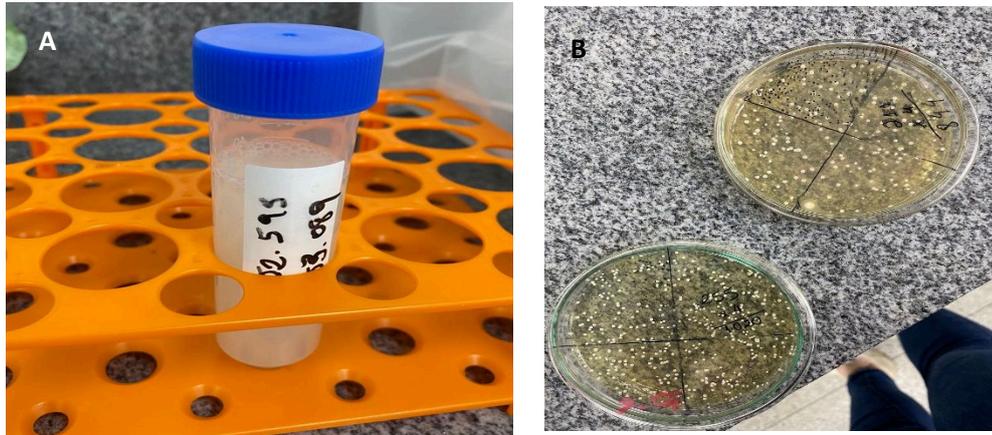
3.4. PREPARO DO INÓCULO DE FUNGOS

O inóculo do fungo foi preparado a partir da cultura do fungo isolada do meio BH, com Diesel S-10 como única fonte de carbono. Foram feitos repiques das colônias para vários tubos com 10 ml de meio BH e colocados para crescer em shaker a 150 rpm, 30°C por 72h. Dessas culturas, foram repassados 10 ml para 90 ml de meio novo BH e 10 ml para 90 ml de meio *Sabouraud*, após 24h nas mesmas condições, escolheu-se o melhor inóculo, para fazer a centrifugação das células.

As culturas que apresentaram crescimento abundante no meio *Sabouraud* foram escolhidas para serem centrifugadas a 5.000 rpm duas vezes, ressuspensando as células em água destilada estéril. As células em água estéril foram separadas para fazer as inoculações (Figura 6a), de acordo com o teor de umidade permitido, nos respirômetro de Bartha e biorreator.

Da suspensão celular (concentração 10^0) foram realizadas várias diluições, até a diluição 10^{-7} . De cada diluição foi realizada uma quantificação celular, por contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC), utilizando meio *Sabouraud* e a técnica *pour-plate*.

Figura 6 - A. Inóculo preparado; B. Células do inóculo inicial de fungos



Fonte: Autora (2023).

3.5. PREPARO DOS SISTEMAS

Para os ensaios de biodegradação, foram montados dois recipientes diferentes para os biorreatores e três sistemas diferentes para os respirômetros, contendo cinco grupos experimentais de solo da seguinte forma:

- **Solo com menor concentração celular**, que foi esterilizado em autoclave a 121°C, 1 atm, por 30 minutos, em dois dias seguidos. Sistema que visou apresentar um solo estéril com contaminação do Diesel S-10 e correção de água e nutrientes;

Após esterilização, o solo foi armazenado no biorreator e respirômetro de Bartha previamente desinfetados com peróxido de hidrogênio a 100 ppm.

- **Solo com fungos**, sistema contendo solo contaminado com Diesel S-10, tendo sido feita a correção de água, correção de nutrientes e foi adicionado o bioaumentador com fungos.

3.5.1. Respirômetros

Para cada respirômetro, pesou-se 46,53 g de solo com umidade residual conhecida. Pesou-se 2,201 g de diesel, referente a massa presente de carbono. Misturou-se o solo e o diesel, tornando a mistura bem homogênea. Com base no conteúdo de carbono do resíduo, foram adicionados 0,6123 g de nitrogênio, através da adição do nitrato de amônio (NH_4NO_3) e 0,1220 g de fósforo, através da adição de K_2HPO_4 , de modo a atingirem a seguinte relação:

(C: N: P) = (100: 10: 1). Esses nutrientes foram dissolvidos na água a ser adicionada para correção da capacidade de campo.

A partir da umidade residual, adicionou-se 3,47 g de água, referente a quantidade de água necessária para que cada respirômetro operasse com umidade do solo entre 50% e 70% da capacidade de campo (ABNT-NBR-14283:1999). Para os respirômetros com bioaumento com fungos, adicionou-se 1,47 g de água e 2 ml do inóculo de fungos, a uma concentração de $9,32 \times 10^8$ UFC/mL.

Foram três tipos de sistemas de respirômetros, cada tipo feito em triplicatas, totalizando nove respirômetros (Figura 7), da seguinte forma:

- **Branco**, contendo apenas a solução de KOH 0,2 N;
- **Solo com menor concentração celular**, contendo solo que passou por processo de esterilização, tendo sido feita a correção de água e com a adição do contaminante Diesel S-10;
- **Fungos filamentosos**, sistema contendo solo contaminado com Diesel S-10, tendo sido feita a correção de água, correção de nutrientes e foi adicionado o bioaumento com fungos.

Adicionou-se os solos nos devidos sistemas e nos braços laterais, foi adicionado 10 ml de KOH, para posteriores leituras pelo método condutimétrico(DM-32 da Digimed).

Figura 7 - Sistema de respirômetros, na sequência: branco, solo estéril e bioaumento com fungos



Fonte: Autora (2023).

Este trabalho foi uma continuidade do experimento do grupo de pesquisa do CompoLab, no qual no experimento anterior foi feita a análise do mesmo solo, sem contaminação com diesel, sem o bioaumento com fungos e sem a correção de nutrientes, para a análise da biodegradação do CO₂ pelo Respirômetro de Bartha. Os resultados, apresentados no Apêndice A, foram utilizados com o objetivo de comparar com os solos com bioestímulo e bioaumento, que foram acrescentados no presente trabalho. Para os cálculos da biodegradação do CO₂ pelo Respirômetro de Bartha, foi utilizada a curva de calibração apresentada no Apêndice B.

3.5.2. Biorreatores

Os biorreatores foram bandejas não metálicas de policloreto de vinila (PVC) com dimensões de 55 cm x 42 cm x 13 cm, com capacidade de 21 L, conforme Figura 8.

Pesou-se 4713,5 g de solo com umidade residual conhecida. Pesou-se 223 g de diesel, referente a massa presente de carbono. Misturou-se o solo e o diesel, tornando-o a mistura bem homogênea. Com base no conteúdo de carbono do resíduo, foram adicionados 62,037 g de nitrogênio, através da adição do nitrato de amônio (NH₄NO₃) e 12,361 g de fósforo, através da adição de K₂HPO₄, de modo a atingindo a seguinte relação: (C: N: P) = (100: 10: 1). Esses nutrientes foram dissolvidos na água a ser adicionada para correção da capacidade de campo.

Em cada biorreator, a partir da umidade residual, adicionou-se 286,5 g de água, quantidade de água necessária para que cada sistema operasse com umidade do solo entre 50% e 70% da capacidade de campo (ABNT-NBR-14283:1999). Para o biorreator com bioaumento com fungos, adicionou-se 266,5 g de água e 20 ml do inóculo de fungos a uma concentração de $9,32 \times 10^8$ UFC/ml.

As montagens dos biorreatores foram feitas da seguinte forma, um biorreator para:

- **Solo com menor concentração celular**, contendo solo que passou por processo de esterilização, tendo sido feita a correção de água e com a adição do contaminante Diesel S-10;
- **Fungos**, sistema contendo solo contaminado com Diesel S-10, tendo sido feita a correção de água, correção de nutrientes e foi adicionado o bioaumento com fungos.

Figura 8 - Biorreator



Fonte: Autora (2023).

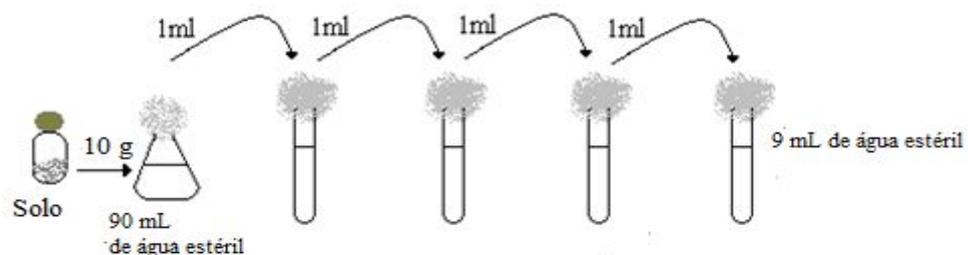
3.6. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DOS SISTEMAS

A quantificação microbiológica foi realizada por meio da inoculação do solo nos tempos de 7, 14, 21, 28, 35 dias.

3.6.1. Quantificação das bactérias heterotróficas aeróbias

Em um Erlenmeyer de 250 ml estéril, pesou-se 10 g de solo contaminado e verteu-se 90ml de água destilada estéril. Em seguida, transferiu-se, com pipeta estéril, 1ml da suspensão para um dos tubos de água estéril, agitando-se bem e deste tubo retirou-se 1ml e transferiu-se para outro tubo com água estéril e assim sucessivamente, sendo realizada uma série de diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , conforme esquema da Figura 9.

Figura 9 - Esquema para isolamento de microrganismos



Fonte: Autora (2023).

Após as diluições sucessivas, fez-se a distribuição dos tubos de ensaio, transferindo-se 1 ml de cada diluição, para o tubo contendo 9 ml do meio. Após inoculação, os tubos foram

incubados em temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 48 horas de incubação, foi realizada a quantificação das bactérias pelo método NMP.

Figura 10 - Estante contendo os meios aeróbios em triplicata e a água de diluição



Fonte: Autora (2023).

3.6.2. Quantificação das bactérias anaeróbias (BHAn)

As BHAn foram quantificadas pela técnica do número mais provável (NMP), utilizando-se frascos do tipo penicilina (volume de 10 ml), contendo 9,0 ml de meio Tioglicolato, purgados com gás nitrogênio por 20 minutos, e 1,0 ml das respectivas diluições, que variou de 10^{-1} a 10^{-8} , com auxílio de seringas descartáveis.

Pesou-se 1 g do solo contaminado em vidro estéril, abriu-se um tubo contendo 9 ml de solução redutora e fez-se a homogeneização (10^{-1}). Dessa diluição foi retirada o restante das diluições $10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$.

Após inoculação, os frascos vedados com tampas de borracha e lacres de alumínio, foram incubados em temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 28 dias. Após período de incubação, realizou-se a verificação do crescimento dessas bactérias para posterior cálculo do NMP/g, conforme Figura 11.

Figura 11 - Bandeja com os meios aeróbios em triplicata e a solução redutora



Fonte: Autora (2023).

3.6.3. Quantificação dos fungos

Os fungos foram quantificados pela contagem das UFC's, utilizando-se a técnica *pour-plate*, com o meio gelose *Sabouraud* (Merk), em placas de Petri, com as devidas diluições, 10^{-1} a 10^{-8} . Ver-teu-se o meio *Sabouraud* fundido, e homogeneizou-se. Foi realizado o controle das placas, meio sem inóculo, para assegurar o padrão de crescimento dos fungos. Após 7 dias de incubação em temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, efetuou-se a contagem das UFC's.

3.6.4. Quantificação das hidrocarbonoclásticas

Pipetou-se 0,1 ml das diluições 10^{-2} a 10^{-8} , utilizadas nas diluições para BHA, em seguida pipetou-se 1,7 ml de meio com meio BH líquido e, logo após, pipetou-se 50 μl de óleo diesel, utilizando as placas de poços.

Foi efetuado um controle das placas, meio sem inóculo, para assegurar o padrão de crescimento das hidrocarbonoclásticas. Após 7 dias de incubação em temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, realizou-se o crescimento dessas bactérias para posterior cálculo do NMP/g.

3.7. TAXA DE CORROSÃO

Para o cálculo das perdas de massa e posterior taxas de corrosão dos aços ASTM A36, seguiu-se a Norma ASTM G1-03 (2011), em que os corpos de prova enterrados foram retirados dos reatores e submetidos aos processos de limpeza destes.

Os cupons foram previamente preparados, sendo lixados, medidos (largura, espessura e altura) e pesados, antes do início dos ensaios. Os cupons apresentavam uma dimensão média

de 17,68 x 5,90 x17,80 mm. No total foram enterrados 15 cupons (Figura 12), sendo retirados três cupons em cada tempo de análise.

Figura 12 - Cupons enterrados no biorreator com bioaumento



Fonte: Autora (2023).

Com o auxílio de uma escova, o excesso de solo aderido ao substrato foi removido para que não houvesse imprecisão no cálculo da perda de massa. Em seguida, os substratos passaram por decapagem ácida, em que os cupons foram imergidos em solução de HCL 15% em vários ciclos de 15s, até estabilização das perdas de massa, enxaguados em água deionizada, álcool isopropílico e acetona (ASTM G1-03, 2011). Após o processo de limpeza (Figura 13), os cupons foram secos com jatos de ar de um secador.

Figura 13 - Sistema da decapagem ácida, na sequência: solução de HCL 15%, álcool isopropílico e acetona



Fonte: Autora (2023).

3.8. LEITURA DOS RESPIRÔMETROS

Nos experimentos respirométricos, os frascos foram preparados em triplicata e incubados a 27 °C em local arejado, conforme mostra a Figura 14. Para o preparo da leitura,

retirou-se os 10,0 mL da solução de KOH 0,2 N do braço lateral, transferiu-se para um recipiente fechado. Em seguida, lavou-se o local onde ficava a solução alcalina com 20 ml de água isenta de CO₂ e transferiu-se essa quantidade de água para o frasco de erlenmeyer.

Após a lavagem, adicionou-se 10 ml de solução de KOH 0,2 ao braço lateral, retornando o respirômetro para incubação, para posterior leitura no dia seguinte. Para cada sistema, foi repetida essa sequência diariamente, durante os 35 dias. O CO₂ produzido foi capturado pela solução de KOH e a quantidade de gás carbônico absorvida foi medida pela leitura da condutividade elétrica.

Figura 14 - Respirômetro montado: o recipiente da esquerda contendo o solo e o braço lateral contendo a solução de KOH 0,2 N



Fonte: Autora (2023).

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO

4.1.1. Caracterização físico química do solo

A caracterização físico-química referente a granulometria do solo é apresentada na Tabela 7, na qual foi realizada antes do solo em estudo ser contaminado com o Diesel S-10.

Tabela 1 - Resultados analíticos da granulometria do solo

Parâmetro	Resultado
Areia (g.Kg ⁻¹)	957,00
Silte (g.Kg ⁻¹)	12,00
Argila (g.Kg ⁻¹)	31,00
Classe Textural	Arenoso

Fonte: Autora (2023).

O solo estudado é predominantemente arenoso, tendo uma maior proporção de areia na média, o que torna favorável a uma maior retenção de água, em comparação a uma condição de predomínio de areia grossa (SILVA, 2006).

A caracterização físico-química resumida do solo é apresentada na Tabela 8, esta foi realizada antes da contaminação do solo com Diesel-S10.

As propriedades de maior importância para o estudo são: retenção de água, teor de umidade e carbono orgânico total. Se as condições do solo não forem favoráveis, a biorremediação pode ser limitada por causa da baixa sobrevivência e à atividade dos microrganismos degradadores.

Tabela 2 - Resultados analíticos físico-químicos do solo

Parâmetro	Resultado	Parâmetro	Resultado
Retenção de água (%)	30,00	Carbono orgânico total (%)	<0,30
Densidade da partícula (g/ml)	2,67	Nitrogênio total (mg/Kg de N)	124,60
Densidade aparente (g/ml)	1,49	Fósforo (mg/dm ³ de P)	18,29
Teor de umidade (%)	0,35	Potássio (cmol/dm ³ de K)	0,15
pH	8,02	Enxofre (mg/dm ³ de S)	38,00
Porosidade (%)	43,99	Ferro (mg/dm ³ de Fe)	30,00
Óleos e graxas (%)	0,20		

Fonte: Autora (2023).

O pH do solo estudado está em torno de 7,9 a 8,2, um solo predominantemente básico. Em solos com pH elevado a atividade microbiana é favorecida podendo refletir no acúmulo ou no decréscimo de matéria orgânica (MO) do solo (TREVISAN, 2002).

O fator ambiental mais crítico é a umidade do solo, pois só há uma alta atividade microbiana se houver a disponibilidade adequada de água para os microrganismos (HAIDER, 1999). Ademais, o teor de água no solo tem relação inversa com a disponibilidade de oxigênio e, conseqüentemente, com a atividade dos microrganismos aeróbios, que são os principais responsáveis pela degradação dos hidrocarbonetos derivados do petróleo. Por isso, a umidade do solo estudado, para o reator estéril e o de bioaumento, foi ajustada em 60% da capacidade de retenção, uma vez que, além da umidade se correlacionar com a atividade microbiana (JANSSENS, 2001) atua como atenuador da temperatura e, conseqüentemente, influencia sobre a atividade microbiana.

Normalmente, nos ambientes naturais, o nutriente que limita o crescimento microbiano é o carbono, já os nutrientes inorgânicos estão presentes em quantidades que normalmente excedem as demandas das comunidades microbianas (ALEXANDER, 1999). Recomenda-se a relação C:N:P de 100:10:1 no solo a ser biorremediado (CHENG; MULLA, 1999), por isso o solo ajustado foi corrigido, para essa proporção.

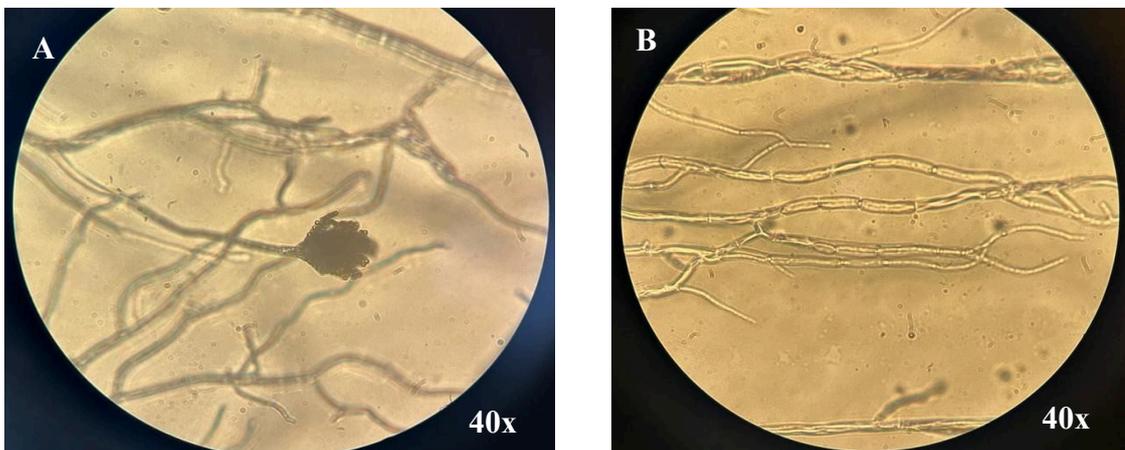
Outros nutrientes que influenciam a degradação dos hidrocarbonetos derivados do petróleo no solo são o ferro e o enxofre, por desempenharem funções celulares que estão intimamente relacionadas ao metabolismo destes hidrocarbonetos, como a participação na estrutura das enzimas que realizam a degradação destes compostos nas células microbianas. O conhecimento das concentrações desses elementos químicos também são fundamentais para se trabalhar em medidas de proteção dos materiais, pois valores maiores nas concentrações desses elementos elevam as taxas de corrosão de diversos materiais.

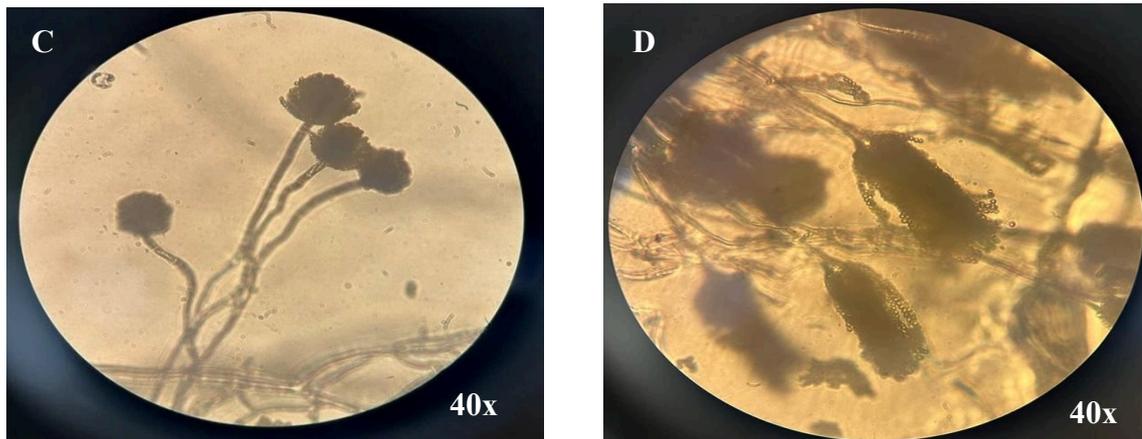
Vale salientar que a adição de nutrientes ao solo só deve ser feita após uma avaliação bem criteriosa, para se evitar adições desnecessárias de produtos químicos, que resultam em aumentos dos custos e em prejuízos aos processos de biorremediação.

4.1.2. Isolamento e caracterização do fungo

As culturas de fungos que cresceram nos meios *Sabouraud* e BH, foram analisados por microscopia óptica, cultivo *in vivo* em câmara úmida. As Imagens das Figuras 15 a,b,c,d mostram os fungos nos meios BH a,b,c e *Sabouraud* d em microscopia ótica, câmara úmida, aumento de 40x.

Figura 15 – Câmara úmida, aumento de 40x: A,B,C: meio *Sabouraud*; D: meio BH





Fonte: Autora (2023).

Através das imagens por microscopia ótica, Figura 15, pode-se observar um crescimento de fungos nos meios com hifas septadas vegetativas e reprodutivas. Os conídios foram produzidos em cadeia na extremidade do conidióforo e são estruturas típicas de fungos do tipo *Penicillium* (TORTORA, FUNKE, CASE; 2017).

Segundo Cerniglia e Perry (1973), havendo poluição por causa de derramamento de petróleo e derivados, o tratamento pode ocorrer de forma mais eficiente se microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, incluindo os fungos, forem adicionados ao ambiente em grande quantidade, juntamente com a adição de nitrogênio e fósforo. Outros estudos realizados utilizaram os fungos do gênero *Penicillium*, demonstrando degradação nos hidrocarbonetos presentes de petróleos e derivados (SILVA; ESPOSITO, 2004). A concentração do inóculo inicial de fungos foi $9,32 \times 10^8$ UFC/ml.

4.1.3. Caracterização físico-química do óleo diesel

O óleo Diesel S-10 utilizado para contaminar o solo foi comprado no posto combustível BR, na qual, junto a compra, obteve-se o boletim de conformidade do combustível, exposto na Tabela 9.

Tabela 3 - Caracterização físico-química do óleo Diesel S-10

Parâmetro	Resultado
Aspectos visuais	Límpido
Cor visual	Amarelada
Condutividade elétrica (pS/m)	79,0
Massa específica a 24°C (kg/m ³)	841,3
Ponto de fulgor (°C)	62,0
Teor de água (ppm)	71,0

Fonte: Autora (2023).

A presença de frações mais pesadas é evidenciada pelo valor elevado de massa específica. Comparado ao diesel do tipo marítimo, o S-10 apresenta menor massa específica, o que pode estar relacionado a um maior teor de parafinas e cadeias carbônicas mais curtas (PEIXOTO; COSTA; ARAUJO; FERNANDES, 2015).

O ponto de fulgor está relacionado à inflamabilidade e varia em função do teor de hidrocarbonetos leves existentes no diesel, limitando os pontos iniciais de ebulição do produto. Uma vez que a inflamabilidade aumenta com uma maior quantidade de hidrocarbonetos leves, essa característica confere temperaturas de ponto de fulgor mais altas para os combustíveis com menores concentrações de enxofre. O diesel usado no experimento apresenta o ponto de fulgor dentro do esperado.

Através dos dados obtidos constatou-se que o diesel usado no experimento apresentou as características físico-químicas esperadas ao produto.

4.2. QUANTIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

No solo controle as análises iniciais das concentrações de microrganismos foram:

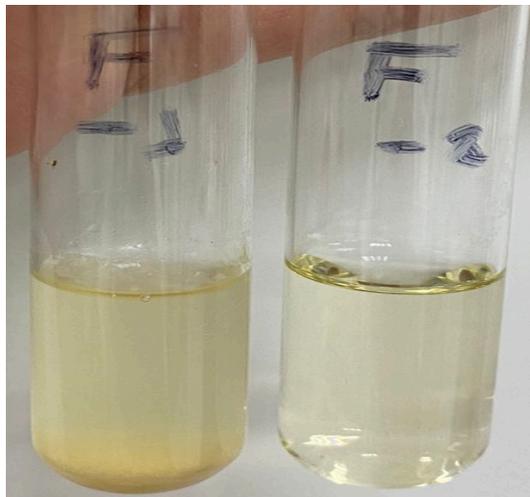
- Bactérias Heterotróficas Aeróbias: $1,40 \times 10^5$ NMP/g de solo;
- Bactérias Heterotróficas Anaeróbias: $1,40 \times 10^4$ NMP/g de solo;;
- Bactérias Hidrocarbonoclasticas: $1,40 \times 10^8$ NMP/g de solo;;
- Fungos filamentosos: $7,33 \times 10^2$ UFC/g de solo.

No solo que passou por esterilização, foram feitas análises de quantificações microbiológicas e foram encontradas concentrações de bactérias heterotróficas aeróbias de $1,0 \times 10^2$ UFC/ml e fungos 2,0 UFC/ml.

4.2.1. Bactérias Heterotróficas Aeróbias

No total, foram feitas cinco inoculações no tempo de 7, 14, 21, 28 e 35 dias, para os dois sistemas. A presença das bactérias aeróbias no solo em estudo foi feito macroscopicamente, observando se o meio contendo o inóculo havia ficado turvo ou não, conforme a Figura 16.

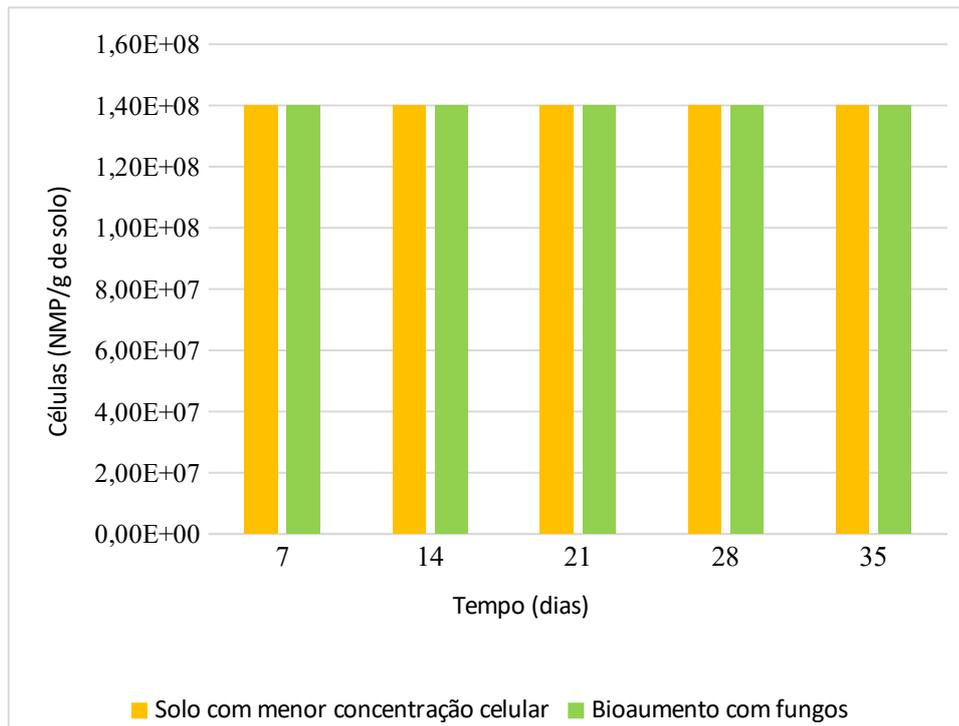
Figura 16 - Tubos contendo meios aeróbios



Fonte: Autora (2023).

Na Figura 17 foi possível observar que o tubo de ensaio da esquerda está turvo, indicando a presença das bactérias aeróbias no solo. Já o da direita continuo límpido, indicando que não houve crescimento nessa diluição.

Figura 17 - Bactérias Heterotrófas Aeróbias



Fonte: Autora (2023).

No tempo 0, onde foi analisado o solo controle (item 3.2.11), houve crescimento das BHA, o que era esperado no solo, pois se tem um ambiente com oxigenação. Segundo Moreira e Siqueira (2006), naturalmente as bactérias estão presentes no solo em densidade de 10^7 células/g de solo, onde 10^6 correspondem às BHA.

É possível observar através da Figura 20 o crescimento das BHA no solo com menor concentração celular, que foi passado pela esterilização, indicando que a esterilização do solo, utilizando a autoclavagem, não foi suficiente, pois foi quantificado uma concentração inicial das BHA no solo. O crescimento não necessariamente está relacionado com a ineficiência da esterilização.

A partir de 7 dias, as concentrações dessas bactérias elevaram-se até a ordem de grandeza 10^8 , máximo de diluições dos inóculos realizadas. Crescimento justificado pela bioestimulação do solo, pois a correção dos nutrientes, especialmente o nitrogênio, ajuda no crescimento das BHA, como verificado em diversos trabalhos (GALLEGO et al., 2001; CARDONA e ITURBE, 2003).

No solo com bioaumento com fungos, observou-se que no início as BHA estavam numa baixa concentração no solo controle, mas com o passar do tempo houve o crescimento delas.

Por causa do curto período do tempo do experimento, não foi possível observar a diminuição das BHA, outros trabalhos da literatura mostram que em torno 6 meses é possível observar uma estabilização (MARIANO, 2006). A presença de bactérias aeróbias no solo era esperado inicialmente no sistema, pois tinha-se um ambiente com oxigenação.

4.2.2. Bactérias Heterotróficas Anaeróbias

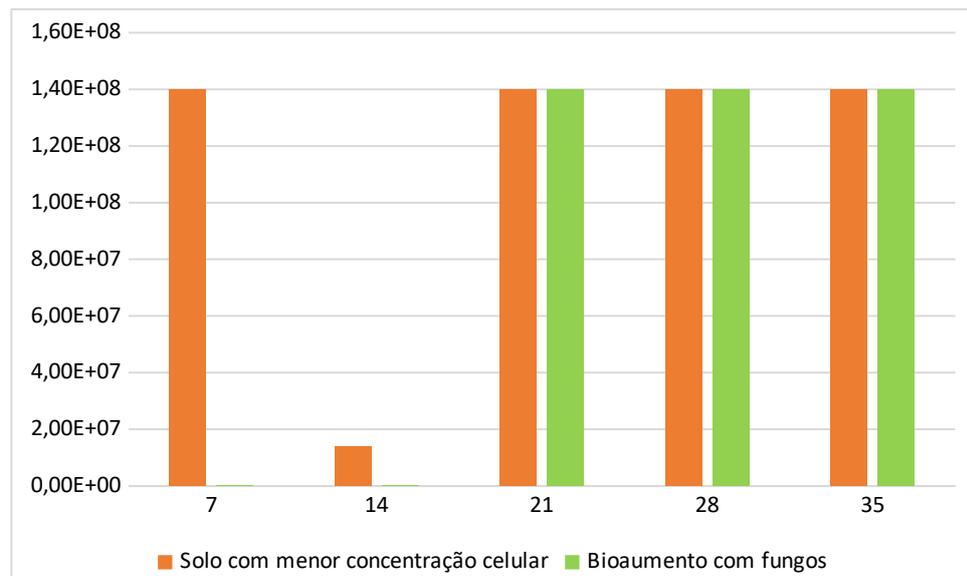
Na Figura 18 foi possível observar crescimento típico nas análises dessas bactérias, os dois primeiros tubos da esquerda estão turvos, indicando a presença das bactérias anaeróbias no solo. Já o da direita continuo límpido, indicando que não houve crescimento.

Figura 18 - Tubos contendo meios anaeróbios



Fonte: Autora (2023).

Figura 19 - Bactérias Heterotróficas Anaeróbicas



Fonte: Autora (2023).

As BHAn nos 2 solos estudados tiveram um comportamento semelhante, como é possível observar na Figura 19. No solo controle, apresentaram baixas concentrações em torno de 10^4 células/cm². Mas, após 21 dias suas concentrações tornaram-se máximas e constantes para os 3 pontos de inoculação, permanecendo com as mesmas concentrações até o fim dos 35 dias de experimento.

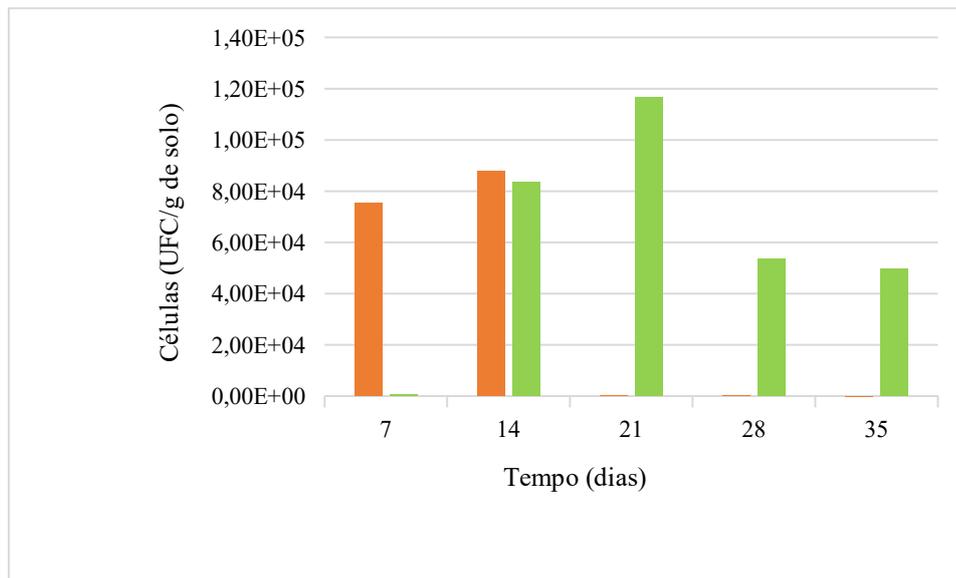
No solo com bioaumentação com fungos, observou-se que no início as BHAn estavam numa baixa concentração (item 3.2.11), possivelmente porque o solo estava com uma alta concentração de fungos, por conta do bioaumentação mas com passar do tempo houve o crescimento delas.

A presença de bactérias anaeróbicas no solo não era esperado inicialmente no sistema, pois se tem um ambiente com oxigenação, mas no decorrer do tempo as BHAn presentes no solo vão consumindo o oxigênio presente e deixando um ambiente propício para o aumento da concentração das anaeróbicas. Por causa do curto período de tempo do experimento, não foi possível observar alterações maiores nos crescimentos das bactérias aeróbicas e anaeróbicas. Outros trabalhos da literatura mostram que com aproximadamente 6 meses ou mais é possível observar alterações maiores nas concentrações dessas bactérias (GALLEGO et al., 2001; CARDONA e ITURBE, 2003).

4.2.3. Fungos filamentosos

No solo com menor concentração celular foi observado o crescimento de colônias no tempo zero e nas diluições de 10^{-1} e 10^{-2} , onde não foi possível contabilizar as colônias. Através da Figura 20, é possível observar o declínio da presença dos fungos no solo com menor concentração celular, indicando que a esterilização em autoclave foi eficiente para diminuir a concentração de fungos presente no solo ao longo do tempo, apesar de não ter ocorrido o mesmo em relação as bactérias.

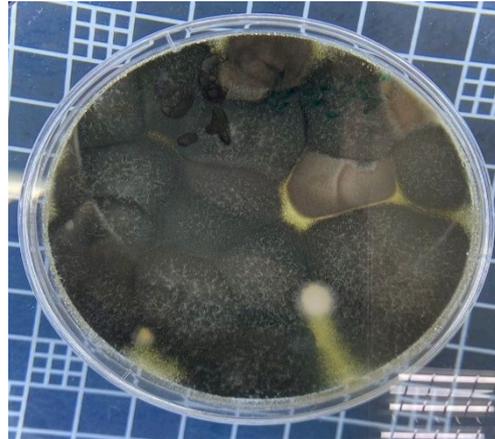
Figura 20 – Fungos filamentosos



Fonte: Autora (2023).

Todas as células de fungos que cresceram no solo com menor concentração celular, possuíam as mesmas características, cor escura, tamanho grande, forma circular, bem característico do gênero *Penicillium*, que é comumente encontrado em solos, conforme a Figura 21.

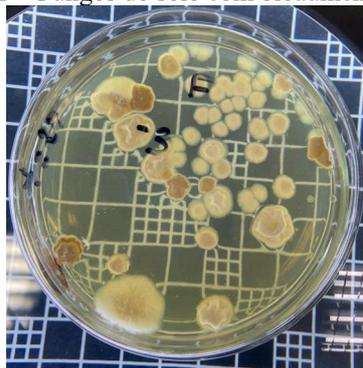
Figura 21 - Fungos no solo com menor concentração celular



Fonte: Autora (2023).

Na inoculação do solo com bioaumentação com fungos, após o período de incubação, foi observado o crescimento de colônias nas diluições de 10^{-1} até 10^{-4} , para as cinco inoculações feitas, onde nos 3 primeiros pontos de inoculação observou-se uma média de um total de 150 colônias nas diluições de 10^{-3} e nos últimos pontos observou-se uma redução para 50 colônias, as quais em todas possuíam as mesmas características. Através da Figura 20 foi possível observar que houve o crescimento celular, onde o máximo foi com 21 dias e após isso começou a ter o declínio, provavelmente devido a degradação dos hidrocarbonetos provenientes da contaminação (RUDD, 1996).

Figura 22 - Fungos do solo com bioaumentação com fungos



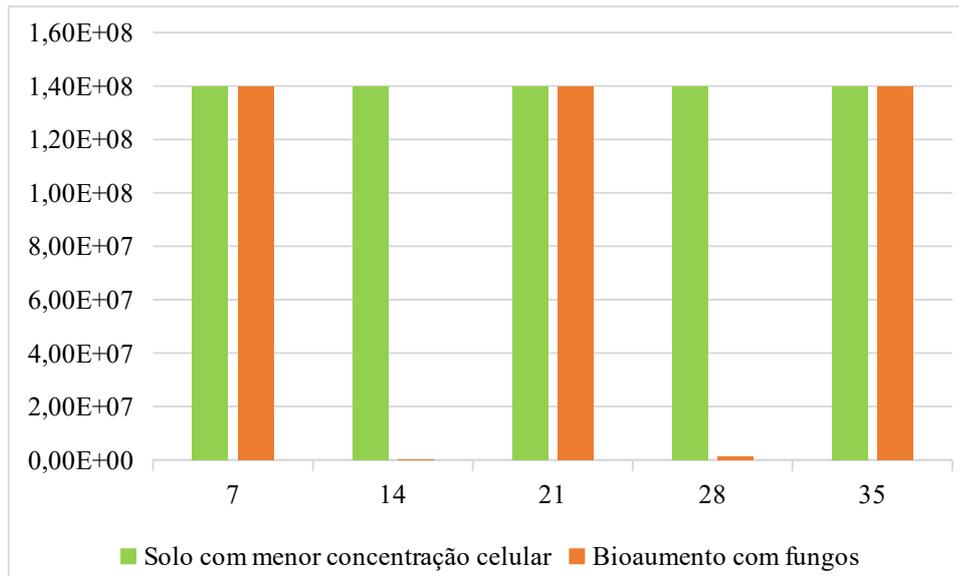
Fonte: Autora (2023).

As células de fungos possuíam as mesmas características, cor bege, tamanho médio, forma circular. Na parte superior, as colônias possuíam micélio aéreo característico de fungos filamentosos, bem característico do fungo que foi isolado para ser usado como bioaumentação no experimento. Ao final do experimento, não foi possível fazer a caracterização

microscópica do fungo utilizando a técnica da câmara úmida, semelhante ao que feito inicialmente, para confirmar se o fungo foi o mesmo que o inoculado.

4.2.4. Hidrocarbonoclásticas

Figura 23 - Hidrocarbonoclásticas

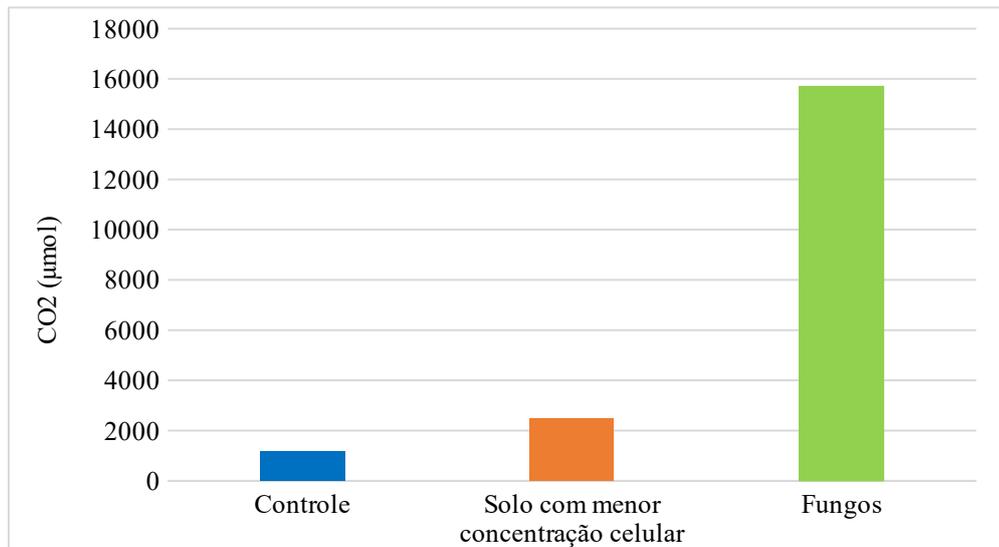


Fonte: Autora (2023).

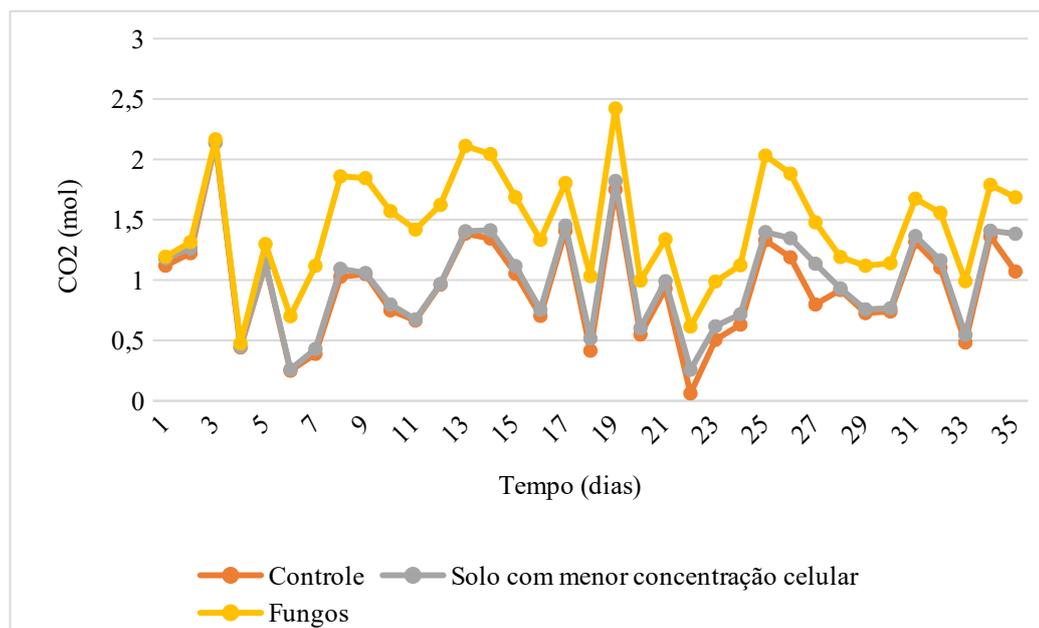
Através da Figura 23, foi possível observar que nos dois sistemas houve presença das hidrocarbonoclásticas, no qual através das análises do solo controle estas bactérias já estavam presentes na microbiota do solo, possivelmente por conta da região que o solo foi retirado (Porto de Suape), próximos de tanques de reserva de Diesel S-10.

4.3. DETERMINAÇÃO BIODEGRADAÇÃO PELO MÉTODO RESPIROMÉTRICO

As quantidades totais cumulativas de CO_2 produzidas pelos solos tratados ao longo do período de incubação de 35 dias e pelo solo controle analisado em primeiro experimento (Apêndice A), são mostrados nas Figuras 24 e 25.

Figura 24 - Produção total de CO₂

Fonte: Autora (2023).

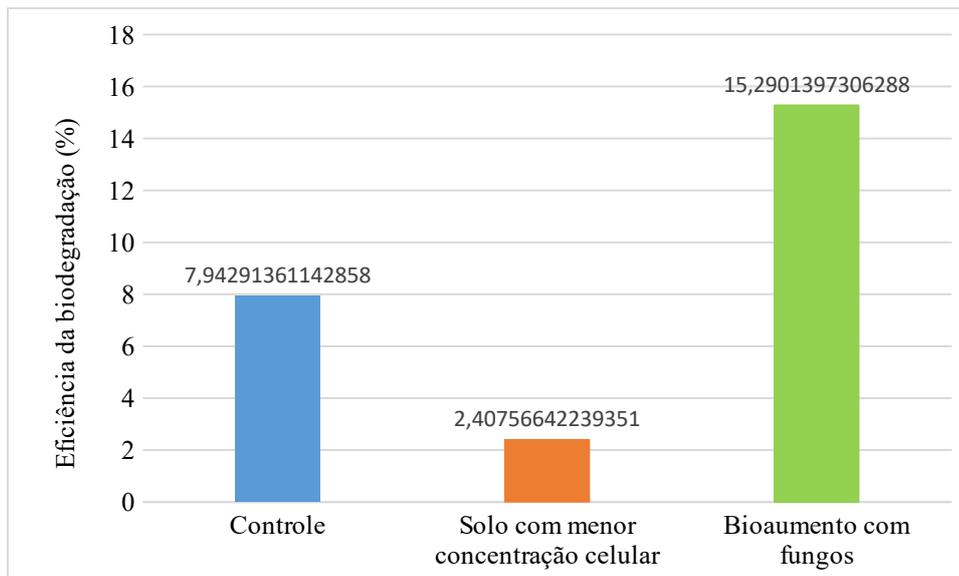
Figura 25 - Produção diária de CO₂

Fonte: Autora (2023).

Segundo Thomaz et al. (1997) e Zuccari (1991), a elevação dos valores da condutividade elétrica com o decréscimo da concentração de oxigênio dissolvido está relacionada às altas taxas de decomposição da matéria orgânica, ou seja, o oxigênio dissolvido tem comportamento inverso ao da condutividade e os resultados estão conforme o esperado.

Por causa do curto período do experimento, não foi possível observar uma estabilização na degradação através da produção de CO₂, outros trabalhos da literatura mostram que na maioria das vezes, um tempo em torno de 6 meses foi possível observar a estabilização. Não houve fase de adaptação em nenhum dos tratamentos, possivelmente devido a uma adaptação prévia dos microrganismos aos poluentes e a favoráveis condições experimentais (MARIANO, 2006).

Figura 26 - Eficiência da biodegradação



Fonte: Autora (2023).

Porém, é possível observar através da Figura 26 que o bioaumentação com consórcio fúngico isolado foi a variável que teve o maior valor positivo no efeito nas taxas de biodegradação. Comparando os tratamentos, é possível observar que a presença do consórcio no tratamento melhorou claramente a eficiência da biodegradação. Com 21 dias de incubação (Figura 25), foi possível observar uma menor produção de CO₂, supostamente devido à degradação dos hidrocarbonetos prontamente degradáveis e ao consumo de nutrientes.

A variação na geração (concentração) do CO₂ pode ser causada por uma transição de fontes de carbono e a escassez dessas fontes, força os microrganismos a se adaptarem a fontes mais recalcitrantes, resultando em uma diminuição da produção de CO₂. Como esperado, esse comportamento foi mais evidente nos tratamentos com adição de nutrientes e do bioaumentação com fungos, possivelmente causado pelo efeito benéfico obtido com a adição de nutrientes e bioaumentação (HENCKLEIN, 2005).

No solo com menor concentração celular, no qual houve apenas a adição de nutrientes e do contaminante, o Disel-S10, observa-se que houve um efeito positivo menos nítido. A correção nutricional está relacionada ao fato de que a taxa em que as células microbianas podem converter compostos químicos durante a biorremediação depende da velocidade do metabolismo (BOSMA, 1997). Porém, a correção nutricional pode não ter efeito se a transferência de massa for um fator limitante.

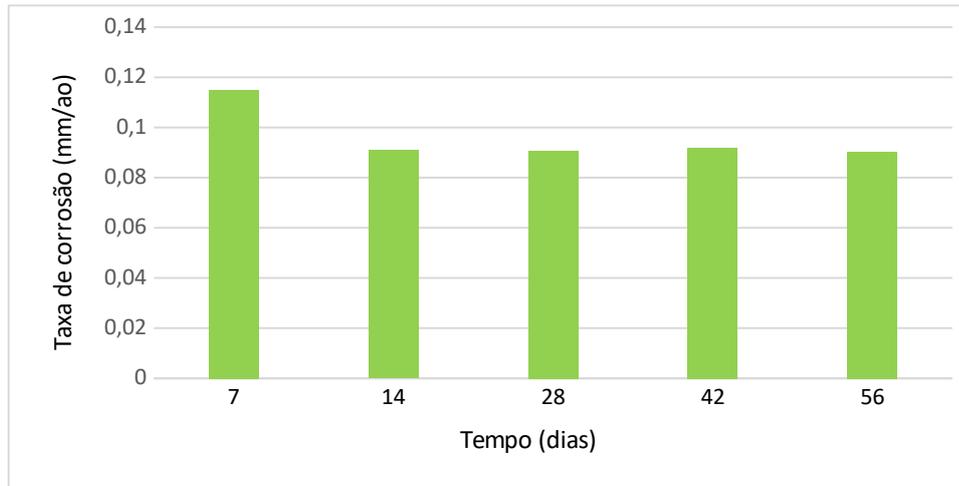
O bioestímulo através da adição de nutrientes (N e P) vem sendo um fator importante para aumentar a eficiência da biorremediação. Porém, o foco principal desse experimento foi aumentar a eficiência da biorremediação mediante um bioaumento com fungos. Observa-se que o bioestímulo não teve uma maior revelação, de maneira que este tratamento obteve uma eficiência de biodegradação com pouca diferença em relação ao controle.

4.4. TAXAS DE CORROSÃO

A análise das taxas de corrosão de um determinado material ajuda a determinar o quão agressivo é um meio corrosivo, assim como a estimar a vida útil de um equipamento, por exemplo. Os valores das taxas são influenciados por características químicas (gases dissolvidos, salinidade, pH), físicas (velocidade, temperatura e pressão) ou biológicas (microorganismos e macroorganismos) do meio (GENTIL, 2011).

As taxas de corrosão, por perda de massa, dos cupons de aço que foram enterrados no biorreator do solo controle do experimento anterior (Apêndice C) estão apresentados na Figura 27 abaixo. Os corpos de prova dos sistemas foram retirados do solo controle nos tempos 7, 14, 28, 42, 56 dias.

Figura 27 - Taxa de corrosão do biorreator do solo controle

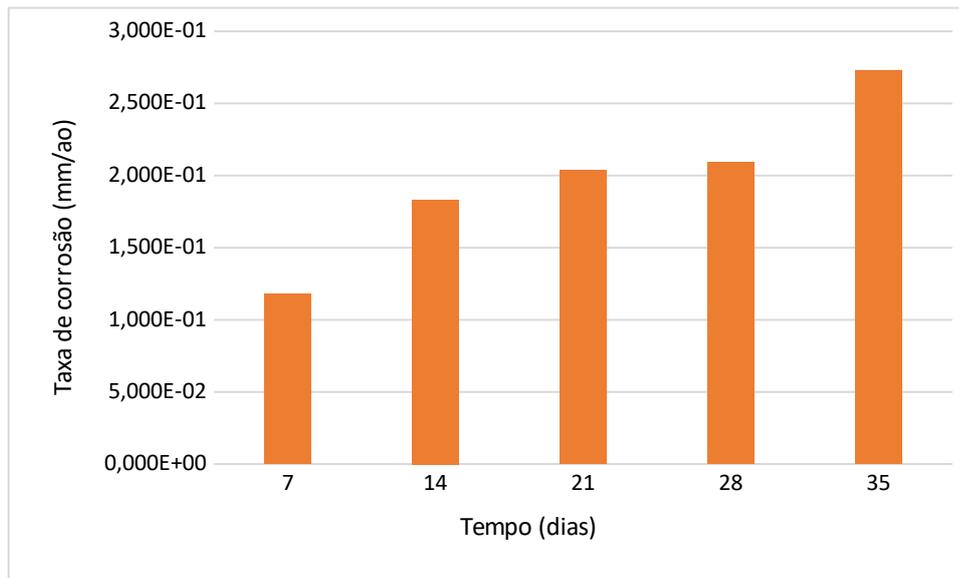


Fonte: Autora (2023).

As taxas de corrosão dos cupons foram 0,09 mm/ano com 56 dias, sendo considerada de moderada corrosividade. Pode-se observar que a taxa de corrosão decaiu após 7 dias, mas foi estabilizando à medida que os dias passavam, o que era esperado. Quando os aços estão expostos ao ambiente, tem todos os íons e moléculas agressivos com livre acesso ao material. Nesse momento, na maioria dos casos, as taxas de corrosão são sempre mais elevadas. Com o passar do tempo, em volta do aço podem ser formados biofilmes e camadas de óxidos que geralmente tem efeito barreira, diminuindo a agressividade do local e consequentemente as taxas de corrosão dos materiais (GENTIL, 2022). No solo controle, que é o solo somente com a umidade corrigida, com o passar dos dias vai havendo também o decréscimo da ação dos metabólicos microbianos corrosivos.

As taxas de corrosão, por perda de massa, dos cupons de aço que foram enterrados no biorreator com o bioaumento com fungos estão apresentadas na Figura 28. Os corpos de prova dos sistemas foram retirados do solo com o bioaumento de fungos nos tempos de 7, 15, 21, 28, 35 dias.

Figura 28 - Taxa de corrosão do biorreator do solo com bioaumentação de fungos



Fonte: Autora (2023).

As taxas de corrosão dos cupons enterrados no solo com bioaumentação de fungos foi 0,190 mm/ano com 35 dias, sendo considerada de severa corrosividade. Observa-se que as taxas de corrosão dos aços aumentaram de forma gradativa ao longo dos dias, que podem ser justificadas por a correção dos nutrientes ao solo, que geralmente melhoram as taxas de biodegradações nos solos, mas podem elevar as taxas de corrosão dos materiais. A maior concentração celular no solo também pode ter contribuído com o aumento dos metabólitos corrosivos no local (VIDELA, 2003).

Os cupons no solo com bioaumentação apresentaram taxas de corrosão dos aços aproximadamente 60,0% maior, que as taxas dos cupons controle. Vale salientar que o tempo para o solo controle foi maior do que o solo com bioaumentação, mas mesmo em tempo menor, a ação corrosiva foi bem maior neste sistema. Este aumento nos valores das taxas de corrosão dos aços, provavelmente foram ocasionados pela ação dos produtos químicos adicionados como nutrientes ao solo e os metabólitos corrosivos excretados por os fungos, que podem acelerar a corrosão dos metais.

Figura 29 - Cupom desenterrado após 7 dias. Antes e após a decapagem ácida, respectivamente



Fonte: Autora (2023).

Figura 30 - Cupom desenterrado após 14 dias. Antes e após a decapagem ácida, respectivamente



Fonte: Autora (2023).

Figura 31 - Cupom desenterrado após 21 dias. Antes e após a decapagem ácida, respectivamente



Fonte: Autora (2023).

Figura 32 - Cupom desenterrado após 28 dias. Antes e após a decapagem ácida, respectivamente



Fonte: Autora (2023).

Figura 33 - Cupom desenterrado após 35 dias. Após a decapagem ácida



Fonte: Autora (2023).

Macroscopicamente observa-se que a corrosão foi uniforme no sistema, assim como seu aumento gradativo com o passar do tempo, como demonstraram as medidas das taxas de corrosão dos aços. Nas imagens também se observam corrosão localizada, mas nessa pesquisa não foi quantificada nenhum tipo de corrosão localizada.

5. CONCLUSÃO

O solo estudado foi classificado como arenoso de acordo com a caracterização geotécnica. Em solo arenoso se tem uma menor capacidade de retenção de água, influenciando no teor de umidade do solo e crescimento de microrganismos.

A esterilização do solo em autoclave por dois dias seguidos a 121°C, 1 atm, por 30 minutos não foi eficiente para tornar o solo sem atividade microbiana. Notou-se uma diminuição das atividades dos fungos e não eliminou as bactérias.

Foram encontradas no solo concentrações altas de microrganismos responsáveis pelo processo de biocorrosão tais como: bactérias heterotróficas aeróbias, bactérias heterotróficas anaeróbias, bactérias hidrocarbonoclasticas e fungos filamentosos.

As avaliações das taxas de corrosão dos aços nos solos avaliados foram classificadas como moderada para o solo controle e severa para o solo com bioaumento de fungos, demonstrando nesse experimento, que o bioestímulo com os nutrientes, acompanhado com o bioaumento de fungos nos solos contribuíram para um acréscimo da capacidade corrosiva do solo.

As técnicas de bioestímulo e bioaumento utilizadas nesse experimento demonstraram aplicabilidade nos solos do Porto de SUAPE, pois os grupos de microrganismos analisados demonstraram um bom crescimento no solo com e sem contaminação com o Diesel S-10. As respostas as técnicas utilizadas foram favoráveis, mesmo em um curto período de análise. No entanto é necessário cautela na Região onde se utilizará as técnicas, pois nesta pesquisa foi verificado que a inserção de produtos químicos, assim como o aumento da concentração celular no solo, aumentou as taxas de corrosão dos materiais. As técnicas de biorremediação deverão ser *ex-situ* e não *in-situ*, por inúmeras tubulações de gases e fluidos enterradas na Região, podendo comprometer o tempo de vida útil dos materiais.

REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas; **Resíduos em solos – Determinação de biodegradação pelo método respirométrico**; NBR 14283,1999.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2.ed. New York: Academic, 1999. 453p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM G1-03: Standard Practice for Preparing, Cleaning and Evaluating Corrosion Test Specimens**. West Conshohocken: ASTM, 2011.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F. JARDIM, I. C. S. F. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados**. Eclética Química, Campinas, p.17-43, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-46702010000300002&script=sci_arttext>

ASTM G1-03. **Standard Practice for Preparing, Cleaning, and Evaluating Corrosion Test Specimens**. 2011.

BALDAN, E.; BASAGLIA, M.; FONTANA, F.; SHAPLEIGH, J.P.; CASELLA, S. **Development, assessment and evaluation of a biopile for hydrocarbons soil remediation**. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 98, p. 66-72, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.002>

BENTO, D. M. **Análise química da degradação dos hidrocarbonetos de óleo diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS**. 2005. 112 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2005.

BERGER, T. M. **Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos totais de petróleo: enfoque na aplicação do processo Terraferm**. Tese (Doutorado em Ecologia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 86p. 2005. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/10900/000590396.pdf?s>>

BESKOSKI, V.P.; GOJGIĆ-CVIJOVIĆ, G.; MILIĆ, J.; ILIĆ, M.; MILETIĆ, S.; SOLEVIĆ, T.; VRVIĆ, M.M. **Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy**

residual fuel oil) – A field experiment. Chemosphere, v. 83, p. 34-40, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.020>

BOSMA, T. N. P.; MIDDELDORP, P. J. M.; SHRAA, G.; ZEHNDER, A. J. B. **Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability.** Environ. Sci. Technol., v. 31, p. 248-252, 1997.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), **Resolução nº 393 de Agosto de 2007.** Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2007.

BRASIL. Agência Nacional De Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Resolução nº 65 de 9 dezembro de 2011.** Diário Oficial da República, Brasília, 2011.

CAMPOS, I. Z. A. **A importância de tratamento de águas residuais através da biorremediação: Uma análise principiológica.** Revista FIDES, v. 5, n. 2, 2014.

CARDONA, S.; ITURBE, R., 2003. **Biodegradación de diesel mexicano por un consorcio de bacterias de un suelo agrícola.** DYNA, v.138, p. 13-26, 2003.

CERNIGLIA, C.E.; PERRY, J.J. **Crude oil degradation by microorganisms isolated from the marine environment.** Zeitschrift fur. Allg. Mikrobiologie, v.13, n.4, p. 299-306, 1973.

CHENG, H.H.; MULLA, D.J. **The soil environment.** In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). Bioremediation of contaminated soils. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.1-13.

CIANNELLA, Roberta Carvalho et al. **Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado por diesel B5,** 2010.

DECESARO, A. **Bioestimulação de solo contaminado por compostos oleosos com biomassamicrobiana inativa.** 2013. 60 f. TCC (Graduação em Curso de Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013. Disponível em: <<http://usuarios.upf.br/~engeamb/TCCs/2013-1/Andressa%20Decesaro.pdf>>

DIAS, F. G. **Utilização de consórcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo.** 2007. 106 f. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.

E. B. LUCHESE, L. O. B. FAVERO, E. LENZI. **Fundamentos da Química do Solo**, 2.ed., Freitas Bastos, Rio de Janeiro, 2002.

EBRAHIMI, N., MOAYED, M.H., DAVOODI, A. “**Critical pitting temperature dependence of 2205 duplex stainless steel on dichromate ion concentration in chloride médium**”, Corrosion Science. v.53 pp.1278-1287, 2011.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**, 3. ed., Brasília, 2017.

FINOTTI, A. R.; CAICEDO, N. O. L. **Contaminações subterrâneas com combustíveis derivados de petróleo: toxicidade e legislação brasileira**. Revista Brasileira de Recursos Hídricos, v. 6, n. 2, p. 29-46, abr./jun., 2001.

FRAUCHES-SANTOS, C., ALBUQUERQUE, M. A.; OLIVEIRA, M. C. C.; ECHEVARRIA, A. **A corrosão e os agentes corrosivos**. Revista Virtual Química, v.6, n.2, p.293- 309, 2014.

GALLEGO, J. L. R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. **Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation**. Biodegradation, v.12, p.325-335, 2001.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. **Biorremediação. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano 8, n. 34, p. 36-43, jan./jun., 2005.

GENTIL, V. **Corrosão**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2022. 392p.

GOLDIN, A. **Reassessing the use of loss-on-ignition for estimating organic matter content in noncalcareous soils**. Commun. Soil Sci. Plant Anal, 1987.

GOUVEIA, J. L N.; NARDOCCI, A. C. **Acidentes em postos e sistemas retalhistas de combustíveis: subsídios para a vigilância em saúde ambiental**. Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 12, n. 3, p. 317-324, jul./set., 2007.

GUO, L.Q., LIN, M.C., QIAO, L.J., et al., “**Duplex stainless steel passive film electrical properties studied by in situ current sensing atomic force microscopy**”, Corrosion Science. v.78, pp.55-62, 2014.

HAIDER, K. **Microbe-soil-organic contaminant interactions**. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). Bioremediation of contaminated soils. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.33-51.

JACCQUES; R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. **Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 4, p.1192-1201, jul./ago., 2007.

JANSSENS, I. A.; KOWALSKI, A. S.; CEULEMANS, R. **Forest floor CO₂ fluxes estimated by eddy covariance and chamberbased model.** *Agricultural and Forest Meteorology*, v.106, p. 61-69, 2001.

KARAVALAKIS, G.; STOURNAS, S.; KARONIS, D. **Evolution of the oxidation stability of diesel/biodiesel blends.** *Fuel*, v. 89, p. 2483-2489, 2010.

LAURO, M. J. **Desenvolvimento de métodos para determinação de número de cetano e aditivo para número de cetano por espectroscopia no infravermelho próximo e infravermelho médio.** 2006. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas, SP, 2006; 57 f.

LIMA, C. A. **Quantificação do decréscimo do risco associado à biorremediação de um solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo.** 106f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de processos químicos e bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

LOUREIRO. **Estudo da Corrosão de Dutos Enterrados em Solos Contaminados por Substâncias Químicas.** Dissertação para obtenção do grau de Mestre, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

LOUREIRO, A.; BRASIL, S; YOKOYAMA, L. **Estudo da corrosividade de solo contaminado por substâncias químicas através de ensaios de perda de massa e índice de Steinrath.** *Corrosão e Protecção de Materiais*, Lisboa-Portugal, v.26, n.4, p.113-121, 2007.

MARCHAL, R.; PENET, S.; SOLANO-SERENA, F.; VANDECASTEELE, J.P. **Gasoline and diesel oil biodegradation.** *Oil & Gas Science Technology*, v. 58, n. 4, p. 441-448, 2003. <https://doi.org/10.2516/ogst:2003027>

MARIANO, A.P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel.** Dissertação de doutorado - Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – SP, 2006.

MARIANO, A.P.; KATAOKA, A.P.A.G.; ANGELIS, D.F. & BONOTTO, D.M. **Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station.** Brazilian Journal of Microbiology, 2007.

MARIANO, A.P.; BONOTTO, D.M.; ANGELIS, D.F. de; PIRÔLLO, M.P.S.; CONTIERO, J. **Biodegradability of commercial and weathered diesel oils.** Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 133-142, 2008.

MONTAGNOLLI, R.N.; BIDOIA, E.D. **Petroleum derivatives biodegradation: environmental impact and bioremediation strategies.** Amazon, 2012.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006, 729 p.

MUTECA, F. L. L.; **Biorremediação de solo contaminado com óleo cru proveniente de Angola.** Dissertação (Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://tpqb.eq.ufrj.br/download/biorremediacao-de-solo-contaminado-com-oleo-cru.pdf>>.

NASCIMENTO, A.M., IERARDI, M.C.F., KINA, A.Y., et al., “**Pitting corrosion resistance of cast duplex stainless steels in 3.5%NaCl solution**”, Materials Characterizations, v.9, pp.1736-1740, 2008.

PACWA-PLÓCINICZAK, M.; PLAZA, G.Z.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. **Monitoring the changes in a bacterial community in petroleum-polluted soil bioaugmented with hydrocarbon-degrading strains.** Applied Soil Ecology, v. 105, p. 76-85, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.005>

PEIXOTO, C.; COSTA, Y.; ARAUJO, A.; FERNANDES, V. **Caracterização físico-química de óleo diesel rodoviário e marítimo por técnicas convencionais e destilação simulada por cromatografia gasosa.** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Instituto de Química, Laboratório de Combustíveis e Lubrificantes, 2015.

PUTZKE, J. e PUTZKE, M. T L. **Os Reinos dos Fungos.** Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 214 p. v.2, 2002.

RODRIGUES, E.M.; KALKS, K.H.M.; FERNANDES, P.L.; TÓTOLA, M.R. **Bioremediation strategies of hydrocarbons and microbial diversity in the Trindade Island shoreline - Brazil**. *Marine Pollution Bulletin*, v. 101, n. 2, p. 517-525, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.10.063>

RUDD, L. E.; PERRY, J. J.; HOUK, U. S.; WILLIAMS, R. W.; CLAXTON, L. D. **Changes in mutagenicity during crude oil degradation by fungi**. *Biodegradation*, v.7, p.335-343, 1996.

SANTOS, P. V. **Impactos ambientais causados pela perfuração em busca do petróleo**. *Caderno de Graduação-Ciências Exatas e Tecnológicas-UNIT*, v. 1, n. 1, p. 153-163, 2012. Disponível em: <<https://periodicos.set.edu.br/index.php/cadernoexatas/article/view/297>>

SECKLER, S. F. F. **Manual de procedimentos e técnicas laboratoriais voltado para análises de águas e esgotos sanitário e industrial**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, p. 81, 2004.

SILVA, E. M.; LIMA, J. E. F. W.; AZEVEDO, J. A.; RODRIGUES, L. N. **Valores de tensão na determinação da curva de retenção de água de solos do Cerrado**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, p. 323-330, 2006.

SILVA, M.; ESPOSITO, E. **O papel dos fungos na recuperação ambiental**. In: Espósito, E.; Azevedo, J.L. (orgs). *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, 2004.

SILVA, J. M; BRASIL, S. L. **Critério de avaliação da corrosividade de solos baseado na sobretensão de hidrogênio**. *Corrosão e Proteção de Materiais, Lisboa-Portugal*, v.29, n.1, p. 19-25, 2010.

SILVA, M. V. F.; PEREIRA, M. C.; CODARO, E. N.; ACCIARI, H. A. **Corrosão do aço-carbono: uma abordagem do cotidiano no ensino de química**. *Química Nova*, v.38, n.2, p. 293-296, 2015.

SOARES, K. O. **Estudo das especificações dos derivados do petróleo – gasolina e diesel – histórico e perspectivas**. 2002. Dissertação de Mestrado, Universidade Salvador. Salvador, BA, 2002, 100 f.

SOUZA, T. B. **Revisão da equação de cálculo de índice de cetano para as características do diesel comercializado no Paraná.** 2008. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia – PIPE, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008; 142 f.

THOMAS, J. E. (Org.) **Fundamentos de engenharia de petróleo.** Rio de Janeiro: Interciência, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 12 Porto Alegre: Artmed, 2017.

TREVISAN, R.; MATTOS, M. L. T.; HERTER, F. G. **Atividade microbiana em argissolo vermelho-amarelo distrófico típico coberto com aveia preta (*Avena sp.*) no outono, em um pomar de pessegueiro.** Revista Científica Rural, v.7, p.83-89. 2002.

VIDELA, H.A. **Biocorrosão, biofouling e biodeterioração de materiais,** 1a ed. São Paulo: Ed. Edgard Blucher Ltda, 2003.

YAKUBU, M.B. **Biological approach to oil spills remediation in the soil.** African Journal of Biotechnology, 2007.

**APÊNDICE A – RESULTADOS DA ANÁLISE DO SOLO CONTROLE DO
EXPERIMENTO ANTERIOR**

Tabela A.1- Resultados da análise da biodegradação do CO₂ do solo controle pelo respirômetro de barth

Tempo	CO₂ (µmol)	CO₂ (mol)
1	163,1780167	1,118934971
2	178,3584467	1,223029349
3	311,5934133	2,136640549
4	64,52843333	0,442480686
5	164,9885267	1,131349897
6	36,39589333	0,24957184
7	56,77573667	0,389319337
8	149,8080967	1,02725552
9	153,1505767	1,050175383
10	109,2805267	0,749352183
11	97,02476667	0,665312686
12	140,3377367	0,962315909
13	201,9879233	1,385060046
14	196,0457367	1,344313623
15	153,6612333	1,053677029
16	102,64199	0,703830789
17	205,2375567	1,407343246
18	60,58245	0,415422514
19	255,14264	1,749549531
20	80,12667333	0,549440046
21	135,50971	0,92920944
22	8,959703333	0,061437966
23	73,70072	0,505376366
24	92,05747	0,631251223
25	193,89073	1,329536434
26	173,36426	1,188783497
27	116,3564067	0,797872503
28	133,8580033	0,917883451
29	105,9111567	0,726247931
30	107,90736	0,739936183
31	191,91406	1,315982126
32	160,8373167	1,102884457
33	70,4742983	0,483252331
34	198,5257067	1,361319131
35	156,23405	1,0713192

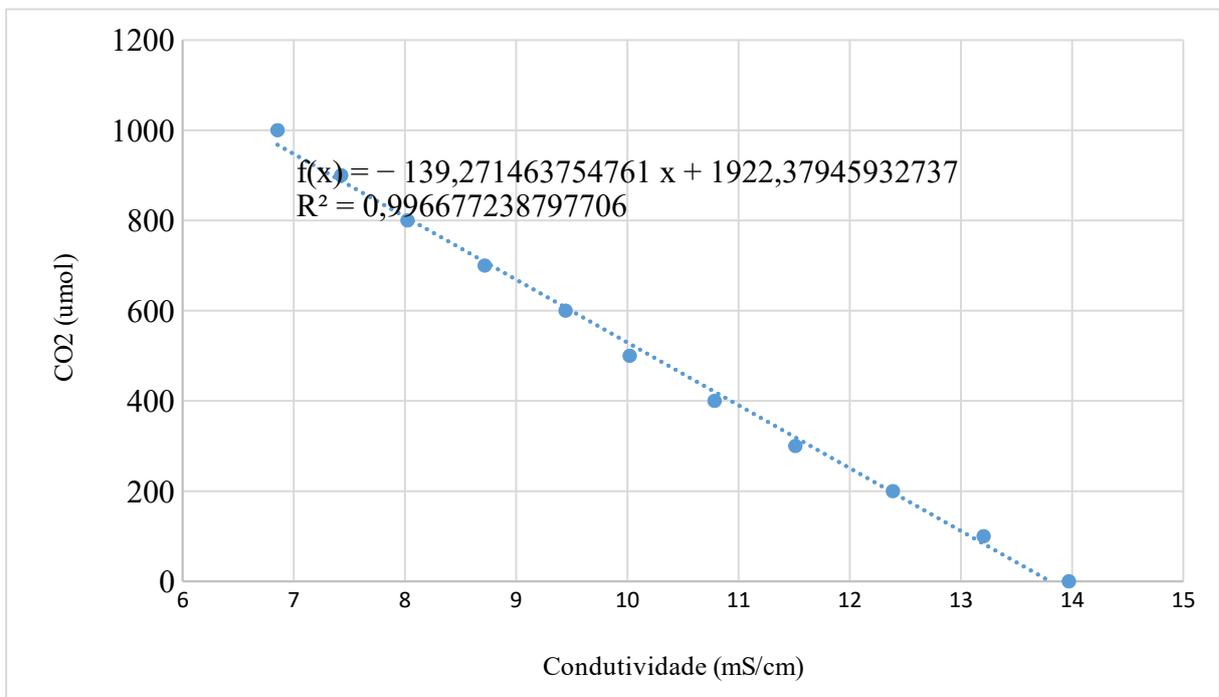
Fonte: Autora (2023).

Tabela A 2 - Taxa de corrosão

Perda de massa (mg)	Tempo (dias)	Tempo (horas)	Taxa de corrosão (mmpy)	Taxa de corrosão (mmpy)	Taxa corrosão média (mmpy)
10,42		168	8,93E-02	0,089281	
15,29	7	168	1,21E-01	0,121156	0,114880
15,93		168	1,34E-01	0,134202	
22,17		336	9,24E-02	0,092435	
23,84	14	336	9,51E-02	0,095123	0,090790
22,92		336	8,48E-02	0,084811	
34,72		672	7,17E-02	0,071671	
52,82	28	672	1,07E-01	0,107297	0,090758
46,13		672	9,33E-02	0,093304	
69,39		1008	9,39E-02	0,093894	
69,35	42	1008	9,30E-02	0,093022	0,091994
62		1008	8,91E-02	0,089065	
82,49		1344	9,67E-02	0,096697	
71,83	56	1344	7,43E-02	0,074324	0,090400
110,43		1344	1,00E-01	0,100179	

Fonte: Autora (2023).

Figura A.3 – Curva de calibração



Fonte: Autora (2023).