



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA MECÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

LARISSA OLIVEIRA DA SILVA

**BIORREMEDIAÇÃO EM SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL S10 E
AVALIAÇÃO DA CORROSIVIDADE DO SOLO POR MEIO DAS TAXAS DE
CORROSÃO DO AÇO-CARBONO A36**

Recife
2023

LARISSA OLIVEIRA DA SILVA

**BIORREMEDIAÇÃO EM SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL S10 E
AVALIAÇÃO DA CORROSIVIDADE DO SOLO POR MEIO DAS TAXAS DE
CORROSÃO DO AÇO-CARBONO A36**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Engenharia de materiais e fabricação.

Orientador: Prof. Dr. Severino Leopoldino Urtiga Filho.

Coorientadora: Profa. Dra. Sara Horácio de Oliveira Maciel

Recife

2023

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4/1502

S586b

Silva, Larissa Oliveira da.

Biorremediação em solo contaminado com óleo diesel S10 e avaliação da corrosividade do solo por meio das taxas de corrosão do aço-carbono A36. / Larissa Oliveira da Silva. – 2023.

145 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Severino Leopoldino Urtiga Filho.

Coorientadora: Profa. Dra. Sara Horácio de Oliveira Maciel.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica. Recife, 2023.

Inclui referências e apêndices.

1. Engenharia mecânica. 2. Biorremediação. 3. Solo. 4. Corrosão. 5. Diesel. 6. Xantana. I. Urtiga Filho, Severino Leopoldino (orientador). II. Maciel, Sara Horácio de Oliveira (coorientadora). III. Título.

621 CDD (22. ed.)

UFPE
BCTG/2023-233

LARISSA OLIVEIRA DA SILVA

**BIORREMEDIAÇÃO EM SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL S10 E
AVALIAÇÃO DA CORROSIVIDADE DO SOLO POR MEIO DAS TAXAS DE
CORROSÃO DO AÇO-CARBONO A36**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Engenharia Mecânica. Área de concentração: Engenharia de materiais e fabricação.

Aprovada em: 18/08/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Severino Leopoldino Urtiga Filho (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Sara Horácio de Oliveira Maciel (Coorientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Dayanne Diniz de Souza (Examinadora Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Pedro Ferreira de Souza Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à toda a minha família, à minha avó Dona Terezinha e ao meu avô Lino (*in memoriam*), que me ensinaram coisas que jamais aprenderia em qualquer livro que eu pudesse ler. Dedico ao meu amor, Caio Hespanhol, meu esposo e parceiro de vida, que me incentiva todos os dias a lutar pelos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela capacidade de realizar tarefas que nem imaginava ser capaz de fazer.

Sou grata a toda minha família que tem me apoiado em toda minha trajetória acadêmica. Sou infinitamente grata ao apoio do meu amor Caio, obrigada por todos os dias me dizer que eu sou capaz de realizar todos os meus sonhos e por lutar junto comigo por eles. Agradeço por todo o apoio dos meus amigos.

Agradeço a todos do laboratório Compolab-LBC que me receberam de braços abertos, com apoio acadêmico e pessoal. Agradeço ao grupo que sempre esteve disposto a ajudar, gratidão a Magda, Ivanilda, Edkarlla, Jedaías, e em especial, à Maria Isabel, Rafael e Walter, obrigada por todos os momentos de conversas e café. Guardarei carinhosamente em meu coração os momentos maravilhosos que passei morando em Recife.

Meus sinceros agradecimentos aos meus orientadores Dr. Severino Urtiga e Dra. Sara Horácio, por todo suporte e apoio na realização deste trabalho. Um forte agradecimento à Sara que me acolheu de uma forma carinhosa, pela qual já agradei muitas vezes a Deus.

Agradeço a todos os amigos que fiz na pós, em especial Mônica e Vagner (*in memoriam*). Um agradecimento especial aos professores e aos secretários da pós, Jorge e Luana, sempre dispostos a ajudar.

Agradeço a todos que me auxiliaram na execução dos experimentos, aos alunos de iniciação/TCC: Camila, Emilly, José Cláudio, João, Danilo, Karine e Paulo. Sem vocês, não teria conseguido preparar todos os meios de cultura e nem realizar tantos ensaios. Sou grata pela execução impecável das imagens de MEV feitas pela técnica Janaína, e pelo auxílio do técnico Rubens na usinagem dos cupons.

Estendo meus agradecimentos às instalações laboratoriais que viabilizaram a execução deste trabalho, notadamente o Compolab-LBC, o I-LITPEG e o INTM. Além disso, expresso minha gratidão ao suporte financeiro fornecido pela CAPES.

RESUMO

A contaminação do solo com petróleo e seus derivados gera problemas ambientais e sociais. O óleo diesel, presente no armazenamento, transporte e combustão, contém compostos como benzeno, tolueno e xileno, que afetam a fauna, a flora e a saúde humana. É necessário mitigar as consequências negativas às propriedades físicas, fisiológicas e bioquímicas do solo, bem como o impacto desta contaminação sobre a água. A biorremediação utiliza a atividade microbiana presente em um determinado sistema contaminado para diminuir ou conter esta contaminação. Para elevar a eficiência no processo de degradação do contaminante, são necessários alguns ajustes de parâmetros do meio, tais como: ajuste de pH, balanceamento de nutrientes, oxigenação, controle de temperatura e adição de água. O biopolímero goma xantana apresenta boas propriedades dispersantes, o que pode melhorar a biodisponibilidade do contaminante, além da possibilidade de ser outra fonte de carbono para os microrganismos presentes no solo. As intempéries às quais os materiais enterrados no solo são expostos desencadeiam os processos convencionais de corrosão e biocorrosão. Este projeto objetiva investigar a bioestimulação dos microrganismos contidos no solo, através da correção dos solos com nutrientes e/ou xantana, na biodegradação do óleo diesel S10. As metodologias utilizadas neste trabalho foram: quantificações microbiológicas no solo; avaliação da biodegradação do óleo diesel contaminado artificialmente em solo arenoso advindo do Porto de Suape-PE, por meio dos respirômetros de Bartha, e análises de teores de óleos e graxas em biorreatores; avaliação das taxas de corrosão do aço carbono ASTM A36. Os resultados obtidos na biodegradação utilizando o bioestímulo nutricional alcançaram uma eficiência de biodegradação de 34,35% em relação ao ensaio de respirometria e redução de 38,97% no teor de óleos e graxas no microcosmo utilizado, em 84 dias de experimento. O bioestímulo nutricional com adição da goma xantana, obteve eficiência de biodegradação de 34,78% no ensaio de respirometria e 34,88% na redução do teor de óleo e graxas no microcosmo utilizado, em 84 dias de experimento. No entanto, a biorremediação bem-sucedida teve uma influência negativa na corrosão do metal estudado, observando-se taxas de corrosão dos aços, classificadas em alta e severa nos biorreatores que apresentaram uma maior eficiência de biodegradação.

Palavras-chave: biorremediação; solo; corrosão; diesel; xantana.

ABSTRACT

The contamination of soil with petroleum and its derivatives generates environmental and social problems. Diesel oil, present in storage, transportation, and combustion, contains compounds, such as benzene, toluene, and xylene, which affect fauna, flora, and human health. It is necessary to mitigate the negative consequences on the physical, physiological, and biochemical properties of the soil, as well as the impact of this contamination on water. Bioremediation utilizes the microbial activity present in a contaminated system to decrease or contain this contamination. To enhance the efficiency of the contaminant degradation process, adjustments to medium parameters are necessary, such as pH adjustment, nutrient balancing, oxygenation, temperature control, and water addition. The biopolymer xanthan gum exhibits good dispersing properties, which can increase the bioavailability of the contaminant, in addition to potentially serving as another carbon source for the microorganisms present in the soil. The environmental conditions to which materials buried in the soil are exposed trigger conventional corrosion and biocorrosion processes. This project aims to investigate the bio-stimulation of microorganisms present in the soil through soil amendment with nutrients and/or xanthan gum in the biodegradation of ultra low sulfur diesel oil, 10 ppm sulfur. The methodologies used in this study include soil microbiological quantifications, evaluation of biodegradation in sandy soil (from Porto de Suape-PE) artificially contaminated with diesel fuel, using Bartha respirometers, and analyses of oils and greases in bioreactors. The corrosion rates of ASTM A36 carbon steel were also evaluated. The results obtained in biodegradation using nutritional bio-stimulation achieved a biodegradation efficiency of 34.35% compared to the respirometry assay, with a 38.97% reduction in oil and grease content in the experimental microcosm over 84 days of the experiment. Nutritional bio-stimulation with the addition of xanthan gum yielded a biodegradation efficiency of 34.78% in the respirometry assay and a 34.88% reduction in oil and grease content in the microcosm used over 84 days of the experiment. However, successful bioremediation had a negative impact on the corrosion of the studied metal, with corrosion rates classified as high and severe in the bioreactors that exhibited higher biodegradation efficiency.

Keywords: bioremediation; soil; corrosion; diesel; xanthan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema da via metabólica Alk em <i>Pseudomonas putina</i>	45
Figura 2 -	Respirômetro de Bartha. A: Rolha de borracha; B: Compartimento para filtro de ascarita; C: Válvula; D: Rolha de borracha; E: Frasco de Erlenmeyer (250 mL); F: Amostra de solo; G: Tampa da cânula; H: Cânula (\varnothing entre 1 mm e 2mm), com canhão Luer; I- Braço lateral ($\varnothing \sim 40$ mm; H ~ 100 mm); J: Solução de KOH	48
Figura 3 -	Estrutura molecular goma xantana.....	54
Figura 4 -	Distribuição do contaminante no solo.....	61
Figura 5 -	Esquema de célula eletroquímica formada entre solo e tubulação.....	67
Figura 6 -	Fluxograma experimental.....	76
Figura 7 -	Foto do local de coleta via satélite.....	77
Figura 8 -	Profundidade de amostragem do solo.....	78
Figura 9 -	Amostra de solo disposta em bancada.....	79
Figura 10 -	Capacidade de retenção de água no solo.....	81
Figura 11 -	Teste de estabilidade (a): Solo puro; (b): Solo, umidade em 10% e 0,25% GX; (c): Solo e 0,25% GX; (d): Solo e 0,5% GX; (e) Solo, umidade em 10% e 0,5% GX; (f): Solo, umidade 10%, 0,25% GX e 5% óleo diesel e (g): Solo, umidade em 10%, 0,50% GX e 5% óleo diesel	82
Figura 12 -	Tubos de ensaio inoculados para BHA após viragem.....	84
Figura 13 -	Tubos de ensaio inoculados para BHA após viragem.....	85
Figura 14 -	Unidades formadoras de colônias das bactérias hidrocarbonoclásticas	86
Figura 15 -	Microcosmo controle (a) <i>Bct</i> ; (b) <i>BDi</i> ; (c) <i>BNu</i> e (d) <i>BNu + Xa</i>	88
Figura 16 -	Microcosmos cobertos com plástico.....	89
Figura 17 -	Cupons de aço carbono ASTM A36.....	90
Figura 18 -	Biorreator solo controle (a) <i>Bct</i> ; (b) <i>BDi</i> ; (c) <i>BNu</i> e (d) <i>BNu + XA</i>	91
Figura 19 -	Cupom desenterrado do (a) <i>Bct</i> ; (b) <i>BDi</i> ; (c) <i>BNu</i> e (d) <i>BNu + Xa</i>	92
Figura 20 -	Respirômetros dos (a) sistema branco; (b) controle; (c) diesel; (d) nutrientes e (e) xantana	95
Figura 21 -	Microestrutura do aço A36.....	103
Figura 22 -	Quantificação de bactérias heterotróficas aeróbias.....	105
Figura 23 -	Quantificação de bactérias heterotróficas anaeróbias.....	106
Figura 24 -	Quantificação de bactérias hidrocarbonoclásticas.....	108

Figura 25	Produção de <i>CO</i> ₂ ao longo dos 84 dias de incubação. B<i>Ct</i> : solo controle; B<i>Di</i> : solo contaminado com diesel; B<i>Nu</i> : solo contaminado com diesel, bioestimulado com nutrientes; B<i>NU</i> + <i>Xa</i> : solo contaminado com diesel, bioestimulado com nutrientes e goma xantana	110
Figura 26	Produção total de <i>CO</i> ₂ nos testes de respirometria ao final de 84 dias de incubação	113
Figura 27	Eficiência de biodegradação.....	115
Figura 28	Eficiência remoção óleos e graxas.....	118
Figura 29	Taxa de corrosão dos biorreatores B<i>Ct</i> , B<i>Di</i> , B<i>Nu</i> e B<i>NU</i> + <i>Xa</i>	120
Figura 30	Região de cupom com depósitos não uniformes de solo.....	122
Figura 31	Micrografia em MEV dos cupons dos sistemas: (a) B<i>Ct</i> , (b) B<i>Di</i> , no tempo de 56 dias	125
Figura 32	Micrografia em MEV dos cupons dos sistemas: (a) B<i>Nu</i> , (b) B<i>NU</i> + <i>Xa</i> , no tempo de 56 dias	126
Figura 33	Curva analítica de ensaio respirométrico.....	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variações teste de estabilidade do solo	82
Tabela 2 - Composição do meio Bushnell Haas Agar	85
Tabela 3 - Cargas de componentes adicionados aos microcosmos.....	88
Tabela 4 - Granulometria do solo.....	98
Tabela 5 - Parâmetros iniciais medidos no solo	99
Tabela 6 - Quantificação microbiológica inicial do solo.....	100
Tabela 7 - Caracterização físico-química do óleo diesel S10	101
Tabela 8 - pH dos sistemas estudados	103
Tabela 9 - Carbono orgânico total inicial dos biorreatores	114
Tabela 10 - Carbono orgânico acumulado no tempo de 84 dias de incubação	114
Tabela 11 - Valores de eficiência de biodegradação.....	115
Tabela 12 - Teor de óleo e graxas	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BTEX	Benzeno, tolueno, etil-benzeno e os xilenos
COP26	26ª Conferência do Clima das Nações Unidas
GLP	Gás liquefeito de petróleo
GX	Goma xantana
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HTP	Hidrocarbonetos totais de petróleo
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
NAPL	Non aqueous phase liquid
O&G	Óleos e graxas
UNEP	<i>United Nations Environment Programme</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo geral	17
1.1.2	Objetivos específicos	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	PETRÓLEO, SEUS DERIVADOS E A PROBLEMÁTICA AMBIENTAL	19
2.1.1	Problemas ambientais	21
2.2	BIORREMEDIAÇÃO.....	22
2.2.1	Atenuação natural	27
2.2.2	Bioestimulação	28
2.2.3	Bioaugmentação	31
2.2.4	Bioventilação	33
2.2.5	Fitorremediação	34
2.2.6	<i>Landfarming</i>	35
2.3	MICROORGANISMOS	36
2.3.1	Parâmetros que influenciam na biodegradação	39
2.3.2	Vias metabólicas de biodegradação	43
2.3.3	Biodegradação	47
2.4	FORMAÇÃO DE BIOFILME MICROBIANO	50
2.5	GOMA XANTANA	51
2.6	SOLO	56
2.6.1	Estruturas do solo	58
2.6.2	Características do solo	59
2.6.3	Distribuição do poluente no solo	61
2.7	CORROSÃO E BIOCORROSÃO	62
2.7.1	Aço ASTM A36	68
2.7.2	Corrosão microbiológica	69
2.7.3	Técnicas de avaliação da corrosão	72
3	MATERIAIS E MÉTODOS	75
3.1	AMOSTRAGEM DO SOLO	76
3.2	ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DO SOLO.....	79

3.2.1	Granulometria e caracterização do solo	79
3.2.2	Análise de pH do solo	80
3.2.3	Análise de umidade	80
3.2.4	Análise de capacidade de retenção de água no solo (CRE)	80
3.2.5	Análise preliminar de estabilidade do solo	81
3.2.6	Análise carbono orgânico total	83
3.2.7	Análise de nutrientes	83
3.2.8	Teor de óleos e graxas	83
3.2.9	Quantificação microbiológica	83
3.2	MICROCOSMOS	87
3.3	BIORREATORES PARA TAXA DE CORROSÃO	89
3.3.1	Microestrutura do aço A36	91
3.4	PERDA DE MASSA E TAXA DE CORROSÃO	92
3.5	ANÁLISE EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO	93
3.6	ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO COM RESPIRÔMETRO DE BARTHA	94
3.6.1	Quantificação do $CO_{2(g)}$	96
3.7	AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DOS MICROCOSMOS	97
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	98
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA INICIAL	98
4.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO DIESEL	101
4.3	ESCOLHA DO MELHOR AJUSTA UMIDADE EXPERIMENTAL	101
4.4	CARACTERIZAÇÃO DO AÇO A36	102
4.5	VARIAÇÃO DO pH MICROCOSMOS	103
4.6	QUANTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA	104
4.7	BIODEGRADAÇÃO RESPIROMÉTRICA	110
4.7.1	Eficiência de biodegradação	113
4.8	EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO ÓLEOS E GRAXAS	117
4.9	TAXA DE CORROSÃO	119
4.10	ANÁLISE MORFOLÓGICA CUPONS	124
5	CONCLUSÃO	127
	REFERÊNCIAS	129

APÊNDICE A – CÁLCULO PARA AJUSTE DE UMIDADE DO SOLO PARA 50% DA CRE	142
APÊNDICE B – AJUSTE DE UMIDADE	143
APÊNDICE C – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CONDUTIVIDADE ..	145

1 INTRODUÇÃO

A busca por combustíveis renováveis, que não afetem os ciclos biogeoquímicos tem sido cada vez mais incentivada, como na 26ª Conferência do Clima das Nações Unidas (COP26), em que mais de cem países concordaram em diminuir as emissões de gases de efeito estufa até 2030. Muitos países assinaram a declaração que previu encerrar a venda de carros com motores de combustão interna até 2035 nos principais mercados, e até 2040, encerrar em todo o mundo (QUIÑONES, 2021). Porém, de acordo com Unep (2021), os países planejam produzir, até 2030, mais do que o dobro de combustíveis fósseis do que seria a produção condizente com o Acordo de Paris, que previa limitar o aumento da temperatura global em 1,5 °C.

A utilização dos hidrocarbonetos e derivados do petróleo gera contaminação do ar, da água e do solo. A liberação de contaminantes ao meio ambiente afeta todo o equilíbrio existente nos ecossistemas, assim como pode gerar impactos negativos à saúde dos seres humanos, devido à característica carcinogênica e/ou mutagênica que vários derivados do petróleo possuem (FROEHNER *et al.*, 2008; KEBEDE *et al.*, 2021). A principal forma de contaminação é proveniente de atividades antropogênicas, devido ao aumento da industrialização, a necessidade de consumo de combustíveis, mineração, resíduos agrícolas, combustão incompleta de compostos orgânicos e emissão de gases veiculares. Com as atividades inerentes à industrialização da sociedade, os ambientes, de uma forma geral, são contaminados com moléculas de hidrocarbonetos, os derivados mais leves do petróleo (KEBEDE *et al.*, 2021).

A contaminação do solo ou água geralmente advém de vazamentos ocorridos por acidentes, como o vazamento que ocorreu na Refinaria de Abreu e Lima (Renest), uma das maiores do Nordeste. Em 2019, essa refinaria, situada no Complexo Portuário de Suape, município de Ipojuca (PE), apresentou um vazamento na estação de tratamento de despejos industriais, com cerca de 5 mil litros de resíduos oleosos. De acordo com a Petrobras, o óleo atingiu um córrego em área interna aos limites da refinaria. A Renest tem capacidade de processamento de 230 mil barris por minuto (bpm), sendo a produção focada em 70% para o óleo diesel S10, com produção de nafta, óleo combustível, coque e gás liquefeito de petróleo (GLP) (PETRO NOTÍCIAS, 2022).

De acordo com Exame (2019), o derramamento atingiu a área de mangue e mar às margens da refinaria. Para conter o vazamento e mitigação dos riscos socioambientais, sete barreiras de contenção do óleo foram instaladas no mangue, além do material contaminado ter sido recolhido pelos caminhões de sucção, para posterior tratamento (EXAME, 2022). A refinaria foi multada em R\$ 705 mil, e apesar do resíduo não ter chegado ao mar, atingiu cerca de 4,5 hectares, causando a morte de animais e agredindo a vegetação de mangue, restinga e o solo da região (CBN RECIFE, 2019).

Com esses e outros casos de contaminação dos ecossistemas por poluentes derivados do petróleo, há uma crescente demanda de se validar novas tecnologias capazes de promover a degradação eficiente e sustentável de poluentes. Por se tratar de uma estratégia economicamente viável e relativamente fácil, a biorremediação se mostra promissora no gerenciamento da descontaminação dos ambientes aquáticos e terrestres (CURIEL-ALEGRE *et al.*, 2022). A gestão da contaminação originada por vazamentos provenientes de reservatórios subterrâneos de postos de abastecimento de combustíveis, bem como de refinarias que, ao longo dos anos de operação, culminam em uma contaminação do solo e eventual encerramento, como exemplificado por algumas refinarias de menor rentabilidade que encerraram suas atividades durante a pandemia de Covid-19, traz à tona a problemática de como abordar a poluição residual dos ambientes (LIMA *et al.*, 2017; SEPARO, 2021).

Com a finalidade de se obter taxas otimizadas na biorremediação de poluentes, o bioestímulo promovido com o suplemento de nutrientes, oxigenação e o controle de parâmetros como umidade e pH, se mostra uma estratégia promissora na biorremediação. Eficiência que também pode ser encontrada com o bioaumento de microrganismos degradantes exógenos, que possuem vias metabólicas necessárias para a degradação (CURIEL-ALEGRE *et al.*, 2022).

A eficiência da biorremediação é interligada com a biodisponibilidade do poluente. Uma das maneiras de se aumentar a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos, é a utilização de surfactantes e/ou dispersantes. As moléculas de surfactantes aumentam a transferência de massa dos poluentes para a fase aquosa, fase a qual os microrganismos aptos, conseguem metabolizá-los (GONZÁLEZ *et al.*, 2010). Os surfactantes e dispersantes podem ser sintéticos ou naturais, e a goma xantana, que é um biopolímero, produzido pelas *Xanthomonas campestris*, é

utilizada como dispersante, estabilizante e emulsificante, formadora de filmes e outros. Empregada como emulsificante de óleos, é promissora na biorremediação de solventes clorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em água subterrânea (BORGES *et al.*, 2008; ZHONG *et al.*, 2015). Além disso, uma segunda fonte de carbono que não seja proveniente dos poluentes pode estimular as atividades metabólicas responsáveis pela degradação do contaminante (CURIEL-ALEGRE *et al.*, 2022).

Diante da extensão de tubulações enterradas, como oleodutos, gasodutos, adutoras e mineradores, e a grande quantidade de tanques de armazenamento de combustível, o comportamento corrosivo do solo é alvo de muitas pesquisas. A indústria do petróleo é muito afetada e os custos com reparos inerentes à corrosão são da ordem bilhões de dólares (USD). A utilização de ligas metálicas ao longo da cadeia do petróleo, desde a extração, transporte e até o armazenamento faz com que o setor tenha sérios problemas com os processos corrosivos (PROCÓPIO, 2021). A corrosão de tubulações e tanques causa perda de material, com possibilidade de ruptura dessas estruturas, com conseqüente contaminação do solo, e possibilidade de contaminação de lençóis freáticos (GENTIL; CARVALHO, 2022). Há uma grande preocupação com a corrosão das estruturas enterradas no solo ou em contato com ele, devido a um aumento das leis ambientais que tem se tornando cada mais rigorosas, com o intuito de preservar os ecossistemas (ROBERGE, 2019).

1.1 OBJETIVOS

A presente seção define o escopo desta dissertação. Para melhor clareza e compreensão das metas atingidas, a exposição foi subdividida em objetivo geral e objetivos específicos.

1.1.1 Objetivo geral

Com o viés de propor estratégias otimizadas no processo de biorremediação em solos contaminados com derivados do petróleo e estudar a influência que os parâmetros da biorremediação possuem sobre o processo de corrosão de corpos enterrados nestes solo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a bioestimulação com

aporte de umidade, nutrientes, goma xantana e oxigenação, no processo de biorremediação em solo artificialmente contaminado com óleo diesel S10, com o estudo paralelo da corrosividade causada aos corpos de prova de aço-carbono ASTM A36 enterrados aos sistemas estudados.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o bioestímulo com suplementação de nutrientes e aporte de umidade;
- Avaliar o efeito da goma xantana na biorremediação do solo contaminado com óleo diesel S10 e seu efeito sobre a corrosão dos aços;
- Avaliar a biodegradação por ensaio de respirometria, ao longo de 84 dias e teor de óleos e graxas nos tempos inicial e final de 84 dias;
- Avaliar o efeito corrosivo dos tratamentos sobre os cupons de aço-carbono A36 enterrados nos sistemas estudados, com avaliação de perda de massa e taxa de corrosão dos aços, nos tempos experimentais de 7, 14, 28, 42 e 56 dias;
- Avaliação da viabilidade de biorremediação e corrosividade do solo, utilizando os seguintes arranjos experimentais: sistema controle, sistema diesel, sistema diesel submetido à suplementação de nutrientes, e sistema diesel exposto à combinação de suplementação de nutrientes e goma xantana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente seção apresenta o embasamento teórico utilizado para a construção desta dissertação, bem como a interpretação científica dos resultados obtidos. As subsequentes segmentações compreendem uma revisão bibliográfica concisa e aplicada, com o proposto de promover a discussão e entendimento dos elementos abordados.

2.1 PETRÓLEO, SEUS DERIVADOS E A PROBLEMÁTICA AMBIENTAL

A história do petróleo foi iniciada há muitos anos, e permeia todo o desenvolvimento humano. Ao longo da história terrestre de 4,5 bilhões de anos, matérias orgânicas têm se acumulado no interior da terra. O carbono, elemento fundamental da vida, o qual as plantas transformam em alimento e que os humanos expelem, quando combinado com outros elementos, se transforma em produtos, como o diamante, o carvão e o petróleo. As camadas orgânicas em regiões bem profundas da Terra se transformam em uma argila xistosa impregnada de hidrocarbonetos, que quando submetida a altas pressões e “cozinhas” por milhares de anos, transformam-se em petróleo (SHAH, 2007).

Os produtos derivados do petróleo, obtidos com o seu refino dividem-se em três categorias: i) combustíveis (gasolina, óleo diesel, óleo combustível, gás liquefeito de petróleo (GLP), querosene, etc); ii) produtos não combustíveis (solventes, parafinas, lubrificantes básicos, graxas, asfalto e coque); iii) derivados não energéticos (nafta, gasóleos petroquímicos e outras matérias-primas para diferentes tipos de indústria) (KEBEDE *et al.*, 2021). A partir de 1974, com a crise mundial, houve aumento do valor do petróleo, desencadeando um incentivo ao consumo de óleo diesel, um derivado mais barato do que a gasolina. Com esse incentivo ao uso do óleo diesel, as indústrias automobilísticas diminuíram a produção de caminhões e caminhonetes que utilizavam a gasolina como combustível, havendo uma crescente na produção de óleo diesel (MORAIS, 2013).

O petróleo e seus derivados possuem papel crucial no abastecimento de combustível mundial. Com a pandemia do Covid-19, devido ao *lockdown* implementado na maioria dos países, a demanda mundial de petróleo foi atingida, havendo uma diminuição em seu consumo. Segundo a ANP (2020) (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis), o Brasil diminuiu em 6% o

consumo de combustíveis em 2020, chegando ao menor patamar anual desde 2012. Apesar da diminuição da demanda, as refinarias brasileiras produziram 42 milhões m³ de diesel em 2020, 2 milhões de m³ a mais do que no ano de 2019 (EPBR, 2021).

Segundo a revista *The Economics Times*, a OPEP (Organização dos Países Exportadores de Petróleo) prevê crescimento da demanda mundial em 2,7 milhões de barris por dia (bpd) no ano de 2023 (THE ECONOMIC TIMES, 2022). De acordo com a ANP, a produção média do ano de 2022 no Brasil foi de 3,021 milhões de barris/dia, valor 2,47% acima do recorde alcançado em 2020. Segundo Larco Petróleo (2021), cerca de 40% de um barril de petróleo vira óleo diesel, o qual é o principal combustível comercializável no mercado, e é utilizado para o transporte de cargas e de pessoas, em navios, em indústrias, na geração de energia, em máquinas da construção civil, em máquinas agrícolas, entre outros (MORAIS, 2013).

Os derivados do petróleo possuem predominantemente hidrocarbonetos com cadeias de 8 a 16 carbonos, com traços de nitrogênio, enxofre e oxigênio. O óleo diesel é formulado por meio da mistura de alguns derivados do processamento do petróleo, como gasóleos, nafta pesada, diesel leve e diesel pesado (PETROBRAS, 2021). O óleo diesel é constituído por uma mistura de alcanos cíclicos, normais e ramificados, e compostos aromáticos, sendo 30% parafinas (n-alcanos e isoprenóides), 45% de cicloalcanos e 25% de aromáticos. Os compostos aromáticos incluem alquibenzenos, como o naftaleno e seus derivados alquilados, com pequenas frações de fenantreno, fluoreno e derivados metilados. (ORTEGA *et al.*, 2019). De acordo com a utilização, são especificados os tipos de óleo diesel básico: i) uso rodoviário – produto com máximo de 10 mg/kg de enxofre total. diesel S10; ii) óleo diesel TFM (uso não-rodoviário), utilizado para a geração de energia, com teor máximo de 1800 mg/kg de enxofre, utilizados em motores diesel da nova geração, com teor máximo de 10 mg/kg de enxofre. Este tipo de óleo diesel contém 10% de biodiesel, denominado óleo diesel B, o qual é obtido por meio da adição de biodiesel ao óleo diesel A. O óleo diesel A, por sua vez, é obtido através do processo de refino do petróleo (PETROBRAS, 2021). O Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), aprovou a mistura obrigatório de 12% de biodiesel ao óleo diesel A para o ano de 2023, com aumento progressivo para 15% até 2026.

A adição do biodiesel é realizada nas instalações da distribuidora com o objetivo de controlar a lubrificidade dos óleos diesel com baixo teor de enxofre. A

principal desvantagem associada ao teor de biodiesel no combustível está relacionada à sua elevada higroscopicidade, resultando em uma maior absorção de umidade e contribuindo para a perda da estabilidade do combustível no campo. Essa condição é principalmente propícia ao crescimento de microrganismos nos tanques de armazenamento do óleo diesel S10 (PETROBRAS, 2021).

2.1.1 Problemas ambientais

A problemática ambiental de exploração do petróleo e seus derivados é fortalecida devido a diversos acidentes já ocorridos durante a extração, refino, armazenamento, transporte e combustão, os quais impactam direta ou indiretamente o meio ambiente e a saúde humana. As consequências ambientais dos derramamentos do petróleo e seus derivados geram problemas globais como efeito estufa, dano à camada de ozônio, além de agredir o meio ambiente, gerando consequências negativas aos ecossistemas e suas populações (RAMIREZ *et. al.*, 2017).

A discussão dos ambientalistas e órgãos regulamentadores sobre a exploração do petróleo e seus derivados vem se fortalecendo devido à grande ênfase em tratados e convenções internacionais, além da legislação de diversos países, como no Brasil, onde o equilíbrio do meio ambiente é reconhecido como um direito na Constituição da República (DE SOUZA, 2018).

A exposição a compostos como benzeno, tolueno, xileno e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), como no caso do óleo diesel, que contêm benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), componentes considerados prejudiciais a diversos ambientes tendem a se bioacumular em cadeias alimentares, onde provocam desequilíbrio bioquímico e fisiológico dos organismos expostos a esses componentes, afetando a fauna e a flora. À saúde humana, o petróleo e seus derivados podem gerar anormalidades hematopoiéticas, hepáticas, renais e pulmonares, mudanças de humor e até danos à saúde reprodutiva. Além disso, acidentes com derivados do petróleo podem impactar a economia de locais que tiram dos rios e mares o sustento de muitas famílias, que usam a água como fonte de alimento, por exemplo, para a pesca (RAMIREZ *et. al.*, 2017; KEBEDE *et al*, 2021).

Acidentes com o petróleo e seus derivados, como o óleo diesel, podem ocorrer por meio de incidentes durante o percurso de transporte, como o caso do trem no município de Itaboraí/RJ em 2005, que segundo a Agência Brasil (2005), descarrilhou e despejou 60 mil litros de óleo diesel em área habitável, gerando impacto ambiental e humano. Vazamentos também podem ocorrer, como no Porto de Santa Catarina, onde, segundo o Diário Catarinense (2011), 200 litros de óleo diesel vazaram, se dispersando por uma área de dez mil metros quadrados. Outro caso de vazamento de óleo diesel ocorreu durante o bombeamento do óleo no Terminal de Betim, o que, segundo a Sindipetro SJC (2020), desencadeou o derramamento de 100 mil litros de óleo diesel, contaminando o rio e a lagoa do município de Betim. Além desses acidentes mencionados, há vazamentos provenientes de tubulações e tanques subterrâneos em postos de combustíveis. De acordo com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), cerca de 63% das áreas contaminadas no estado de São Paulo são provenientes de postos de combustíveis, que por falta de manutenção ou intempéries, acabam se deteriorando, e deixando vazar combustíveis para o solo.

2.2 BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação tem sido empregada em ambientes que passaram por algum tipo de contaminação. Segundo o *webjornal* Manila Times (2023), o governo das Filipinas adotou técnicas de biorremediação para reabilitar áreas de mineração. A primeira fase do projeto denominado GMAP - *Greening mined-out areas in the Philippines*, realizada entre 2015 e 2018, promoveu a recuperação de um local de extração de cobre e ouro, por meio do emprego da biodegradação microbiana aliada à fitorremediação. A recuperação de áreas contaminadas demanda estratégias, pesquisas e recursos financeiros para operacionalizar o plano de descontaminação. Um plano de descontaminação do tricloroetano, contaminante presente num pátio ferroviário no estado do Kansas, segundo Hack (2023), previu que a remediação da área do estaleiro ferroviário *Union Pacific* custará US\$13,9 milhões. Dentre as estratégias propostas, há a retirada do restante do solo contaminado e a implementação da biorremediação pela técnica de bioestimulação dos microrganismos presentes no local.

A biorremediação é uma estratégia que tem sido empregada na recuperação de ecossistemas contaminados porque se baseia na capacidade natural que plantas, fungos, microalgas e bactérias de ecossistemas poluídos possuem em remover, destruir, imobilizar ou transformar determinadas moléculas de poluentes (KEBEDE *et al.*, 2021). Dada a vasta utilização do petróleo e seus derivados, e os recorrentes derramamentos em rios, mares e solos, a busca de maneiras que solucionam e amenizam os efeitos nocivos ao meio ambiente e ao ser humano vem sendo o foco de pesquisas e sendo empregadas por empresas mundo afora. A poluição causada pelo petróleo e seus derivados é motivo de preocupação por conta da contaminação das águas subterrâneas, que pode levar também à contaminação de aquíferos utilizados no abastecimento de água para a população (ANDRADE *et al.*, 2010).

A biorremediação visa empregar a atividade da microbiota presente em um determinado sistema contaminado para diminuir e/ou conter esta contaminação. As áreas que mais utilizam a biorremediação são solos e águas subterrâneas. Esta contaminação é proveniente da atividade humana, tal como a extração de petróleo e a produção de seus derivados, como os HAP, carvão corantes, produção de carvão vegetal por meio de sua gaseificação, utilização de agrotóxicos, produtos farmacêuticos e outros (MALLMANN, 2019).

Existe uma problemática da emissão dos HAP's, prejudiciais ao meio ambiente e ao ser humano, devido à característica carcinogênica e/ou mutagênica que vários derivados do petróleo possuem. Esses compostos são formados a partir da combustão incompleta ou pirólise dos derivados do petróleo. Uma das vias que levam os HPAs à atmosfera é a queima de combustível fóssil, e seu comportamento no ambiente exposto depende da pressão de vapor e da solubilidade em água. Aqueles que possuem baixa pressão de vapor, são hidrofóbicos e se depositam no solo (FROEHNER *et al.*, 2008).

A maneira mais comum de se remover os HPA do meio ambiente é se utilizando a biorremediação, em que os microrganismos transformam ou mineralizam os contaminantes orgânicos em substâncias menos nocivas ao meio ambiente, as quais podem ser integradas aos ciclos geoquímicos naturais. A parte dos HPAs que é parcialmente dissolvida em água tende a se adsorver nos sólidos suspensos e em sedimentos de coluna d'água, devido ao alto valor de Koc (Coeficiente de Partição de Carbono Orgânico) (FROEHNER, 2009; CARDOSO, 2016)

No processo de biorremediação, dentre os contaminantes mais citados em literatura estão os resíduos sólidos, o óleo diesel, o mercúrio, o cromo, o óleo vegetal e o óleo cru (MALLMANN, 2019). Os principais contaminantes encontrados no solo são os derivados de petróleo, com os hidrocarbonetos em maior quantidade, antibióticos e metais pesados em menor quantidade (CARDOSO, 2016).

A classificação dos contaminantes é comumente feita em compostos biodegradáveis, compostos persistentes e compostos recalcitrantes. Os compostos biodegradáveis são aqueles que possuem composição molecular próximas às encontradas no solo, como poluentes que possuam grande quantidade de matéria orgânica, os quais possuem mais facilidade de serem biodegradados, devido à similaridade molecular com as encontradas no solo. Os poluentes persistentes, são biodegradáveis geralmente em condições específicas, como na presença de O₂. Já os poluentes recalcitrantes, são moléculas que possuem baixa probabilidade de serem decompostas pela microbiota, pois possuem baixa solubilidade, alta adsorção ao solo, alta toxicidade, e até a possibilidade de ser transformadas em moléculas mais tóxicas (CARDOSO, 2016).

O processo de degradação natural realizado pelos microrganismos requer alguns ajustes de parâmetros do meio ao qual se deseja descontaminar, dentre estes fatores, há a necessidade de se ter doadores e aceitadores de elétrons. Existe a necessidade de uma força motriz suficiente para que ocorram as oxidações e reduções bióticas ou abióticas do sistema (WANG *et al.*, 2020).

Os fatores bióticos do processo da biorremediação determinam a eficiência da redução do contaminante do sistema de interesse. No geral, contendo-se apenas uma cepa ou um consórcio de microrganismos indígenas, é possível ocorrer a biodegradação. Os fatores que podem influenciar na eficiência da biorremediação são a espécie microbiana, o potencial metabólico, a densidade populacional e a capacidade desses microrganismos produzirem biossurfactantes, que aumentam a biodisponibilidade das moléculas dos compostos contaminantes. Além disso, alguns fatores podem influenciar o estado no qual o poluente se encontra, por exemplo, a temperatura, que aumenta a viscosidade do poluente, podendo diminuir sua solubilidade, tornando o poluente biologicamente indisponível ao metabolismo microbiano (KEBEDE *et al.*, 2021)

A biorremediação utiliza os microrganismos naturais ou não para a degradação dos contaminantes. Os microrganismos, que podem ser bactérias – os

mais utilizados- microalgas, fungos filamentosos e leveduras, degradam os contaminantes por meio de suas funções bioquímicas, podendo haver completa mineralização dos contaminantes presentes numa área remediada. Os contaminantes são transformados em produtos com pouca ou quase nenhuma toxicidade, como a água e o CO₂. Esse processo de mineralização ocorre devido à metabolização dos compostos orgânicos, em que o petróleo ou derivado servem como fonte de energia e nutrientes aos microrganismos (ANDRADE *et al.*, 2010; KEBEDE *et al* 2021).

Dentre as técnicas utilizadas no mundo para a remediação de derramamentos de petróleo e seus derivados, há (TAVARES, 2013):

- Extração de vapor do solo: há a remoção física dos contaminantes, compostos orgânicos voláteis, clorados ou não, e os BTEX da zona saturada, por meio de poços de perfuração no solo com a aplicação de vácuo;
- Dessorção térmica: em que há aquecimento dos resíduos para que haja a volatilização dos compostos orgânicos voláteis. Há a injeção de água ou vapor quente dentro do solo para aumentar a mobilidade dos contaminantes;
- Aeração (*in situ*): esse método é utilizado para extrair compostos voláteis e semi-voláteis que se encontram na zona saturada do solo. É utilizada a injeção de ar para a remoção de contaminantes como CHCs (hidrocarbonetos clorados), BTEX e os HPAs;
- Barreiras reativas permeáveis: essa técnica se baseia na inserção de um material reativo no subsolo, onde a pluma de água subterrânea contaminada atravessa esse material, havendo reações ou filtração, de modo a descontaminar essa pluma;
- Incineração: é a queima dos contaminantes. Utilizado na extração de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis, como os HPAs, os bifenilos policlorados, em inglês *polychlorinated biphenyls* (PCBs), e os pesticidas, porém é uma técnica muito prejudicial à atmosfera e à saúde humana;
- Solidificação/estabilização: há o isolamento do poluente, como os CHCs e metais pesados. O contaminante é imobilizado por meio da introdução de outro material, que pode provocar a solidificação, uma reação física, ou até alteração do pH do contaminante, fazendo com que ele seja imobilizando, não havendo o espalhamento da contaminação;

- Biorremediação: essa técnica de remediação utiliza a atividade microbiana para a degradação dos hidrocarbonetos.

Os tratamentos com a biorremediação podem ser *ex-situ* (*off-site*), em que a área contaminada é retirada do local de origem para ser tratada; e a biorremediação *in-situ* (*on-site*), em que o tratamento é realizado no próprio local de origem da contaminação (ANDRADE *et al.*, 2010).

A eficiência de biodegradação dos hidrocarbonetos realizada por bactérias, leveduras e fungos pode variar conforme o grupo de microrganismo empregado, de 6% a 82% para fungos encontrados no solo; 0,13% a 50% para bactérias encontradas no solo e até 100% de eficiência para bactérias marinhas (DAS *et al.*, 2011).

A técnica de biorremediação em solos é considerada de baixo custo, dado o tempo requerido para a remediação da área, comparado com outras técnicas existentes (ANDRADE *et al.*, 2010). Na remediação de solos contaminados com petróleo ou seus derivados, são empregadas análises de risco do acidente em questão, bem como das características do solo e ambiente. Além disso, a técnica deve estar em conformidade com a legislação ambiental vigente na região em que ocorre o processo de descontaminação. Para tal, são necessárias avaliações de natureza biológica, geofísica e hidrológica da área contaminada (GAYLARDE *et al.*, 2005; TAVARES, 2013).

Há diversas técnicas de biorremediação em solo, que podem ocorrer naturalmente ou serem aplicadas com o controle de alguns parâmetros. Entre as técnicas destacam-se a atenuação natural, a bioestimulação, a bioaumentação, a bioventilação, o *landfarming* e a fitorremediação, podendo ocorrer *in-situ* ou *ex-situ*, a *ex-situ* com variáveis mais complexas devido à remoção da porção contaminada. Já entre as técnicas estritamente *ex-situ*, podem-se citar a compostagem e os biorreatores. A depender das características específicas do solo contaminado e do tipo de poluente, cada uma das técnicas de biorremediação possui benefícios e estratégias que podem levar a um resultado eficiente e satisfatório (JACQUES *et al.*, 2007).

2.2.1 Atenuação natural

A atenuação natural é a forma mais simples da biorremediação, é um processo que ocorre naturalmente em qualquer área contaminada e, dependendo da concentração do contaminante, tipo, características do solo, como umidade e a presença de microrganismos autóctones intrinsecamente capazes de degradar o contaminante, faz com que a eficiência de remediação varie consideravelmente (MOREIRA, *et al.*, 2009; CURIEL-ALEGRE *et al.*, 2022). A presença de microrganismos indígenas pode eliminar ou transformar as substâncias tóxicas em componentes menos agressivos ao meio ambiente (KEBEDE *et al.*, 2021).

O processo de atenuação natural é capaz de degradar os derivados de petróleo, e os microrganismos capazes de realizar essa remediação podem ser encontrados em muitos ambientes. Apesar de ser um processo de remediação eficiente e prático, é um processo que tem como fator limitante a disponibilidade de nutrientes, elétrons receptores ou ambos. Há casos de contaminação de solos em que a atenuação natural fica limitada às zonas periféricas da área contaminada, pois a alta concentração de contaminante inviabiliza o crescimento dos microrganismos, conseqüentemente, a degradação realizada por eles (MOREIRA *et al.*, 2009; KEBEDE *et al.*, 2021).

Dentro da atenuação natural, podem ocorrer alguns processos, também naturais, que colaboram na remediação de uma área contaminada, como a volatilização do contaminante, a dispersão do contaminante ocorrida pelas intempéries naturais do ambiente, como lixiviação por exemplo, a diluição e a adsorção do contaminante. Dentre esses processos naturais, somente a biodegradação realizada pelos microrganismos presentes no ambiente é que destrói quimicamente o contaminante, os demais processos apenas transferem o contaminante para uma outra área (ANDRADE *et al.*, 2010).

Devido as características inerentes ao processo de biorremediação por meio da atenuação natural possuem algumas ressalvas quanto ao tempo necessário para a descontaminação de determinada área, o tempo de degradação depende do tipo de contaminante e das condições do local de contaminação, como umidade, temperatura, nutrientes e microbiota capaz de degradar tais contaminantes (KEBEDE *et al.*, 2021). Na maioria dos casos em que a atenuação natural é escolhida como técnica de remediação, há um controle rigoroso e periódico para

averiguar a degradação do contaminante, esse processo é denominado como “atenuação natural monitorada” (ANM), uma variação do processo de biorremediação muito utilizada nos Estados Unidos. Nos casos de contaminação de solo ou águas, onde há viabilidade de se utilizar um processo de remediação mais longo, e que esse tempo longo de remediação não leva nenhum risco à saúde pública, e nem ao meio ambiente, a ANM é um método eficiente (ANDRADE *et al.*, 2010).

Quando os ambientes são expostos a hidrocarbonetos, estes têm sua população de microrganismos endógenos aumentada rapidamente, com adaptação às novas condições e ativação das vias metabólicas capazes de catabolizar as moléculas poluentes, demonstrando que a atenuação natural pode ser uma estratégia a ser utilizada na descontaminação de ambientes (KEBEDE *et al.*, 2021).

2.2.2 Bioestimulação

A técnica de bioestimulação segue o mesmo princípio da atenuação natural, porém há um estímulo inerente às necessidades das populações de microrganismos nativos do local que se deseja biorremediar, esses microrganismos nativos são chamados de autóctones ou indígenas. O crescimento dos microrganismos, e consequente taxa de degradação dos poluentes, necessitam de macro e micronutrientes fornecidos pelo meio em que se aplica a técnica de biorremediação (GAYLARDE *et al.*, 2005). Esse estímulo à degradação do poluente é realizado por meio de correção do pH do meio, balanceamento dos nutrientes do solo em relação à carga de carbono poluente orgânico, adição de N, P e K - relação (C:N:P:K), poluente orgânico -, correção da umidade e aeração do solo (DE MELO *et al.*, 2008; KEBEDE *et al.*, 2021). Aditivos de enzimas e de nutrientes podem aumentar significativamente a taxa de biodegradação (DAS *et al.*, 2011). O bioestímulo é considerado umas das técnicas de biorremediação mais fáceis e eficientes, além da adição dos nutrientes, há também o aumento de trocadores de elétrons, que atuam como intermediários das vias metabólicas responsáveis pela degradação dos poluentes (BOSCO *et al.*, 2020).

A suplementação de macronutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio no solo contaminado por hidrocarbonetos, estimula o crescimento da população microbiana existente no solo, favorecendo a degradação. O acesso aos nutrientes já

existentes no solo é dificultado devido ao próprio poluente, e se a concentração de hidrocarbonetos for grande, há uma escassez dos nutrientes em relação à quantidade de carbono existente, tornando o balanceamento de nutrientes necessários. Entretanto, a hiper suplementação pode ser tóxica às populações microbianas, sendo a proporção de (C:N:P) em (100:10:1) muito recomendada (KEBEDE *et al.*, 2021).

Experimentos que seguiram os princípios da bioestimulação em ambientes aquáticos se mostraram eficientes, com aumento de 5 a 10 vezes na taxa de biodegradação. Apesar de se verificar aumento da eficiência na taxa de biodegradação, há dúvidas a respeito da viabilidade desse estímulo a longo prazo, pois tem-se conhecimento de que a taxa de degradação tende a se equalizar ao longo do tempo (GAYLARDE *et al.*, 2005). Para a eficácia da estimulação do crescimento bacteriano por meio da adição de nutrientes, deve-se considerar o tempo de esgotamento tanto dos principais nutrientes inorgânicos necessários para o crescimento das poucas bactérias, quanto do nitrogênio e fósforo (KEBEDE *et al.*, 2021).

Os nutrientes adicionados à biorremediação estimulada são representados pelo nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), em relação ao carbono. São utilizados os sais nitrato de amônio (NH_4NO_2), dihidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4) ou o nitrato de potássio (KNO_3) (ANDRADE, *et al.*, 2010). Como fonte de nitrogênio, pode-se utilizar a ureia, como fonte de fósforo, o superfosfato simples (P_2O_5) e como fonte de potássio, o KCl (CAVALHÃO, 2011). Para processos de biorremediação em que é sabido que as populações microbianas possuem vias metabólicas mais complexas e demoradas, a suplementação dos nutrientes pode ser feita por meio de fertilizantes, como KNO_3 , NaNO_3 , NH_4NO_3 , K_2HPO_4 e MgNH_4PO_4 (KEBEDE *et al.*, 2021).

O nitrato (NO_3^-) é um componente importante na utilização da biorremediação em solo, possui diferentes rotas metabólicas como fonte de nutrientes no metabolismo assimilativo, podendo atuar também como receptor de elétrons no metabolismo dissimilativo dos microrganismos (COUTINHO *et al.*, 2015).

Pontes *et al.* (2015) compararam a atenuação natural e a bioestimulação na remediação de solo argiloso contaminado com 5% (m/m) de óleo diesel S500, por um período de 128 dias de incubação. Na atenuação natural a proporção de (C:N:P) original do solo era de 100:6,45:0,29 e foi ajustada para 100:10:1, para se trabalhar

com a bioestimulação. A eficiência de remoção dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) na atenuação natural foi de 65%, enquanto, que na bioestimulação foi de 72%, mostrando que a disponibilidade de nutrientes na proporção de 100:10:1 favoreceu o crescimento dos microrganismos, aumentando-se a eficiência de biodegradação.

Entretanto, de acordo com Baptista *et al.* (2003), a proporção ótima de carbono poluente, nitrogênio e fósforo pode não ser exatamente aquela que é comumente citada na literatura, (100:10:1). Em seu experimento, foi constatado que o aumento da concentração utilizada de KH_2PO_4 levou à queda de eficiência de biodegradação de petróleo cru, e encontrou o valor ótimo de 35 mg fósforo/100 g de solo, sem a adição de N, com o valor original de 0,000293 mg N/100 g de solo, obtendo-se uma eficiência de 35% na remoção de matéria orgânica. Sem a suplementação de nitrogênio, os microrganismos provavelmente são obrigados a consumir uma quantidade maior de matéria orgânica em detrimento ao consumo restrito de nitrogênio, consumindo somente o essencial para o crescimento.

A bioestimulação, também denominada como atenuação natural acelerada (ANA), promove o estímulo dos microrganismos nativos por meio da adequação do local contaminado de modo a acelerar as funções metabólicas responsáveis pela degradação do poluente. Portanto, o primeiro requisito necessário desse tipo de biorremediação é a certeza de que os microrganismos indígenas conseguirão degradar o poluente que se deseja. Quando executada de forma controlada, a ANA pode acelerar a biorremediação do local (ANDRADE, *et al.*, 2010).

Com o decorrer do processo de biorremediação, os recursos encontrados no solo vão se esgotando, com possível rebalanceamento das proporções de nutrientes. No entanto, Curiel-Alegre *et al.* (2022), não obtiveram maiores taxas de biodegradação nos microcosmos estudados ao aportar novas cargas de nitrogênio e fósforo, no 43º dia de incubação; e os microrganismos destacados no estudo foram: *Pseudomonas*, *Achromabacter*, *Cupriavidus*, *Comamonadaceae* e *Sphingomonadaceae*. Evidência importante para destacar as diferenças entre os metabolismos das populações de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos.

2.2.3 Bioaugmentação

A bioaugmentação, é um processo em que microrganismos não nativos são introduzidos no ambiente o qual se pretende remediar, esses microrganismos devem possuir o potencial de degradação conhecido, tendo sua origem de outro lugar geográfico ou isolado no mesmo lugar de interesse (DE MELO *et al.*, 2008; KEBEDE *et al.*, 2021). Para a estratégia de bioaumento ser viabilizada, o inóculo escolhido deve ser capaz de metabolizar os componentes do poluente, ser adaptável às novas condições impostas no novo *hábitat* e ser um competidor efetivo com os outros microrganismos indígenas do ambiente (KEBEDE *et al.*, 2021). A técnica de bioaumento possui bons resultados, principalmente, quando é realizada com microrganismos isolados de ambientes com ocorrência de contaminação, devido à adaptação a um novo ambiente ser menos brusca (BOSCO *et al.*, 2020).

Os microrganismos inseridos devem atuar em sinergia com as espécies autóctones, de forma a interagir positivamente nos processos biogeoquímicos naturais (CARDOSO, 2016). O bioaumento pode ser empregado em diferentes formas, como fitoamento e bioaumento da rizosfera, a técnica da fitorremediação aliada com o bioaumento, tendo resultados importantes na taxa de degradação de compostos orgânicos (GARRIDO *et al.*, 2019).

Os microrganismos utilizados na bioaugmentação são exógenos (alóctones), previamente estudados, que possuem capacidade de degradar o poluente em questão, e então são inseridos no ecossistema de interesse. Esses microrganismos podem prosperar no novo *hábitat* ou não. Os microrganismos autóctones também podem ser utilizados por meio do aumento da população dos mesmos, que ao passo do aumento da população microbiana, aumenta-se também a taxa de biodegradação do poluente (GAYLARDE *et al.*, 2005; ANDRADE, *et al.*, 2010). Entretanto, espécies exógenas utilizadas na bioaugmentação podem ter dificuldade em prosperar e atuar na biodegradação, pois o estresse causado pelos fatores abióticos pode culminar na decadência da população inserida (KEBEDE *et al.*, 2021).

Dentro do ramo da bioaugmentação, existe a possibilidade de imobilização celular (IC), uma prática muito utilizada para a biorremediação de diversos produtos químicos tóxicos (DAS *et al.*, 2011). A IC é uma alternativa que possibilita a engenharia da estrutura morfológica dos microrganismos, de forma a preservar a atividade catalítica desejada. A IC consiste na imobilização física das células em um

suporte físico, no qual as atividades catalíticas são mantidas, tanto em processos contínuos, como descontínuos, possibilitando a sua reutilização. O uso de microrganismos imobilizados (MI) gera maior produtividade devido à concentração de células (COVIZZI *et al.*, 2007).

Um estudo realizado por Wilson *et al.* (1996) utilizou *Pseudomonas spp.* imobilizadas e uma suspensão de células livres para a degradação de gasolina, em sistema aquoso, constatou que houve maior interação entre a célula imobilizada com as gotículas de hidrocarbonetos do que com as células livres, ocorrendo o aumento da produção de ramnolipídeos, que são surfactantes de origem microbiana pertencentes à classe dos glicolípídeos, produzidos pelas *Pseudomonas*. O aumento de ramnolipídeos proporcionou maior dispersão dos n-alcanos insolúveis em água, facilitando a absorção dos hidrocarbonetos pelas células. Estudos comprovam que a imobilização de células bacterianas aumenta a taxa de biodegradação do petróleo cru por exemplo, quando comparado com células vivas livres (DAS *et al.*, 2011; WILSON *et al.*, 1996).

Há estudos de bactérias imobilizadas em grânulos de alginato para degradar hidrocarbonetos, e os resultados demonstraram que a biodegradação não diminui ao longo do tempo, uma característica muito mencionada e evitada na biorremediação, pois a taxa de degradação tende a se equalizar com o tempo (DAS *et al.*, 2011; DÍAZ *et al.*, 2002).

Alguns problemas inerentes ao uso da biorremediação podem ocorrer durante o processo, como por exemplo: a contaminação pode conter mais de um tipo de poluente, de classes químicas diferentes, havendo a necessidade de diferentes microrganismos capazes de degradar tais moléculas; a concentração do poluente pode ser inviável ao meio ambiente, mas baixa para ativar as vias metabólicas dos microrganismos, sendo também baixa quantidade de carbono para o crescimento de microrganismos (GAYLARDE *et al.*, 2005; KEBEDE *et al.*, 2021). Esses problemas podem ser solucionados por meio dos microrganismos geneticamente modificados, os OGMs, em que a manipulação genética dos microrganismos acarreta o aumento das taxas de biorremediação em ambientes contaminados. Porém, apesar dos ganhos que os OGMs podem trazer à ciência, há algumas preocupações quanto a seu uso, como qual o impacto que esses microrganismos modificados podem causar ao meio ambiente, e quais relações da fauna e flora que novas populações

microbianas podem alterar. Essas e outras questões ainda são indagadas e estudadas por muitos cientistas (GAYLARDE *et al.*, 2005).

Devido às interações entre os microrganismos, a estratégia de bioaumento necessita conhecimento sobre as interações que os microrganismos indígenas e os não indígenas terão, pois há competição por nutrientes. Além disso, possíveis efeitos antagônicos, como uma espécie inibir a propagação de outra espécie, pode diminuir a taxa de biodegradação. As bactérias *Thalassolituus*, conhecidas como degradadores de óleo, produzem metabólitos capazes de inibir o crescimento de outras bactérias degradadoras de óleo também. Portanto, a escolha da espécie microbiana do bioaumento deve ser baseada no estudo preliminar da interdependência entre espécies, de forma que possuam efeito sinérgico, para a completa biodegradação do poluente de interesse (KEBEDE *et al.*, 2021). Além disso, a adição de mais de uma comunidade de microrganismos pode gerar competição pelos recursos do solo, ou mudar a proporção de nutrientes (C:N:P), levando ao declínio da concentração populacional capaz de biodegradar o poluente (CURIEL-ALEGRE *et al.*, 2022).

2.2.4 Bioventilação

A técnica de bioventilação é um artefato dentro da biorremediação, utilizada como um complemento da remediação que introduz ou não um grupo de microrganismos de interesse. Faz-se a adição de oxigênio ou gás metano, nos espaços vazios do solo, com o objetivo de estimular o crescimento dos microrganismos degradadores do poluente o qual se pretende remediar. A inserção de ar no solo auxilia na atividade aeróbica dos microrganismos, fornecendo condições de oxigenação adequadas para uma degradação eficiente (REGINATTO *et al.*, 2012; CARDOSO, 2016).

Segundo Reginatto *et al.* (2021), a bioventilação pode aumentar em até 23% a taxa de degradação do óleo diesel em solo argiloso e não há diferença significativa nas taxas de degradação em diferentes vazões de ar (2, 4 e 6 L/min), em intervalos de tempos distintos de 1h de ventilação a 24h, 36h e 48h. Portanto, a vazão e tempo em que o ar é introduzido ao solo não interferem no resultado na técnica.

A disponibilidade de oxigênio na prática de biorremediação é necessária para estimular biorremediação aeróbica ou aeróbica facultativa, pois o oxigênio atua

como acceptor final de elétrons. Esta funcionalidade do oxigênio como reagente químico é de suma importância nas vias metabólicas de degradação dos poluentes aromáticos (KEBEDE *et al.*, 2021).

2.2.5 Fitorremediação

A fitorremediação é um método de descontaminação que utiliza plantas com a capacidade de absorver contaminantes presentes no solo, como pesticidas, metais pesados, etc. Para ser uma técnica com boa eficiência, é necessário que as plantas utilizadas tenham taxa de crescimento alta, possuam sistema radicular profundo e que sejam resistentes ao poluente (COUTINHO *et al.*, 2015). Há algumas variações de fitorremediação, dentre elas: i) fitoextração, em que o contaminante fica retido no tecido vegetal; ii) fitotransformação, em que a planta degrada o contaminante, e pode utilizá-lo em sistemas sólidos ou líquidos; iii) fitoestimulação, em que os microrganismos capazes de degradar o poluente se encontram na rizosfera da planta; iv) fitoestabilização, em que as plantas imobilizam o poluente, tornando-o impossibilitado de migração (JACQUES *et al.*, 2007; COUTINHO *et al.*, 2015).

Outra técnica que pode ser utilizada para a biorremediação de áreas contaminadas é a rizorremediação. Essa via utiliza de microrganismos nativos da área contaminada, cujas raízes de plantas existentes no ambiente podem otimizar atividades catalíticas exigidas no processo de quebras das moléculas de contaminantes. As plantas de alfafa, por exemplo, podem ter efeito estimulantes à biorremediação, com diminuição de 27,91% dos hidrocarbonetos totais (HTP) e um aumento em três vezes na concentração celular (GARRIDO *et al.*, 2019).

A possibilidade da relação simbiótica entre as plantas e os microrganismos pode beneficiar ambientes poluídos. Bactérias endofíticas têm a capacidade de estimular o crescimento das plantas por meio da fixação do nitrogênio, passível de inativar vírus que causam doenças, e, degradar poluentes tóxicos às plantas (IQBAL *et al.*, 2019).

As enzimas AlkB e CYP153, fortemente associadas à degradação de compostos orgânicos, apresentam eficiente degradação na rizosfera e no interior de plantas, comprovando que a interação das plantas e bactérias podem gerar benefícios além do usual. Este fato é comprovado devido ao aumento dos genes

AlkB em plantas inoculadas com *Pseudomonas sp.*, quando expostas à contaminação de hidrocarbonetos (IQBAL *et al.*, 2019).

De acordo com Iqbal *et al.* (2019), plantas das espécies *Lolium perenne* e *Arabidopsis thaliana*, inoculadas com bactérias *Pseudomonas sp.*, em que óleo diesel foi adicionado às bolsas de germinação de sementes, tiveram satisfatório papel na degradação do óleo em relação ao controle da mesma planta sem a inoculação da bactéria. Os estudos comprovaram que a *L. perenne* inoculada removeu 45,60% de HTP após 20 dias de exposição ao contaminante, em contrapartida, o grupo controle obteve remoção de 2%, diminuição atribuída às perdas abióticas.

2.2.6 Landfarming

A técnica de *landfarming* é um método simples, e muitas vezes utilizada como estratégia de descontaminação primária. É uma técnica que vem sendo utilizada na biorremediação de antigas bases militares contaminadas na Coréia do Sul (KIM *et al.*, 2022). Ela resulta na biodegradação de resíduos em uma camada superior de solo, que é periodicamente revolvida para promover a aeração e o aumento da atividade biológica, com consequente descontaminação ou diminuição da quantidade de contaminante no solo (JERÔNIMO *et al.*, 2014). A prática inclui a escavação da área contaminada, espalhamento do solo e irrigação por aspersão periódica. A ação do *landfarming* pode acelerar a volatilização dos hidrocarbonetos, promover a oxigenação, resultando no estímulo da atividade microbiana na degradação (KIM *et al.*, 2022).

A técnica de *landfarming* permite a estimulação da microbiota natural da matriz de solo poluída através da mistura física comum, com baixo valor energético, baixo custo e gerar pouca ou baixa geração de impacto ao meio ambiente biorremediado (MACCI *et al.*, 2021).

Esta técnica é baseada na adição de contaminantes ou rejeitos contaminados na superfície de um solo não contaminado, para que haja estimulação da degradação. Nesse processo é viável que o solo seja primeiramente impermeabilizado do solo abaixo da linha de aeração e inclinação do terreno, com o objetivo de espalhamento do contaminante pelas laterais e ao longo da profundidade. Além disso, é mandatário haver bom distanciamento de vias fluviais e

lençol freático profundo. Esta técnica de biorremediação é muito utilizada para a despoluição de resíduos da indústria petrolífera (CARDOSO, 2016).

Segundo estudos de Kim *et al.* (2022), a volatilização de frações dos hidrocarbonetos ocorre mais aprimoradamente nos primeiros dias do processo da biorremediação, período no qual os microrganismos existentes no solo contaminado estão em fase de adaptação. Em alguns experimentos em que foram estudadas as fases do poluente ao longo da biorremediação, notaram que a velocidade com que a biorremediação ocorre é dividida entre rápida degradação, seguida de degradação mais lenta, próximo à estabilidade, e a degradação prolongada, restando as fases mais recalcitrantes do poluente (MACCI *et al.*, 2021).

2.3 MICRORGANISMOS

Microrganismos autóctones ou alóctones degradam compostos xenobióticos no ambiente, transformando-os em produtos menos recalcitrantes ou realizando a mineralização, gerando CO_2 , H_2O , NH_3 , SO_4^{2-} e PO_4^{2-} como produtos finais. O sistema microbiano na biorremediação é capaz de reciclar moléculas da biosfera, atuando em ciclos biogeoquímicos. Sua diversidade metabólica com diferentes vias enzimáticas permite a degradação de diversos poluentes, onde produtos metabólicos de um microrganismo podem ser substratos para outro, gerando sinergismo metabólico e possibilitando a degradação de diferentes contaminantes ambientais (GAYLARDE *et al.*, 2005).

O solo é *habitat* de milhões de microrganismos, e diferentes espécies se adaptam às fontes de energias presentes no local. Há estimativas que em um grama de solo podem ser encontradas 600 milhões de bactérias, divididas entre 15 mil a 20 mil espécies distintas. Desse total, em solo onde há contaminação por hidrocarbonetos, 1% da população é capaz de degradar os poluentes. Tem-se conhecimento que o solo quando contaminado possui maior quantidade de microrganismo do que o solo não contaminado, porém com diversidade menor (GONZÁLEZ *et al.*, 2010). A disponibilidade e abundância de espécies estão intimamente relacionadas com a natureza do poluente e os fatores físicos do local contaminado. A ocorrência de microrganismos hábeis na biodegradação é prioritária nas ações de correção que visam a eficiência do processo de descontaminação (KEBEDE *et al.*, 2021).

As bactérias se adaptam e sobrevivem nas mais diversas condições ambientais, devido a algumas características como: crescimento rápido, versatilidade metabólica, plasticidade genética e adaptação a variações do meio. Essas adaptações aos mais diversos ambientes são o que viabilizam muitas espécies microbianas em utilizar os poluentes encontrados no meio como substrato de crescimento, por meio da degradação, utilizando-os como fonte de carbono e energia (TONINI *et al.*, 2010). Há enzimas capazes de catabolizar moléculas específicas, dentro deste contexto, os microrganismos são capazes de criar consórcios, em que cada espécie atua em etapas distintas no processo de biodegradação (GAYLARDE *et al.*, 2005).

Há diferentes classes de microrganismos capazes de degradar poluentes, principalmente o petróleo e seus derivados. As bactérias são os agentes mais ativos na degradação primária de petróleo no meio ambiente. Tem-se conhecimento de que diversas bactérias degradam hidrocarbonetos para que estes assumam papel nutritivos a elas. Existe um compilado de diversos gêneros de bactérias e fungos capazes de degradar hidrocarbonetos (DAS *et al.*, 2011).

A degradação dos poluentes pode ocorrer de forma aeróbica e anaerobicamente, em que diversas vias metabólicas podem existir conforme a espécie do microrganismo encontrado. Na biodegradação exercida por microrganismos anaeróbios, são utilizados outros elementos como aceptores finais de elétrons, em substituição ao oxigênio, tais como compostos inorgânicos oxidados (NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2), na respiração anaeróbica, e compostos orgânicos (piruvato, acetaldeído, metano), na fermentação (CARDOSO *et al.*, 2016). Porém, de acordo com Díaz *et al.* (2004), a mineralização de produtos derivados do petróleo é intensificada em condições aeróbicas, em que ocorre a atividade metabólica microbiana apenas na presença de oxigênio, que atua comoceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons durante a respiração celular, produzindo água (CARDOSO *et al.*, 2016).

A biorremediação anaeróbica pode proporcionar a degradação de poluentes organohalóides, como por exemplo, o hexaclorobenzeno (HCB), o triclorometano (TCM) e o bifenilos policlorados (PCBs). A desalogenação de vários componentes é possível por meio da ação da bactéria *Dehalococcoides*, isolada de água subterrânea contaminada. Esta bactéria possui enzimas capazes de converter etenos clorados em etano (KUMAR, 2021). Em vias metabólicas anaeróbicas, os

poluentes compostos por hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos podem ser oxidados a compostos fenólicos ou ácidos orgânicos, posteriormente transformados em cadeias longas de ácidos graxos, com posterior transformação em metano e dióxido de carbono (KEBEDE *et al.*, 2021).

Os fungos desempenham um papel importante na biorremediação, sendo chamada de micorremediação quando mediada por esses organismos. Na floresta, eles têm uma função fundamental na decomposição de matéria orgânica, produzindo enzimas e ácidos que quebram celulose e lignina para formar o húmus, essencial para o crescimento das plantas. Os fungos também são capazes de realizar a biossorção de metais em soluções aquosas, utilizando trocas iônicas e formação de complexos com grupos funcionais da superfície celular (KUMAR, 2021). Alguns fungos, como o *Phanerochaete chrysosporium*, foram capazes de degradar HPAs em solo, espécies comuns em solo incluem *Trichoderma*, *Mortierella*, *Aspergillus* e *Penicillium* (LEAHY *et al.*, 1990).

Miranda *et al.* (2007) realizaram um trabalho em que as cepas de leveduras UFPEDA 845 e UFPEDA 862, identificadas como *Rhodotorula aurantiaca* e *Candida ernobii*, respectivamente, foram avaliadas na degradação de óleo diesel em fase aquosa. Em ambas as cepas, notou-se aumento da biomassa, com crescimento mais lento para *C. ernobii*. Houve a coincidente diminuição do pH para as duas cepas, indicando aumento da produção de ácidos orgânicos, produtos intermediários da biodegradação dos hidrocarbonetos. Na degradação dos hidrocarbonetos, foram obtidas maiores taxas de biodegradação para a *R. aurantiaca*, com porcentagens de degradação para decano – 93,0%, nonano – 38,4% e dodecano – 22,9%. Enquanto que para *C.ernobii* houve total degradação para o tetradecano, 5-metil-octano e octadecano, com parcial degradação do decano – 60,8% e nonano – 21,4%.

De acordo com Hanson *et al.* (1997), as bactérias *Acinetobacter sp.* isoladas de lodo de refinaria de petróleo bruto, foram capazes de degradar petróleo bruto da cidade de Bombaim na Índia. Um experimento em laboratório constatou 70% de degradação de petróleo em fase aquosa contaminada com 0,5% do óleo, por 120 h de incubação. Já em solo, foi verificado o aumento de 4,5 vezes o número de células ao longo de 30 dias de incubação, com aumento de 80% de germinação de sementes do feijão Mung em oposição a 35% de germinação no solo não tratado, fato que pode ser atribuído à diminuição da fitotoxicidade do óleo bruto devido à degradação do contaminante.

Bactérias dos gêneros *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkholderia* e *Mycobacterium*, assim como as *Sphingomonas*, são capazes de degradar hidrocarbonetos. Fungos dos gêneros *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces* e *Graphium*, e leveduras dos gêneros *Candida*, *Yarrowia* e *Pichia* também demonstraram eficácia na degradação de hidrocarbonetos presentes em solos contaminados por petróleo (DAS *et al.*, 2011).

De acordo com os estudos de Garrido-Sanz *et al.* (2019), há uma predominância dos gêneros de *Pseudomonas*, *Aquabacterium* e *Chryseobacterium* em solo contaminado com óleo diesel em processo de biorremediação, com 27,01%, 22,36% e 15,34%, respectivamente. No sequenciamento, também foram identificados *Sphingobium*, *Novosphingobium*, *Dokdonella*, *Parvibaculum* e *Achromobacter*, 5,2%, 3,65%, 3,29%, 3,24% e 2,45% de abundância relativa, respectivamente. A presença das *Pseudomonas* é um dos gêneros mais relatados como responsáveis pela biodegradação em solos contaminados com hidrocarbonetos (GARRIDO-SANZ *et al.*, 2019). Estas têm sido consideradas grandes degradadoras de poluentes orgânicos, com potencial para degradar benzeno, tolueno, xileno, óleo diesel, querosene, petróleo bruto e borra de óleo (IQBAL *et al.*, 2019).

2.3.1 Parâmetros que influenciam na biodegradação

Alguns parâmetros físicos influenciam o crescimento dos microrganismos degradadores, tais como temperatura, luz, nutrientes, ou seja, há parâmetros considerados ótimos para o crescimento do microrganismo (GAYLARDE *et al.*, 2005; CURIEL-ALEGRE *et al.*, 2022). Os ambientes como solo e sedimentos são considerados complexos para a biorremediação, pois tendem a adsorver moléculas por meio da atração de cargas opostas, e assim a biodisponibilidade do poluente, prejudicada. Em lugares de temperaturas baixas, a atividade microbiana pode não ser estimulada, resultando em baixa taxa de degradação de poluentes (GAYLARDE *et al.*, 2005).

Existem parâmetros que influenciam no crescimento microbiano degradador, tais como: nutrientes disponíveis do meio, o pH, a umidade, a oxigenação, o potencial redox do meio e a composição e estrutura do poluente. Se houver

presença de metais pesados, estes podem interagir com as enzimas dos microrganismos, inibindo a capacidade degradativa (GAYLARDE *et al.*, 2005).

A correção do pH é geralmente requerida em solo muito ácidos, pois este é um parâmetro que altera a atividade microbiana, pois as bactérias têm seu metabolismo plenamente em funcionamento em pH neutros, ligeiramente alcalinos. O pH considerado ideal para a degradação de hidrocarbonetos é entre 5,2 - 7,0, há trabalhos que evidenciaram o pH até 8 como ideal para biodegradação. Sabe-se que o pH afeta solubilidade dos minerais no solo, tendo impacto na disponibilidade dos nutrientes (CARDOSO *et al.*, 2016; KEBEDE *et al.*, 2021).

A alta taxa de salinidade pode dificultar a estratégia da biorremediação. A salinidade gera estresse aos microrganismos, aumenta a pressão osmótica, alterando a dinâmica de transportes de íons essenciais, com consequente diminuição da atividade metabólica. Em ambientes salinos contaminados por derivados do petróleo, as bactérias halofílicas possuem habilidade de adaptação, com potencial de sobrevivência, com eficiente biodegradação dos hidrocarbonetos (KEBEDE *et al.*, 2021; DE MELO *et al.*, 2008).

A limitação de umidade no solo prejudica consideravelmente a atividade microbiana na mineralização dos poluentes, pois os microrganismos necessitam de uma quantidade satisfatória de água para degradação, uma vez que a presença de umidade favorece a movimentação dos microrganismos, dos nutrientes e do contaminante (BAPTISTA *et al.*, 2003). A oxigenação mínima para estimular a biorremediação aeróbica fica entre 10 e 40%, sendo esta via a mais eficiente na degradação dos hidrocarbonetos. O tempo de incubação necessário para degradar compostos orgânicos anaerobicamente é substancialmente mais alto, levando cinco vezes mais tempo para degradar uma porcentagem menor de poluente (KEBEDE *et al.*, 2021).

Os nutrientes são essenciais para o estímulo e crescimento microbiano. Dentre os elementos essenciais, estão o carbono, o elemento em maior abundância em toda estrutura celular. Os microrganismos presentes no solo representam quase a totalidade de fração viva de matérias orgânica, e por meio das transformações do carbono com os processos de mineralização, imobilização e da formação dos húmus, a matérias orgânica é utilizada como fonte de energia. A disponibilidade do

carbono proporciona a atividade microbiana e, conseqüentemente, a reciclagem dos nutrientes do ecossistema (CARDOSO *et al.*, 2016).

O nitrogênio é um elemento essencial ao metabolismo microbiano, além de síntese de biomoléculas, como proteínas e seus derivados, e os ácidos nucléicos. A demanda por nitrogênio para o crescimento bacteriano é a segunda maior, após a demanda do carbono. O nitrogênio é geralmente o elemento limitante no solo, podendo ser encontrado na forma orgânica e inorgânica; sua suplementação é necessária e, geralmente é realizada por meio de fertilizantes agrícolas. O N orgânico é encontrado na fração proteica da matéria orgânica, fração esta que os microrganismos conseguem facilmente mineralizar. Já na forma inorgânica, o N pode ser encontrado em forma de amônio, nitrito, nitrato, sendo estes passíveis de ciclagem através de diversas transformações realizadas por microrganismos e plantas (CARDOSO *et al.*, 2016).

O fósforo tem papel nos processos de síntese de ATP, fonte de energia celular. Além disso, atua na fotossíntese e respiração, e participa da estrutura e formação de ácidos nucléicos, membrana celular, reações redox, ativação e desativação de enzimas. O fósforo é encontrado no solo em sua forma orgânica, em pó, tendo alta tendência a se adsorver em óxidos contidos no solo, tornando o solo pobre neste nutriente (CARDOSO *et al.*, 2016). Já o potássio, é o elemento responsável pela síntese e regulação enzimática, controle hídrico, sinalização celular, entre outras funções (DIAS *et al.*, 2020).

A estrutura química do composto é um fator crítico na biorremediação. Poluentes que possuem em sua estrutura molecular a presença de grupos químicos, tais como: $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$, CN , $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OCH}_3$ e radicais na cadeia de hidrocarbonetos, podem interferir na distribuição eletrônica da estrutura molecular, o que afeta a catálise enzimática, conferindo à molécula do poluente maior caráter recalcitrante. Detergentes sintéticos sulfonados são exemplos do impacto ambiental que pode ser causado por esses compostos que entre os anos 1960 a 1970, provocaram sérios impactos ao meio ambiente devido à formação de espessas camadas de espuma sobre os rios, provocando a morte de muitos peixes (GAYLARDE *et al.*, 2005).

Em contrapartida, a similaridade dos poluentes com moléculas naturais favorece sua degradação devido à baixa especificidade das enzimas catabolizadoras. Assim, a estrutura do poluente é reconhecida pela enzima em seu

sítio ativo, levando a sua transformação química. Durante a rota catabólica enzimática, o poluente é convertido em fonte de nutrição para o microrganismo, integrando-se ao metabolismo construtivo e energético. Bactérias metabolizam naturalmente moléculas como lignina, benzenos, esteróides, terpenos e compostos halogenados no ambiente (GAYLARDE *et al.*, 2005).

A biodisponibilidade é crucial na degradação de poluentes. Moléculas apolares, como derivados de petróleo, são de difícil metabolização pelos microrganismos. Alguns microrganismos produzem surfactantes para tornar os poluentes solúveis e acessíveis às células. Os HPAs representam um desafio complexo para biorremediação, pois podem ser absorvidos pelo solo ou formar uma fase sólida, dificultando a ação dos microrganismos (GAYLARDE *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 1997).

A composição química do óleo diesel varia de acordo com a região da qual o petróleo é extraído. Diante desta variação, consórcios microbianos capazes de degradar hidrocarbonetos podem ter alterações em sua efetividade, podendo crescer mais ou menos em diferentes meios, como é o caso do fenantreno, que proporcionou um rendimento muito baixo para o consórcio bacteriano formado por *Pseudomonas*, *Aquabacterium*, *Chryseobacterium*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*, *Dokdonella*, *Parvibaculum* e *Achromobacter*, sendo considerado um hidrocarboneto pobre de carbono biodegradável, que poderia ser fonte de energia para as bactérias (GARRIDO-SANZ *et al.*, 2019). Em relação ao padrão de crescimento, neste mesmo consórcio, observaram-se curvas de crescimento polifásicas, explicada pela sucessão das populações, devido às variações de parâmetros, componentes mais ou menos acessíveis ao metabolismo a depender da via metabólica existente em diferentes bactérias, podendo estar relacionado ao co-metabolismo, em que um grupo de bactérias pode biodegradar parte do poluente, não utilizando este como fonte de carbono e energia, porém esse subproduto ser mineralizado por outro grupo de bactérias (GAYLARDE *et al.*, 2005).

O processo de biotransformação dos derivados do petróleo é regido por diversos gêneros de bactérias, esses microrganismos cujo papel é essencial no destino e degradação dos hidrocarbonetos nos ecossistemas, tais bactérias são denominadas como hidrocarbonoclasticas. Com o processo de adaptação ao ambiente contaminado com moléculas hidrofóbicas, muitas dessas bactérias são capazes de produzir biosurfactantes, permitindo que os hidrocarbonetos sejam

usados como fontes de carbono e energia (YALAOUI-GUELLAL *et al.*, 2020). De acordo com OBA *et al.* (2022), as hidrocarbonoclasticas investigadas em solo provenientes de refinaria artesanal na Nigéria, eram coliformes gram-negativos. Entre as espécies isoladas, continha: *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.* e *Proteus sp.*

Na biorremediação, o co-metabolismo é um fenômeno em que um poluente é parcialmente degradado sem servir como fonte nutritiva para o microrganismo. No entanto, o produto resultante do co-metabolismo pode ser usado como substrato por outra espécie microbiana, permitindo a mineralização do poluente. O co-metabolismo é relevante, pois é raro que uma única espécie de microrganismo possua todas as enzimas necessárias para a completa metabolização de um contaminante (GAYLARDE *et al.*, 2005). A biodegradação das frações pesadas dos derivados do petróleo pode ser estimulada pelo co-metabolismo, especialmente em misturas de diesel/biodiesel (REGINATTO *et al.*, 2012).

Em casos mais complexos de contaminação, os consórcios microbianos, devido à sua diversidade metabólica, são mais eficientes na degradação de substratos diversos, tornando o processo mais rápido e completo (KEBEDE *et al.*, 2021). Além disso, a troca de material genético entre microrganismos da mesma espécie ou não, especialmente via plasmídeos, dissemina enzimas capazes de degradar moléculas recalcitrantes no ambiente. Essas trocas genéticas podem gerar microrganismos aptos a degradarem diferentes poluentes (IVANOVA *et al.*, 2022; GAYLARDE *et al.*, 2005).

2.3.2 Vias metabólicas de biodegradação

O solo possui uma infinidade de microrganismos produtores de diversas enzimas, tais como oxirredutases, hidrolases, isomerases, liases e as ligases, em que cada uma delas possui sua função no bioma como um todo. Essas enzimas são responsáveis pela conversão de matéria orgânica em fonte de nutrição e energia aos microrganismos do solo. As enzimas mais importantes do solo são as desidrogenases, utilizadas como indicadores de presença e atividade microbiana no solo, pois todos os microrganismos vivos as possuem (CANUTO, 2012).

Sabe-se que desidrogenases ativas podem utilizar o $O_{2(g)}$ e outros compostos como aceptores de elétrons terminais, apesar de serem fortemente produzidas pelos

microrganismos anaeróbios. A atividade metabólica das enzimas desidrogenases (*dehydrogenase activity* – DHA, em inglês) refletem a capacidade metabólica do solo e sua atividade bioquímica pode ser considerada proporcional à biomassa dos microrganismos encontrados no solo, com exceção dos sistemas complexos em que os microrganismos são envolvidos na degradação de compostos orgânicos diversos (CANUTO, 2012).

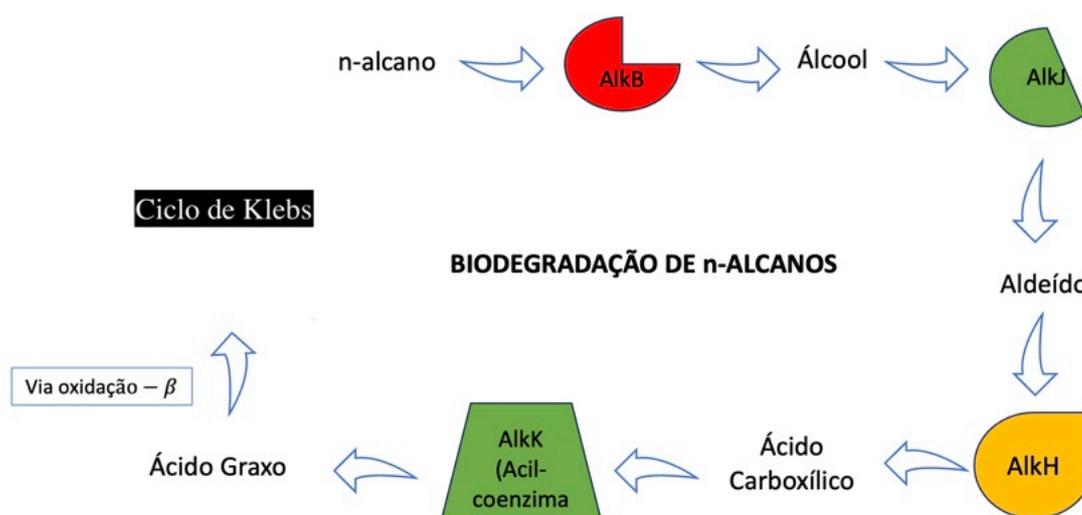
As atividades das DHA podem ser estimuladas por fatores que influenciam sua atividade bioquímica, entre eles são: i) umidade do solo – a disponibilidade de água afeta a atividade microbiana, as relações microbianas do meio e, conseqüentemente, suas atividades enzimáticas - (CANUTO, 2012); ii) oxigenação do solo, de acordo com Monticeli *et al.* (2018), a aeração do sistema é um fator primordial na biorremediação do solo contaminado com óleo diesel B5, para os tratamentos com atenuação natural, bioestimulação e bioestimulação com bioaumentação.

As bactérias do gênero *Pseudomonas*, em condição de aerobiose, iniciam a metabolização de uma molécula de hidrocarboneto utilizando o oxigênio como co-substrato nas reações de hidroxilação terminal ou subterminal (IVANOVA *et al.*, 2022). Grande parte dos derivados do petróleo pertencem à classe dos n-alcenos, que são moléculas pouco reativas, devido à baixa polaridade. Porém, em presença de oxigênio, os microrganismos podem ativá-las, por meio da oxidação dos grupos metil terminal ou subterminal, produzindo a partir desta reação, o álcool e a água (DA SILVA, 2010).

Um dos metabolismos mais utilizados para o entendimento da degradação dos n-alcenos é chamado via Alk. A via Alk é formada por um conjunto de enzimas: uma alceno hidroxilase transmembrana (AlkB), um álcool desidrogenase (AlkJ), um aldeído desidrogenase e uma acil-coenzima (AlkK), exposto na Figura 1 (DA SILVA, 2010). Nesta via, o n-alceno é oxidado a álcool pela AlkB, uma proteína de membrana integral, chamada também de alceno monoxigenase, que tem a finalidade de inserir um átomo de oxigênio molecular em ligações terminais carbono-hidrogênio de n-alcenos (LU *et al.*, 2021). A via aeróbica de metabolização aeróbica também pode utilizar as dioxigenases, incorporando dois átomos de oxigênio à molécula de alceno. A maioria dos microrganismos utilizam a enzima monoxigenase para oxidar os alcenos ao álcool correspondente, posteriormente oxidado a aldeído e a ácido graxo, seguindo para finalização da metabolização no ciclo de Krebs

através da oxidação β (KEBEDE *et al.*, 2021). A enzima rubredoxina solúvel AlkG, cuja redução ocorre pela enzima rubredoxina redutase AlkT, desempenha a função de doadora de elétrons para a AlkB (LU *et al.*, 2021). O álcool formado é convertido a aldeído, e então em um ácido graxo correspondente. A coenzima A ligada ao ácido graxo passa pela β -oxidação, formando a acetil-CoA (IVANOVA *et al.*, 2022).

Figura 1 - Esquema da via metabólica Alk em *Pseudomonas putina*



Fonte: Adaptado de Da Silva (2010)

O estudo taxonômico realizado por Garrido-Sanz *et al.* (2019), identificou enzimas responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos em gêneros de bactérias estudadas na degradação do óleo diesel. A proteína AlkB foi encontrada em *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Sphingobium* e *Aquabacterium*. Outra enzima alegada em seus estudos foi a LadA, uma flavoproteína monooxigenase, responsável por inserir um átomo de oxigênio em alcano de cadeia longa; esta proteína foi principalmente atribuída às *Pseudomonas*, *Cupriavidus* e *Sphingomonas*. A enzima AlkB é comumente encontrada em grande parte das bactérias, algumas espécies de bactérias Gram-negativas ou positivas podem possuir dois ou mais genes AlkB redundantes. Além disso, a proteína CYP153, responsável pela hidroxilação de alguns alcanos, foi observada nos gêneros *Parvibaculum*, *Sphingobium* e *Cupriavidus* (IQBAL *et al.*, 2019; GARRIDO-SANZ *et al.*, 2019).

Com base nos estudos realizados por Garrido-Sanz *et al.* (2019), os microrganismos responsáveis pela hidroxilação inicial dos alcanos são as

Pseudomonas, *Aquabacterium*, bactérias da família *Sphingomonadaceae* e *Achromobacter*, sendo que a enzima hidroxilase dos tipos AlkB, LadA e CYP15 são muito abundantes nas *Pseudomonas* e *Sphingomonadaceae*. Estes gêneros de bactérias podem realizar a oxidação terminal e subterminal, ou oxidação biterminal de diferentes hidrocarbonetos alcanos. Já a oxidação do HAPs é realizada pelas *Sphingomonadaceae*, fato evidenciado pela presença de naftaleno 1,2 - dioxigenases.

As vias metabólicas para a degradação aeróbia dos hidrocarbonetos aromáticos ocorrem por meio de algumas vias-chave que são intermediárias do ciclo de Krebs. A degradação do benzeno, tolueno, naftaleno, bifenil e outro HPAs, ocorre inicialmente a partir da clivagem do anel aromático, catalisadas pelas enzimas tipo RNHO (oxigenase não-ferro heme dependente) (IVANOVA *et al.*, 2022). Os hidrocarbonetos de alto peso molecular, contendo quatro ou mais anéis aromáticos, como o pireno, crisenos, fluoranteno, são mais difíceis de se serem biodegradados, do que os alcanos não ramificados e HPAs mais leves, como o naftaleno, fenantreno, fluoreno e antraceno (GARRIDO-SANZ *et al.*, 2019; KEBEDE *et al.*, 2021). Numa escala de compostos de maior facilidade de biorremediação para menor facilidade estão: hidrocarbonetos de n-alcanos, alcanos ramificados, aromáticos de baixo peso molecular, alto peso molecular de hidrocarbonetos aromáticos e asfaltenos (KEBEDE *et al.*, 2021).

Os compostos HPAs mais leves, geralmente são metabolizados inicialmente com a adição de oxigênio molecular no núcleo aromático, catalisado pela dioxigenase hidroxiladoras de anel. A partir deste passo, são formados os diidrodióis, que são desidrogenados, em seguida meta-clivados mediante a ação das dihidrodeol desidrogenase, com a formação de produtos de clivagem de anel que seguem outras vias metabólicas para conversão de aromáticos intermediários (GARRIDO-SANZ *et al.*, 2019).

A biodegradação do naftaleno, um dos compostos aromáticos encontrados no óleo diesel, é iniciada por meio da via metabólica intermediada pela enzima naftaleno 1,2-dioxigenase, a NahA. Esta enzima participa da quebra de alguns HPAs, tais como: antraceno, fenantreno e o fluoreto. A biodegradação destes compostos é iniciada pela hidroxilação do anel, formando intermediários como o catecol, gentisato e o protocatechuate, que após serem oxidados, seguem para as principais vias de degradação aromática (GARRIDO-SANZ *et al.*, 2019).

Os genes, de uma forma geral, codificam enzimas específicas para a degradação de alguns compostos de hidrocarbonetos. Alguns microrganismos possuem vias metabólicas capazes de digerir hidrocarbonetos alifáticos, enquanto outros, degradam aromáticos monoaromáticos e/ou poliaromáticos (SHARMA *et al.*, 2018).

Porém, dados os avanços nos estudos genéticos das bactérias, existem evidências de que algumas espécies de microrganismos são capazes de degradar simultaneamente algumas classes de hidrocarbonetos. Isso se deve ao fato de cepas oxidantes de hidrocarbonetos possuírem tanto genes que codificam enzimas da via AlkB como também enzimas da via xylE, via envolvida na degradação de hidrocarbonetos aromáticos (FRENCH *et al.*, 2020; IVANOVA *et al.*, 2022;). Os microrganismos que possuem a enzima dioxigenase para degradar hidrocarbonetos aromáticos, realizam a fissão de anel orto ou meta, cujos produtos intermediários desta fissão são metabolizados por meio do ciclo tricarbóxico, podendo ser totalmente mineralizado em CO_2 e H_2O (SHARMA *et al.*, 2018; KEBEDE *et al.*, 2021).

A temperatura influencia as atividades enzimáticas bacterianas, que possuem uma temperatura considerada ótima para a regulação. As propriedades químicas e físicas do poluente também são interferidas pela temperatura, com a diminuição desta, há aumento da viscosidade do poluente, por exemplo. Porém, há populações microbianas com condições distintas de metabolismos, como por exemplo, os psicrófilos: acima de 4 ou 7°C, mesófilos: ótima entre 20 e 40°C. Temperaturas muito altas podem diminuir a solubilidade do oxigênio, além de provocar desnaturação das enzimas responsáveis pelas vias metabólicas de degradação dos poluentes. A temperatura reportada como ideal para a biorremediação é entre 30 e 40°C (KEBEDE *et al.*, 2021).

2.3.3 Biodegradação

Quando a biodegradação dos compostos orgânicos ocorre de forma completa, tem-se o que se chama de mineralização. A mineralização é a transformação do composto orgânico em $CO_2(g)$ e H_2O (KEBEDE *et al.*, 2021). Uma das formas de se determinar a eficiência do processo de biorremediação é por meio da medida da respiração basal da microbiana e, de forma indireta, medir a biodegradação de um sistema em processo de biorremediação (MELLO *et al.*,

2007). A respiração basal é definida como todas as funções metabólicas que possuem como produto final o $CO_2(g)$ (SILVA *et al.*, 2007).

No Brasil, a quantificação da respiração basal da microbiota é padronizada pela norma brasileira NBR 14283 (ABNT, 1999). A vidraria utilizada para a captação e a quantificação do $CO_2(g)$ é o respirômetro de Bartha, cuja configuração se consiste em um sistema fechado, composto por dois compartimentos, interligados por meio de uma alça, como pode ser visto na Figura 2.

Figura 2 - Respirômetro de Bartha. A: Rolha de borracha; B: Compartimento para filtro de ascarita; C: Válvula; D: Rolha de borracha; E: Frasco de Erlenmeyer (250 mL); F: Amostra de solo; G: Tampa da cânula; H: Cânula (\varnothing entre 1 mm e 2mm), com canhão Luer; I- Braço lateral ($\varnothing \sim 40$ mm; H ~ 100 mm); J: Solução de KOH



Fonte: A Autora (2023)

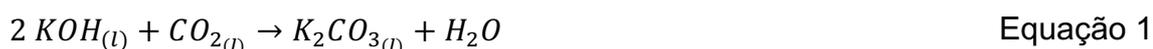
No compartimento, composto pelas partes A, B, C, D, E e F, ocorre a biodegradação do composto orgânico pelos microrganismos nativos ou não nativos, com a produção de $CO_2(g)$. O segundo compartimento, composto pelas partes G, H, I e J, o local em que o $CO_2(g)$ é produzido, é transferido, reagindo com a solução de $KOH(l)$ (MELLO *et al.*, 2007).

A quantificação do $CO_2(g)$ pode ser realizada através da titulação da solução de hidróxido de potássio $KOH(l)$ com solução de ácido clorídrico $HCl(l)$ (MELLO *et*

al., 2007). As soluções de $KOH_{(l)}$ e $HCl_{(l)}$, possuem molaridade de 0,2 N e 0,1 N, respectivamente, todas com a padronização de serem preparadas com água destilada descarbonatada (ABNT,1999).

Entretanto, a quantificação do $CO_{2(g)}$ pode ser realizada pelo método eletroquímico, por meio da medida da condutividade da solução de $KOH_{(l)}$. À medida que o $CO_{2(g)}$ é produzido pela microbiota degradante, este reage com o $KOH_{(l)}$, produzindo $K_2CO_{3(l)}$. Devido a proporcionalidade entre a condutividade e a concentração de eletrólitos, é viável estimar a quantidade de $CO_{2(g)}$ produzida pelos microrganismos contidos no sistema (STROTMANN *et al.*, 2004; MAZZEO *et al.*, 2020).

A reação que ocorre entre $KOH_{(l)}$ e o $CO_{2(g)}$ está descrita pela Equação 1



A medida da condutividade para a quantificação do gás carbônico produzido é possível por meio da construção de uma curva analítica, com diversos pontos de concentração e, conseqüentemente, valores de condutividade (MAZZEO *et al.*, 2020).

Para o cálculo da biodegradação do poluente, admite-se que 50% do carbono biodegradado (C_b) são transformados em $CO_{2(g)}$, portanto, o gás carbônico quantificado no ensaio respirométrica (CO_{2b}) representa 50% de todo o carbono biodegradado, e que os 50% restante, se transformam em húmus e biomassa, Equação 2. Para o cálculo da eficiência de biodegradação (EB), faz-se a divisão do total de carbono biodegradado na amostra estudada pela massa de carbono orgânico na amostra inicial (C_o), Equação 3 (ABNT,1999).

$$C_b = 2 \times CO_{2b} \quad \text{Equação 2}$$

$$EB (\%) = C_b / C_o \quad \text{Equação 3}$$

2.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME MICROBIANO

Os microrganismos empregam várias estratégias para aumentar a disponibilidade de poluentes hidrofóbicos, como a formação de biofilme (ZAHED *et al.*, 2011). Os biofilmes são comunidades bacterianas aderidas em superfície sólida ou semi-sólida, em que a principal característica é a produção de matriz exopolimérica. A formação de exopolímeros ocorre somente com a disponibilidade de fonte suficiente de compostos orgânicos. A fonte de nutriente mais importante para a formação do biofilme é o carbono, além dos macros e micronutrientes, como nitrogênio e fosfato, obtidos a partir da fonte de carbono ou do meio (DE MELO *et al.*, 2008).

A formação do biofilme é composta por algumas etapas, que geralmente envolvem um ou mais espécies microbianas. Inicialmente, ocorre a fixação das células microbianas sobre o substrato, formando o que se chama de filme condicionante. Ocorre a produção da matriz extracelular, composta pelas substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Há a adesão, crescimento e agregação dos microrganismos disponíveis por interação por receptores, em que cada novo microrganismos incorporados ao biofilme, pode proliferar pela divisão celular (DE MELO *et al.*, 2008; MISHRA *et al.*, 2022).

A utilização de microrganismos capazes de formar biofilme na estratégia de biorremediação de ambientes contaminados pode ser bem-sucedida. Com a formação e perpetuação do biofilme, há formação de uma biobarreira constituída pela biomassa microbiana, esta massa obstruí os caminhos de fluxo do espaço poroso, reduzindo assim a condutividade hidráulica e a transferência de massa. Este entupimento dos caminhos permeáveis pode ser utilizado como maneira de prevenir a migração dos contaminantes (JAMES *et al.*, 2000; CHEN-CHARPENTIER *et al.*, 2007). Em condições em que o sistema possui nutrientes disponíveis, a consolidação de um biofilme pode reduzir substancialmente a condutividade hidráulica de um meio poroso (CHEN-CHARPENTIER *et al.*, 2007).

A formação do biofilme microbiano proporciona condições favoráveis de sobrevivência e crescimento, formado por uma espécie ou grupo de microrganismos. Devido à sinergia entre as comunidades formadoras do biofilme, há um aumento da bioacessibilidade das fontes de carbono provenientes dos hidrocarbonetos poluentes. A poluição resultante de hidrocarbonetos é caracterizada por compostos

hidrofóbicos, os quais possuem uma baixa biodisponibilidade. O biofilme permite a adaptação da comunidade microbiana a essa condição, pois com o aumento da biomassa microbiana, há um aumento da bioadsorção, reduzindo a imobilização do contaminante (KEBEDE *et al.*, 2021).

Devido a matriz exopolimérica ser composta por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, lipídios e substâncias húmicas, esta possui uma regulação da hidrofobicidade, biodegradabilidade e das propriedades adsorptivas do biofilme. Estas regulações proporcionam ligação superficial entre os microrganismos e os substratos, exercendo regulação da transferência de energia e produção de resíduos; atua na osmolaridade do biofilme, temperatura e na adsorção de metais e compostos orgânicos (KEBEDE *et al.*, 2021).

O biofilme pode atuar como barreiras protetoras das células microbianas contra a toxicidade dos poluentes. Devido à imobilização das células microbianas por/entre a matriz do biofilme, o substrato é aproximado, com conseqüente aumento das atividades metabólicas dos microrganismos (MISHRA *et al.*, 2022). O contaminante tende a se difundir para o interior do biofilme e, posteriormente, para dentro da célula microbiana, onde ocorre a metabolização. Os processos de biorremediação baseados em biofilmes possuem vantagem em relação ao processo de biomassa livre. A formação do biofilme proporciona aumento da adaptação e sobrevivência dos microrganismos que compõem determinado sistema, além de proporcionar aumento da população capaz de biodegradar (AZEVEDO *et al.*, 2012; YADAV *et al.*, 2020).

2.5 GOMA XANTANA

Os derivados do petróleo são moderadamente solúveis em água, e essa solubilidade depende das características da molécula, como tamanho molecular, havendo diminuição da solubilidade com o aumento do tamanho da molécula. Quanto maior o peso molecular, mais facilmente o poluente fica adsorvido ao solo, tornando-se inacessível como fonte de carbono e energia para os microrganismos (GONZÁLEZ *et al.*, 2010), sendo esse o caso dos poluentes hidrocarbonetos (KEBEDE *et al.*, 2021).

A biodisponibilidade do poluente no processo de biorremediação é uma das características mais importante para o sucesso da descontaminação do meio

ambiente. Para viabilizar a remediação microbiana, o uso de dispersantes químicos ou de surfactantes microbianos pode ser um artifício para o sucesso do processo de atenuação dos poluentes no meio ambiente. A aplicação de surfactante na remediação de poluentes atua na biodisponibilidade do hidrocarboneto por meio do aumento da solubilização e da dessorção do poluente da fase sólida, aumentando a transferência de massa e, conseqüentemente, a biodegradação (GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Muitas bactérias, leveduras e fungos filamentosos são capazes de produzir metabólitos secundários com propriedades surfactantes (TONINI *et al.*, 2010). Esses metabólitos possuem propriedade anfipática, ou seja, na mesma molécula há características hidrofílicas e hidrofóbicas. A molécula de surfactante altera a disponibilidade de uma segunda molécula, no caso um poluente hidrofóbico, que é o caso dos hidrocarbonetos; o surfactante possui características de detergência, emulsificação, solubilização, diminuição da tensão superficial e interfacial e dispersão de fases (TONINI *et al.*, 2010; TORAL *et al.*, 2018; KEBEDE *et al.*, 2021). Com a diminuição da tensão e alteração da hidrofobicidade, a área superficial da molécula a ser degradada aumenta, tornando a molécula um substrato disponível à adsorção e metabolismos dos microrganismos, aumentando conseqüentemente a degradação microbiana (TONINI *et al.*, 2010; KEBEDE *et al.*, 2021).

O uso de surfactantes pode ser uma alternativa viável para aumentar a biodisponibilidade do poluente em locais de temperatura muito baixas, devido à diminuição da viscosidade do contaminante, favorecendo a biodisponibilidade aos microrganismos (KEBEDE *et al.*, 2021).

Os exopolissacarídeos produzidos pelas bactérias podem ser utilizados como bioemulsificantes, substituindo os surfactantes sintéticos. À base de polissacarídeos, podem oferecer vantagens sobre os emulsificantes sintéticos, sendo menos tóxicos, apesar de haver exemplares tão tóxicos quanto os sintéticos; possuem melhor degradação, maior compatibilidade com o meio ambiente e mais seletividade. Além disso, podem permanecer eficazes mesmo em condições extremas de pH, temperatura e salinidade (STELTING *et al.*, 2012). Biossurfactantes de fontes naturais podem ser uma alternativa viável à técnica de biorremediação, pois minimiza a chance de ocorrer contaminação secundária (KEBEDE *et al.*, 2021). Zhang *et al.* (1997) avaliaram o uso de dois biossurfactantes de origem microbiana, o Mono-Rhamnolipídio e o Di-Rhamnolipídio, produzidos por *Pseudomonas*

aeruginosa, na biodegradação do fenantreno, um hidrocarboneto aromático policíclico. Os dois biossurfactantes aumentaram a solubilidade e a taxa de biodegradação do composto, demonstrando que a utilização do surfactante de maneiras que tornam o poluente mais disponível ao metabolismo microbiano facilita a remediação do local de interesse.

Muitos microrganismos cultivados em hidrocarbonetos sintetizam biossurfactantes, mas alguns também podem ser produzidos em substâncias solúveis como glicose, glicerol e etanol. As moléculas de biossurfactantes podem ser localizadas no interior das células microbianas, serem secretadas pelos microrganismos ou ficarem aderidas à superfície dos microrganismos que as sintetizaram (TONINI *et al.*, 2010). As moléculas de surfactantes podem ter a superfície ativa extracelularmente, facilitando a emulsão e absorção do contaminante (KEBEDE *et al.*, 2021).

Os biossurfactantes em sua maioria são neutros ou carregados negativamente, classificados por sua composição química, em: glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos poliméricos. A produção de biossurfactante geralmente é baixa, e dependendo da especificidade das enzimas, eles podem competir com os hidrocarbonetos como substrato de preferência (GONZÁLEZ *et al.*, 2010). Os biossurfactantes podem ser produzidos por diversos microrganismos, como os *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.*, *Enterobacter sp.*, *Burkholderia sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Micrococcus sp.*, *Rhodococcus sp.* e algumas espécies halófilas (KEBEDE *et al.*, 2021).

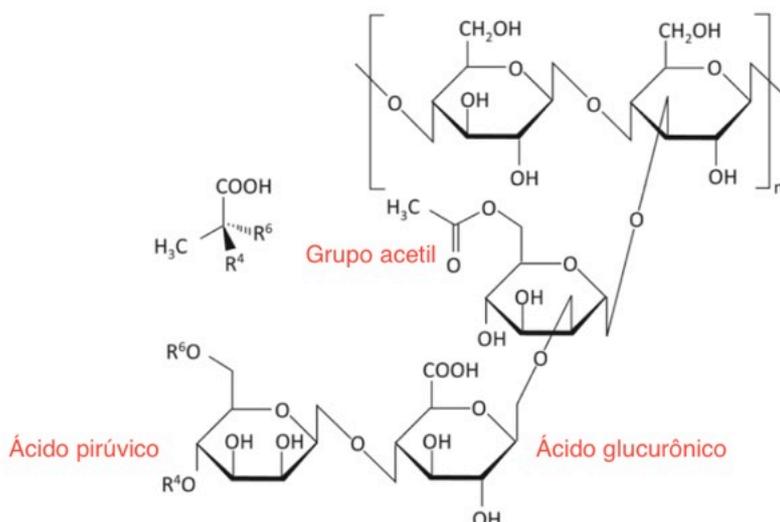
A emulsão do poluente por meio da adição do surfactante ocorre devido à diminuição da tensão superficial entre o poluente e a fase aquosa, que gera um aumento na superfície de contato do poluente, melhorando o transporte de massa para a fase aquosa. A emulsificação pode trazer estímulo à atividade metabólica das células microbianas, facilitando o transporte do substrato orgânico até elas (GONZÁLEZ *et al.*, 2010; TONINI *et al.*, 2010).

Ao entrar em contato com o poluente, o surfactante forma micelas, que são agregados entre as moléculas de surfactante com as moléculas do poluente, onde a parte interior é composta pela porção hidrofóbica (GONZÁLEZ *et al.*, 2010). A concentração mínima na qual os monômeros de surfactante começam a se reunir em agregados coloidais ordenados é denominada Concentração Micelar Crítica – CMC (ZHANG *et al.*, 1997). Os biossurfactante tendem a formar micelas em solução

aquosa que excedem a concentração micelar crítica e, para exibir uma menor tensão superficial, aumentam a porção hidrofóbica, com consequente aumento da solubilidade do poluente hidrocarboneto (KEBEDE *et al.*, 2021).

A goma xantana (GX) é um exopolissacídeo, produto da fermentação das bactérias Gram-negativas *Xanthomonas campestris*. É um biopolímero de alto peso molecular, podendo variar de $1,0 \cdot 10^5$ a $2,0 \cdot 10^6$ g/mol, sendo sua estrutura molecular formada por muitos grupos carboxílicos e hidroxilas, com unidades repetidas de celobiose compondo a cadeia dorsal da molécula, contendo cadeias laterais compostas por trissacarídeos. É um poliânion, pois também possui unidade aniônica, com presença de ácido pirúvico, ácido glucurônico e grupo acetil em sua estrutura molecular, demonstrada na Figura 3 (MAUGERI *et al.*, 2019). Possui alta estabilidade em ampla faixa de pH, entre 2 e 11. Seu comportamento reológico é dependente de sua estrutura molecular ramificada e seu alto peso molecular, e existe uma grande vantagem em formar hidrogéis, pois devido à existência de grupos hidrofílicos ligados à cadeia dorsal polimérica da estrutura da GX, os hidrogéis absorvem grandes quantidades de água. Suas ligações covalentes não típicas entre os monômeros de açúcar da estrutura, fazem com que poucos microrganismos sejam capazes de degradá-la, com os organismos capazes de degradar isolados do solo ou de lodo de esgoto (BORGES *et al.*, 2008; ELELLA *et al.*, 2021; DZIONEK *et al.*, 2022).

Figura 3 - Estrutura molecular goma xantana



Fonte: Adaptado de Maugeri *et al.* (2019)

A goma xantana é solúvel em água fria ou quente, possui alta viscosidade mesmo em baixas concentrações. Sua viscosidade é estável mesmo com a variação de pH, temperatura e força iônica. Há conhecimento sobre a resistência ao calor, mesmo elevando-a a altas temperaturas, permanece sem alteração de viscosidade. Além disso, a presença de sais pode incrementar a viscosidade da goma (BORGES *et al.*, 2008).

A GX possui diversos usos na indústria (alimentícia, farmacêutica), dentre eles o de estabilizante, espessante e emulsificante devido ao aumento da viscosidade, mesmo em baixa concentração, e sua demanda em áreas como a indústria do petróleo vem aumentando nos últimos anos (BORGES *et al.*, 2008). Na indústria de petróleo, é estudada como surfactante benéfico na recuperação aprimorada de petróleo, devido ao seu espessamento estável, biodegradabilidade e, com resultados animadores na mobilidade do óleo extraído, assim como redução da permeabilidade relativa da água no reservatório, auxiliando no deslocamento do óleo do reservatório (MACHALE *et al.*, 2019; ELELLA *et al.*, 2021; SUJATHA *et al.*, 2021)

Zhong *et al.* (2015) avaliaram o poder de emulsificação da xantana sobre o óleo vegetal utilizado como substrato promissor para a biorremediação de solventes clorados e HPAs em água subterrânea, usando-a como fluido de diluição de cisalhamento (STF). A injeção do óleo emulsionado com goma xantana obteve melhora na distribuição, comparada à injeção de óleo puro. A suspensão de xantana com óleo vegetal foi considerada estável, sem separação de fases e com propriedades significativas de cisalhamento, demonstrando ser promissora na emulsão de óleo utilizado como substrato em biorremediação de longa duração em aquíferos.

A goma xantana também pode ser utilizada para imobilizar microrganismos degradadores de xenobióticos. A introdução de uma nova população de microrganismos capazes de biorremediar um ambiente pode gerar estresses bióticos e abióticos a essas novas cepas, e o uso do encapsulamento pode garantir a sobrevivência desses microrganismos em um novo *hábitat*. Dzionek *et al.* (2021) utilizaram a goma xantana para aprisionar células bacterianas capazes de degradar naproxeno. Para a melhora de propriedades mecânicas, usaram polidopamina para formar um compósito junto com a goma. Na degradação do naproxeno, foi observada uma taxa de 1 mg/L no tempo de incubação de 14 dias, além da diminuição da Demanda Química de Oxigênio (DQO).

Alguns biopolímeros são conhecidos por melhorar as propriedades do solo, tais como a resistência à erosão, o aumento da capacidade de retenção de água no solo, a proteção da vegetação, e características mecânicas, especialmente a coesão (BERKANE *et al.*, 2022). Solos arenosos são normalmente tratados com biopolímeros, tais como a goma xantana, com o objetivo de melhorar as propriedades de compressão, rigidez e coesão, aumentando-as. Essas melhoras são resultado da interação das porções aniônicas dos biopolímeros com as partículas do solo, ocorrendo o surgimento de ligação e interação entre elas (CHANG *et al.*, 2015; MENDONÇA *et al.*, 2020). Em solos arenosos, a goma xantana é utilizada para reduzir a permeabilidade devido ao preenchimento de água nos poros e, aumentar a coesão devido ao aumento da capacidade de retenção de água (SULAIMAN *et al.*, 2022).

O aporte de matéria orgânica no solo contaminado pode estimular o crescimento microbiano, fazendo com que haja um estímulo às atividades metabólicas responsáveis pela degradação. O aporte da goma xantana no ambiente contaminado com hidrocarbonetos pode ter o papel de mais uma fonte de carbono disponível aos microrganismos, favorecendo a degradação do contaminante, sem tornar o sistema tóxico (CURIEL-ALEGRE *et al.*, 2022). O aporte maior de carbono proveniente do poluente, poderia tornar o ambiente de interesse extremamente tóxico aos microrganismos (KEBEDE *et al.*, 2021). A estratégia de compostar solos poluídos, ou seja, levar um aporte maior de carbono disponível ao crescimento bacteriano, é um método economicamente viável, que gera bons resultados à biorremediação do solo (CURIEL-ALEGRE *et al.*, 2022).

2.6 SOLO

A dinâmica do solo permite a existência de um grande reservatório biológico, onde há interrelações entre os organismos existentes, sendo essas relações essenciais ao equilíbrio da natureza. O solo é uma estrutura heterogênea e descontínua, que possibilita a ocorrência de micro *habitats* que diferem em características físico-químicas. As diferentes porções do solo, como areia, argila e salite, exercem função de ancoradores dos microrganismos presentes no solo, assim como proporcionam condições de sobrevivência para milhares de microrganismos, com distintos metabolismos (CARDOSO *et al.*, 2016).

As características do solo influenciam no processo de biorremediação dos poluentes. O tipo de solo, textura, capacidade de retenção de água, teor de nutrientes, oxigenação e pH são características físico-químicas que devem ser levadas em consideração na estratégia escolhida na remediação de um solo contaminado, pois dependendo das condições encontradas no solo, o contaminante pode sofrer uma dinâmica de movimento e estabilidade química que inibe o crescimento bacteriano, por exemplo (KEBEDE *et al.*, 2021).

A textura do solo possui influência na taxa de biorremediação, pois solos cujas partículas são muito finas, como solo argilosos, tendem a reter os poluentes na superfície, prejudicando a biodisponibilidade (KEBEDE *et al.*, 2021). Kim *et al.* (2022) obtiveram resultados melhores de biodegradação do tipo *Landfarming* em solo arenoso, em relação ao solo argiloso. O solo argiloso é composto por partículas finas, formando facilmente agregados em contato com a água, impedindo a homogeneização do poluente, apresentando baixa permeabilidade, o que dificulta a difusão do oxigênio, que é um dos principais fatores para que a degradação aeróbica ocorra (ANDRADE *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2022). Dependendo da natureza do poluente, o tipo de solo pode favorecer que a molécula do composto poluente seja aderida à matriz do solo, impedindo o acesso da microbiota (NADIM *et al.*, 2000). Há evidências que solos argilosos possuem carbono orgânico em elevada quantidade, tendo uma dinâmica bem diferente de outros solos no que se trata do ciclo do carbono entrar em equilíbrio. As moléculas de carbono orgânico presentes no solo podem ser levadas a um processo de recalcitrização, devido à natureza aromática (NAYAL *et al.*, 2019). Já em solos arenosos, o poluente é drenado para através das camadas do solo, tornando o acesso dos microrganismos facilitado (KEBEDE *et al.*, 2021).

O solo é dividido em porções longitudinais, a porção superficial, composta por solo superficial, zona vadosa e zona insaturada do solo, é uma região de alta concentração de matéria orgânica, conseqüentemente, um maior número de microrganismos candidatos à biorremediação. À medida que se aprofunda às camadas do solo, há diminuição da população microbiana devido à diminuição dos nutrientes e oxigenação (KEBEDE *et al.*, 2021).

Alguns mecanismos são responsáveis pela interação existente entre os microrganismos presente no solo e as partículas deste. Dentre os mecanismos, está a excreção de exopolissacarídeos, os quais interagem com as partículas de argila do

solo, promovendo adesão das células à matriz do solo (CARDOSO *et al.*, 2016). A segunda interação existente entre as partículas do solo e a microbiota presente, é através da formação de biofilme, que é formado devido à presença de comunidades complexas, com acesso a nutrientes e possibilidade de proteção contra agentes que possam destruir o biofilme, como exemplo, variação de osmolaridade e temperatura. Essas características aumentam a possibilidade de adaptação da microbiota a diferentes condições de estresse, como por exemplo, a contaminação por poluentes (KEBEDE *et al.*, 2021).

2.6.1 Estruturas do solo

O solo é composto por três fases, a fase líquida, gasosa e a sólida. A fase líquida se resume a uma solução que contém nutrientes. A fase gasosa é composta pelo ar, contendo oxigênio e dióxido de carbono. E a fase sólida, chamada de matriz do solo, composta por minerais e matéria orgânica, fase que tem seus poros ocupados pelas fases líquida e gasosa (MOTTA *et al.*, 2007; NOVÁK *et al.*, 2019). As proporções destas três fases variam e dependem das condições climáticas às quais o solo é submetido (MOTTA *et al.*, 2007).

Segundo Novák *et al.* (2019), a capacidade do solo em conduzir as fases líquidas e gasosas depende da característica da porosidade deste solo. A porosidade do solo depende do arranjo estrutural e dos constituintes deste solo. O solo é um meio poroso, em que os poros são interconectados. Dependendo da composição da matriz, as forças capilares são maiores ou menores, neste caso fazendo com que a fase líquida se mova pela força da gravidade. Por outro lado, apesar da força da gravidade ser maior do que a força capilar, a gravidade não retira a umidade contida nos microporos da matriz do solo, condição ideal para crescimento das plantas e microbiota (MOTTA *et al.*, 2007).

A fase gasosa, também importante na dinâmica do solo, preenche os macroporos, garantindo a oxigenação do sistema. Com a evaporação através da superfície, a fase líquida vai desocupando os microporos, fazendo com que a fase gasosa também os ocupe (MOTTA *et al.*, 2007).

A fase sólida do solo é composta por fragmentos de rocha e minerais e matéria orgânica. Os minerais determinam propriedades e características físico-químicas do solo. Os minerais são divididos em frações de acordo com seu

diâmetro: areia, silte e argila. A fase orgânica é responsável por propriedades do solo e nutrientes que são indispensáveis à dinâmica das plantas e microrganismos. Composta por húmus, são reservas de nitrogênio e enxofre, que atuam como porção de cargas negativas, diminuindo a toxicidade de metais. A quantidade de matéria orgânica varia com o clima, vegetação, textura, umidade e as condições as quais o solo está exposto (MOTTA *et al.*, 2007).

2.6.2 Características do solo

O processo que dá origem ao solo é conhecido como pedogênese. É esse processo que determina o tipo do solo e suas propriedades. A matéria inicial do processo de transformação é chamada de material parental, que ao passar pelos intemperismos, se transformam nos diferentes tipos de solo, com características distintas. O clima é um fator pedogênico, pois a temperatura e água disponível influenciam no processo de transformação do material inicial (NOVÁK *et al.*, 2019). O relevo e a presença de microrganismos são atuantes nos processos que dão origem ao solo (MOTTA *et al.*, 2007).

O material inicial da pedogênese pode ser composto por plantas, organismos e as rochas. Os primeiros habitantes do substrato são as bactérias, líquens e a vegetação. Os processos que dão origem ao solo podem ser: intemperismo físico e químico das rochas, porque além da quebra, o material também sofre alteração da composição química, e essa porção é responsável pelos minerais do solo. A humificação é o processo responsável pela transformação da matéria orgânica morta em húmus, a qual é essencial para estrutura do solo.

Os materiais de origem dos solos podem ser minerais, provenientes das rochas e sedimentos ou material orgânico, advindos de resíduos vegetais. Dependendo do material de origem, o solo pode ser classificado como arenoso, argiloso, férteis ou não férteis (MOTTA *et al.*, 2007). A classificação dos solos é feita com relação à quantidade de texturas e a proporção dessas texturas encontradas no solo. As frações granulométricas são definidas conforme o diâmetro das frações. No Quadro 1 estão expostas as classificações do solo quanto os diâmetros.

Quadro 1 - Frações granulométricas do solo

Fração granulométrica	Diâmetro das partículas do solo
Matacão	Maiores de 20 cm
Calhau	Entre 2 e 20 cm
Cascalho	Entre 2 mm e 2 cm
Areia	Entre 0,05 e 2 mm
Silte	Entre 0,02 e 0,05 mm
Argila	Menores que 0,002 mm

Fonte: Adaptado de Motta *et al.* (2023)

A textura dos solos é determinada pelas frações granulométricas contidas, é classificada quanto à quantidade de areia, silte e argila contida no solo. O Quadro 2 contém os grupos de texturas do solo.

Quadro 2 - Grupos de texturas do solo

Textura	Definição
Muito argilosa	>60% de argila
Argilosa	35% < argila < 60%
Siltosa	Argila < 35% e areia < 15%
Média	Argila < 35% e areia > 15%
Arenosa	Areia > 70% e sem argila Ou areia \geq 75% e argila < 5% Ou areia \geq 80% e argila < 10% Ou areia \geq 85% e argila < 15%

Fonte: Adaptado de Motta *et al.* (2023)

A textura do solo é relacionada com a composição mecânica do solo. A massa relativa entre as partículas de diferentes tamanhos, define a textura do solo (NOVÁK *et al.*, 2019).

Muitas características são definidas de acordo com a textura do solo. Solos de texturas finas, argilosa ou muito argilosa, normalmente possuem maior porosidade total, característica que possibilita em uma maior capacidade de retenção de água. Além disso, a porosidade é uma característica importante na

aeração, saída do gás carbônico e outros gases produzidos pelas plantas e microrganismos (MOTTA *et al.*, 2023). A grande área superficial específica dos minerais argilosos possui partículas carregadas negativamente, fazendo com que água seja adsorvida mais facilmente ao microporos. A característica mais notória do solo argiloso é o inchamento quando adsorvem água (NOVÁK *et al.*, 2019).

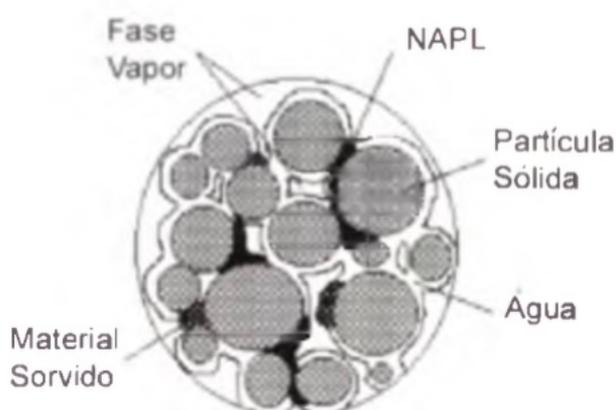
O arranjo das estruturas primárias do solo forma as estruturas secundárias, que dão origem à estrutura do solo. As formas dos elementos secundários podem ser granulares, blocos, prismáticos e laminares (MOTTA *et al.*, 2023).

As propriedades químicas dos solos dependem diretamente da composição mineralógica, que por sua vez, determina a textura do solo. As frações granulométricas areia e silte, normalmente são partículas de quartzo. Já solos argilosos, contém partículas de aluminossilicatos, como caulinita, vermiculita e esmectita, com diâmetros nanométricos (MOTTA *et al.*, 2023).

2.6.3 Distribuição do poluente no solo

Geralmente as contaminações do solo ocorrem com hidrocarbonetos na fase líquida, quando este entra em contato com o solo, formando o que se denomina líquido de fase não aquosa – NAPL (*non aqueous phase liquid*), na Figura 4 (AZEVEDO *et al.*, 2008). O NAPL é a representação da dissolução de um composto orgânico na fase aquosa do solo, dissolvido na fase vapor, sorvido nas partículas sólidas ou matéria orgânica (DE MELO *et al.*, 2008).

Figura 4 - Distribuição do contaminante no solo



Fonte: Azevedo *et al.* (2023)

Quando um contaminante entra em contato com o solo, o NAPL é formado, havendo difusão gravimétrica e espalhamento lateral, devido à heterogeneidade do solo e suas forças capilares. Uma parte do NAPL pode reagir quimicamente com as partículas do solo, ou ficar aderida aos poros, tornando essa fração de contaminante bioindisponível (BAISEIRO-ROMERO *et al.*, 2018).

O percurso que o NAPL faz na matriz do solo varia conforme as condições físico-químicas do solo (pH, umidade, teor de matéria orgânica, teor de argila, porosidade), bem como as características do contaminante (composição, polaridade, hidrofobicidade, solubilidade, volatilidade, entre outros) e volume de contaminação (BAISEIRO-ROMERO *et al.*, 2018).

As propriedades do NAPL são afetadas com o tempo, processos de intemperismo alteram as características do poluente devido à transferência de massa ou partição entre as fases presentes no sistema solo-poluente (sólido, líquido (NAPL), gás e fração de contaminante adsorvido). Alguns hidrocarbonetos mais leves, como os BTEX podem se dissolver em água, se aderindo aos poros do solo, ou sofrendo lixiviação, com consequente contaminação do lençol freático. Os fenômenos físicos envolvidos no transporte de poluentes dissolvidos em meio aos poros insaturados do solo são: advecção, difusão e dispersão. O transporte do poluente é orientado pela advecção; com a difusão, o poluente é espalhado, formando um gradiente de concentração, de regiões de mais alta concentração, para mais baixa concentração, e a dispersão é realizada pelo movimento não uniforme da água nos poros do solo, (BAISEIRO-ROMERO *et al.*, 2018).

2.7 CORROSÃO E BIOCORROSÃO

A corrosão é um fenômeno que ocorre nos materiais, geralmente metálicos, que por ação química ou eletroquímica do meio em que se encontram, se deterioram. A deterioração causada por reações físico-químicas entre o material e o meio é indesejável e prejudicial, pois pode haver alteração química e estrutural, deixando o material inadequado ao uso (ROBERGE, 2019; GENTIL; CARVALHO, 2022).

Segundo Gentil e Carvalho (2022), a corrosão é um processo espontâneo e, devido a isso, muitos materiais estão constantemente sendo afetados, de modo que a durabilidade e o desempenho são comprometidos. A corrosão acomete diversos materiais, em diversos ambientes, dentre eles: meios de transportes; estruturas

metálicas enterradas, como oleodutos, gasodutos, cabos de comunicação e de energia; estruturas metálicas sobre o solo ou aéreas; equipamentos eletrônicos e equipamentos como reatores, trocadores de calor e caldeiras.

A corrosão de oleodutos e gasodutos não revestidos pode ocorrer a partir do dano local da camada passiva por fatores estimulantes da corrosão do solo. Fatores mecânicos ou fatores externos podem causar corrosão por fenda, localizada, por pite etc. Os diversos tipos de corrosão podem gerar furos ou fendas. Já a corrosão galvânica gera perda de seções inteiras. Devido às cargas de tração e vários processos corrosivos, as tubulações enterradas podem sofrer corrosão sob tensão, gerando fissuras, ocorrendo fraturas catastróficas (WASIM *et al.*, 2022).

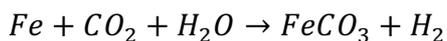
Dentre os parâmetros operacionais inerentes aos dispositivos subterrâneos, aqueles que exercem maior influência sobre o processo corrosivo do solo consistem em: as características climáticas, a aplicação de agentes fertilizantes, a introdução de resíduos industriais, a profundidade de inserção do material, a variabilidade da aeração, o contato bimetálico propenso à formação de pares galvânicos e a ocorrência de eletrólise no material metálico induzida por correntes de fuga. (SERRA, 2014; GENTIL; CARVALHO, 2022). Alguns parâmetros podem ser utilizados para a avaliação da corrosividade do solo, entre eles: a precipitação da região a qual o solo se encontra, a temperatura, a distribuição da umidade, as propriedades físico-químicas do solo, a resistividade e o pH (KIM *et al.*, 2021).

A depender da característica do solo, estrutura e composição química, a corrosão externa de tubulações pode ser favorecida. Em solos, cuja drenagem seja baixa, como solo argiloso ou pântanos, pode haver processo corrosivo severo devido ao encolhimento do solo, desencadeando uma grande aeração diferencial e um aumento da condutividade elétrica devido ao acúmulo de sais. Além disso, solos argilosos possuem baixa difusão de oxigênio para a superfície da tubulação, limitando a despolarização catódica em solos aeróbios (LIU *et al.*, 2020). Segundo Kim *et al.* (2021), há relação da corrosividade do solo com a o tamanho das partículas, em que a taxa de corrosão aumenta com a diminuição do diâmetro das partículas do solo. O pH do meio no qual o material está enterrado interfere diretamente no grau de dessas estruturas. Os solos que possuem pH na faixa entre 6 e 8, podem ser mais corrosivos do que solos com pH alcalino (LIU *et al.*, 2020).

Fatores como aeração, espessura da camada de solo e umidade possuem influência na corrosividade exercida pelo solo. Dados confirmam que, com o aumento da umidade do solo, a condutividade elétrica também é aumentada, fazendo com que processos corrosivos sejam desencadeados nas estruturas metálicas. A presença de gases na matriz do solo pode desencadear processos corrosivos, como no caso da corrosão por oxigênio, na presença de um eletrólito. Outro gás muito encontrado no solo, é CO_2 , com a mineralização dos compostos orgânicos pelos microrganismos ou por decaimento, são produzidos água e gás carbônico, em que o CO_2 gera uma diminuição do pH eletrolítico, desencadeando processo corrosivo por CO_2 (LIU *et al.*, 2020). Porém, em temperatura ambiente, o gás carbônico não costuma ser corrosivo aos metais, apesar de que em presença de água, forme o ácido carbônico H_2CO_3 , um ácido fraco, que ao reagir com alguns metais, como zincados, produz o carbonato básico de zinco, que por ser insolúvel, tem o papel protetivo à superfície metálica (GENTIL; CARVALHO, 2022).

Apesar do ácido carbônico não possuir um caráter tão corrosivo quanto o oxigênio, a presença do gás CO_2 , devido à diminuição do pH, pode desencadear corrosão por meio da formação de pites na estrutura metálica (FRAUCHES-SANTOS *et al.*, 2014). Devido à redução da alcalinidade do meio, há a desestabilização das camadas passivadoras do metal, podendo gerar reações de corrosão (CÂNDIDO *et al.*, 2020). Contudo, de acordo com Lui *et al.* (2020), a taxa de corrosão do aço X53 enterrado sob o solo, a uma mesma espessura, e com difusão de $N_{2(g)}$, ar atmosférico e 5% de $CO_{2(g)}/N_{2(g)}$, é de 0,0006 mm/ano, 0,040 mm/ano e 0,028 mm/ano, respectivamente. Estes resultados indicaram que a corrosão por oxigênio é mais severa do que a corrosão provocada pela difusão do $CO_{2(g)}$. Além da evidência da corrosão ser maior em ambiente aeróbio, a velocidade da corrosão também se mostrou maior.

O mecanismo regente da corrosão induzida pelo $CO_{2(g)}$, conhecido como *sweet corrosion* se dá principalmente em reservatórios e oleodutos de petróleo e gás. Em razão do gás carbônico ser solúvel em água e salmoura, ocorre desencadeamento da corrosão. A reação eletroquímica geral é representada pela Equação 4 a seguir, em que há dissolução anódica do ferro e evolução catódica do hidrogênio (ASKARI *et al.*, 2019).



Equação 4

Dentro dos mecanismos da corrosão induzida por gás carbônico, há diferentes caminhos para a perda material do metal ocorrer, entre elas: corrosão geral ou corrosão localizada, neste caso, corrosão por *pites*, corrosão pontual em formato de depressão escalonada, denominada por ataque de mesa, do inglês, *mesa attack*; e corrosão localizada induzida pelo fluxo. A erosão causada pela corrosão induzida por $CO_{2(g)}$ pode possuir marcas de ondulação, pegadas de cavalo, caudas de cometas e pegadas de dinossauros (ASKARI *et al.*, 2019).

A perda de material na corrosão geral é resultado, principalmente, da dissolução anódica do ferro, em que a parede tubular perde espessura. Já as perdas de material metálico localizada por *pites*, em que o aumento da pressão e a temperatura, aumentam a probabilidade de formação de pites, que a perda metálica ocorre em forma de cavidades, em que a profundidade é maior do que o diâmetro (GENTIL; CARVALHO, 2022; ASKARI *et al.*, 2019). A perda material em formato de depressão ocorre geralmente em regime intermediário, quando a camada de carbonato, geralmente formada pela corrosão por $CO_{2(g)}$ sobre a superfície do metal, é perdida, geralmente, esta corrosão é caracterizada por possuir fundo plano e borda afiada. A corrosão localizada induzida por fluxo, geralmente, ocorre em regime de escoamento da tubulação turbulento, e se inicia a partir da pré-existência da perda material por pite ou mesa. A corrosão neste caso é propagada pelo regime de fluxo interna da tubulação (ASKARI *et al.*, 2019).

A profundidade na qual a superfície metálica está enterrada no solo também influencia a taxa de corrosão. Segundo Lui *et al.* (2020), as camadas de solo nas quais uma liga metálica está enterrada, interferem no padrão e na velocidade de corrosão exercida pelo solo. As condições, características, ocorrência de microrganismos, variam conforme a profundidade do solo, em que à medida que a espessura do solo aumenta, a taxa de corrosão diminui. A difusão de gases no solo em camadas superiores é maior, havendo aumento da circulação de gases através da camada do solo e atingindo a superfície metálica, pois pode haver um bloqueio na difusão de espécies corrosivas.

A corrosão externa acomete fortemente as tubulações subterrâneas. É o processo que envolve a dissolução do metal, com simultânea redução dos agentes

catódicos, compostos principalmente por gás oxigênio dissolvido em água, ou solo úmido. É o tipo de corrosão que normalmente gera a perda gradual e localizada da superfície da metálica, com o afinamento da espessura da parede da tubulação, por exemplo, podendo ocasionar vazamentos devido o surgimento de *pites* ou rachaduras (KIM *et al.*, 2021).

Uma tubulação enterrada pode ser observada pelo aspecto de eletroquímica, na qual estão distribuídas as regiões anódicas e catódicas ao longo da superfície do metal. Essas regiões anódicas e catódicas são definidas pela microestrutura presente na liga metálica. O solo atua como meio iônico condutores de cargas positivas (cátions) e cargas negativas (ânions), o aspecto de continuidade metálica encontrado nas tubulações gera caminhos mais curtos entre os anodos e cátodos, resultando no surgimento de uma diferença de potencial dentro da estrutura metálica sob o solo (KIM *et al.*, 2021).

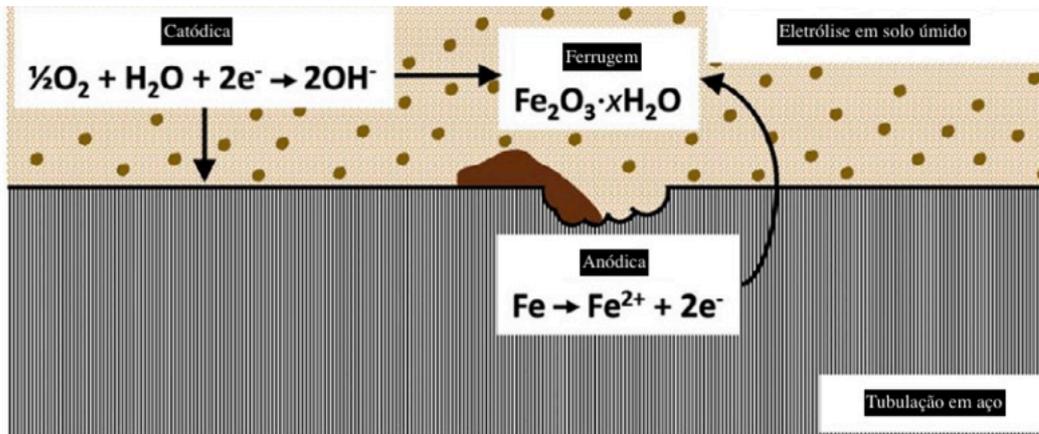
Devido à heterogeneidade do solo, considerado um meio corrosivo, há diferença de potencial que resulta em possibilidade de surgimento de áreas anódicas e catódicas. Em relação a diferentes potenciais de corrosão ao longo do meio corrosivo, tem-se: aquecimento diferencial, iluminação diferencial, agitação diferencial, concentração diferencial de eletrólitos, aeração diferencial (SERRA, 2014; GENTIL; CARVALHO, 2022).

A corrosão por aeração diferencial ocorre quando a superfície metálica da tubulação está sob um mesmo eletrólito, porém com regiões diferentemente aeradas, dado que as tubulações atravessam regiões de composições diferentes. Esta diferença de oxigenação gera uma diferença de potencial, assumindo o papel de catodo a região mais aerada, e a região com menor concentração de oxigênio, anodo Tubulações compostas por trechos aéreos e enterrados geralmente são reforçadas com proteção anticorrosiva nas regiões de interface solo-atmosfera (NUNES, 2007; GENTIL; CARVALHO, 2022).

Outra possibilidade de corrosão por aeração diferencial em superfícies de tubulações ocorre quando há deposição de partículas sólidas e matéria orgânica. Neste caso, é denominado também de corrosão sob depósito. As regiões em que as partículas sólidas se depositam assumem papel de regiões anódicas, com baixa concentração de oxigênio, já as regiões livres de partículas aderidas e com maior teor de oxigênio, assumem papel de regiões catódicas (GENTIL; CARVALHO, 2022).

Uma tubulação sob o solo se configura em uma célula eletroquímica natural, composta pelo solo e a tubulação. Nesta célula eletroquímica, ocorrem as reações eletroquímicas entre o eletrodo metálico e o eletrólito composto pela matriz solo. A reação redox é desencadeada quando o solo provém de eletrólitos, como água, sais e gases dissolvidos, principalmente o oxigênio (KIM *et al.*, 2021). A Figura 5 mostra o esquema da célula eletroquímica formada por um oleoduto e solo.

Figura 5 - Esquema de célula eletroquímica formada entre solo e tubulação



Fonte: Adaptado de Kim *et al.*, (2021)

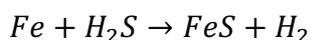
As condições eletrolíticas que desencadeiam os processos corrosivos podem ser originárias pelo intemperismo exercido por processos físicos, químicos e biológicos. Os eletrólitos mais citados na corrosão de tubulações ferrosas são os cloretos ou sulfatos, que podem se originar de várias fontes, como a chuva ou uso de fertilizantes no solo. Além disso, a presença de matéria orgânica encontrada no solo também pode afetar as condições eletroquímicas do ambiente (KIM *et al.*, 2021).

A complexidade dos fatores corrosivos que permeiam as tubulações enterradas sob o solo, como as características do próprio solo, a atmosfera, incluindo o oxigênio, cátions, ânions, moléculas orgânicas, podem combinar entre si, havendo mecanismos corrosivos sequenciais (SERRA, 2014; KIM *et al.*, 2021).

A corrosão interna também pode causar danos às tubulações, gerando vazamentos, obstruções e falhas estruturais, pondo em risco a segurança, perda de eficiência e prejuízos. A falha gerada pela corrosão interna pode ser generalizada, acometendo a estrutura metálica em grandes áreas, ou localizada, com perda pontual de material. Dentre as possibilidades de corrosão interna as quais as

tubulações, como oleodutos, podem sofrer estão: corrosão por $CO_{2(g)}$, conhecida por *sweet corrosion*; corrosão por $CO_{2(g)}$ dissolvido em H_2S , também conhecido como *sour corrosion*; corrosão sob depósitos; corrosão preferencial por soldas e; corrosão microbiana. As rachaduras ocorridas nos oleodutos são principalmente regidas por processos de craqueamentos ambientalmente assistidos, como por exemplo, corrosão por tensão, podendo ser incluídos a corrosão por hidrogênio e corrosão por sulfeto, muito comum em tubulações de derivados do petróleo (ASKARI *et al.*, 2019).

A corrosão por sulfeto de hidrogênio é desencadeada devido à possibilidade deste se dissolver em água, dissociando-se em cátion H^+ , que capturando elétrons, desencadeia a corrosão do metal, com formação de hidrogênio. A reação eletroquímica geral é representada pela Equação 5. O produto de corrosão sulfeto de ferro produzido pela reação do sulfeto de hidrogênio varia conforme temperatura, pH, concentração de gás do sistema, em que as escamas formadas podem possuir caráter protetivo ou não à superfície do metal (ASKARI *et al.*, 2019).



Equação 5

2.7.1 Aço ASTM A36

O aço carbono ASTM A36 é classificado dentro da categoria dos aços estabelecida pela *ASTM International (American Society for Testing and Materials)*, sendo amplamente demandado globalmente. Este aço é comumente empregado em instalações da indústria petrolífera, setor automotivo e na estrutura de maquinários, usinas de energia, construção de edifício, entre outras (BAJARES *et al.*, 2015; SAJID *et al.*, 2018; PREEDAWIPHAT *et al.*, 2020).

Estruturas de aço A36 expostas a condições severas, juntamente com ciclos de temperatura, têm sua vida útil significativamente reduzida. O principal motivo das falhas deste aço é gerado pela perda de espessuras (PREEDAWIPHAT *et al.*, 2020).

Segundo Bajares *et al.* (2015), o aço ASTM A36, quando exposto a um sistema aquoso contendo de coque de petróleo, apresenta taxa de perda de massa linear ao longo do tempo. Essa observação sugere que o processo corrosivo ocorre de forma uniforme nesse sistema. Quando o aço que contém regiões de solda, é

submetido a condições corrosivas, o aparecimento de corrosão ocorre por pite, cavidades e furos localizados é observado (PREEDAWIPHAT *et al.*, 2020).

A corrosividade do solo ao aço pode variar com diversos fatores, tanto do próprio aço que está enterrado ao solo, como as propriedades do próprio solo. A corrosão de estruturas de aço enterradas no solo ocorre prioritariamente em condições aeróbicas. Solos cujas características foram alteradas devido à presença de poluentes, contaminantes químicos ou outras perturbações tendem a ser mais agressivos aos aços (KURTH *et al.*, 2019).

2.7.2 Corrosão microbiológica

Além dos processos corrosivos convencionais dos materiais, os quais são devidos às intempéries do ambiente em que estão expostos, a corrosão induzida pelos microrganismos também ocorre sobre os materiais que possuem contato com fungos, algas e mais frequentemente, bactérias, chamada de corrosão microbiológica. Devido às condições favoráveis para crescimento de fungos, algas e bactérias, muitos equipamentos e estruturas sofrem a corrosão induzida pelos microrganismos. Geralmente os ambientes propícios a essa corrosão contém água do mar, de rios, sedimentos oleosos, solos contendo resíduos orgânicos ou sais como sulfatos, sulfetos, nitratos, fosfatos e enxofre (JAVAHERDASHTI; ALASVAND, 2019; GENTIL; CARVALHO, 2022). Na presença de água, o crescimento microbiológico é induzido, fazendo com que a corrosão microbiológica seja propiciada (LIU *et al.*, 2020). Solo com concentração elevada de enxofre pode desencadear a corrosão microbiológica mais lentamente. Por outro lado, altas concentrações de sulfatos podem suportar o crescimento das bactérias redutoras de sulfato (BRS), elevando a corrosão influenciada por microrganismos (KURTH *et al.*, 2019).

A presença de microrganismos pode acentuar ainda mais o processo corrosivos dos materiais enterrados. A presença de bactérias pode influenciar diretamente na velocidade das reações anódicas e catódicas; modificando a resistência de películas aderentes sobre os metais, pela excreção de produtos metabólicos e, dando origem a meios corrosivos, como por exemplo, as bactérias oxidantes de enxofre, que possuem o ácido sulfúrico, como produto metabólico, tornando o solo mais corrosivo (GENTIL; CARVALHO, 2022). A corrosão

microbiológica pode ocorrer por indução, aceleração, ou por condições favoráveis para o início da corrosão. Dentre essas condições favoráveis, está a formação do biofilme microbiano (PROCÓPIO *et al.*, 2021).

Com a adesão dos microrganismos à superfície, há a formação de condições anódicas, favorecendo as reações de redução, cujos principais responsáveis, são as bactérias redutores de sulfato (BRS), as bactérias redutoras de nitrito (BRN), as bactérias redutoras de tiosulfato, as acetogênicas, metanogênicas e as ferrobactérias, que estão mais ligadas aos processos corrosivos de ligas metálicas. Além disso, gêneros mais difundidos, como *Pseudomonas*, *Shewanella* e *Bacillus*, estão associados à corrosão metálica (PROCÓPIO *et al.*, 2021). Segundo Gentil e Carvalho (2022), entre os microrganismos mais associados com a corrosão microbiana estão as bactérias redutoras de sulfato, as bactérias oxidantes de enxofre, as bactérias oxidantes de ferro e de manganês, e as bactérias formadoras de limos.

Materiais metálicos como tubulações de distribuição de água podem sofrer corrosão microbiana por meio de depósitos de óxido de ferro (III), $Fe_2O_3 \cdot H_2O$, produzidos pelas bactérias oxidantes de ferro. Os óxidos entopem as tubulações ou criam condições favoráveis à corrosão por aeração diferencial. Os gasodutos podem conter sulfato na água de selagem, podendo ser reduzidos a sulfetos pelas bactérias redutoras de sulfato. Em operações de recuperação de óleo, em que grandes quantidades de água do mar são utilizadas, também há presença de odor característico de gás sulfídrico, ocorrendo a oxidação dos equipamentos. Já em tanques de armazenamento de combustíveis derivados do petróleo em que haja presença de água, a corrosão associada aos microrganismos também pode ser observada (GENTIL; CARVALHO, 2022). A água pode ser proveniente de lavagem de equipamentos, ou em alguns casos, da água utilizada para evitar a perda por evaporação dos voláteis, pela própria condensação de água existente na atmosfera dos tanques de armazenamento (JAVAHERDASHTI; ALASVAND, 2019; PETROBRAS, 2021).

A corrosão microbiana em equipamentos, tubulações ou tanques de armazenamento ocorre mais frequentemente em hidrocarbonetos com faixa de $C_{10} - C_{18}$ (querosene) do que $C_5 - C_9$ (gasolina), devido à maior facilidade dos microrganismos utilizá-los como fonte de carbono. Os microrganismos mais encontrados em corrosão microbiana são *Hormoconis resiniae*, *Penicillium luteum*,

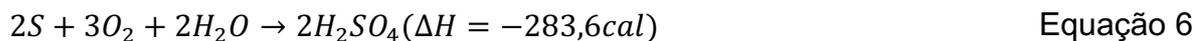
Aspergillus flavus e bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Desulfovibrio desulfuricans* e *Aerobacter aerogenes* (GENTIL; CARVALHO, 2022).

Os agentes que influenciam no processo de corrosão microbiana são: crescimento microbiano; biodegradação de aditivos orgânicos usados no combustível; formação de gás sulfídrico pelas bactérias redutoras de sulfato, além do gás sulfídrico ser corrosivo ou reagir com componentes do combustível, formando sulfetos orgânicos corrosivos; deterioração microbiana de revestimentos, que torna o material suscetível à corrosão (VIDELA, 2003).

O mecanismo de corrosão provocado pelos microrganismos tem início com a formação do biofilme, item explicitado em **seção 2.4**. O biofilme também forma o *biofouling*, que é a formação de depósitos indesejáveis, os quais impactam diretamente na eficiência dos equipamentos, podendo ocasionar perda de fluxo e baixa na eficiência de trocadores de calor (WALKER *et al.*, 2000; GENTIL; CARVALHO, 2022). As bactérias modificam o meio ao qual se alojam e formam biofilme. O biofilme pode influenciar nas velocidades anódicas e catódicas, modificando por meio dos produtos metabólicos a resistência de películas sobre o substrato metálico, excretam produtos metabólicos corrosivos e formam tubérculos, os quais possibilitam o aparecimento de pilhas de aeração diferencial (VIDELA, 2003).

De acordo com esses principais autores, a corrosão microbiana pode ser dividida em quatro tipos: devido à formação de ácidos, por despolarização catódica, por aeração diferencial e por ação conjunta de bactérias (JAVAHERDASHTI; ALASVAND, 2019; JAVAHERDASHTI, 2019; GENTIL; CARVALHO, 2022).

A corrosão associada à formação de ácido é devido à ocorrência de formação de ácidos no processo metabólico de alguns grupos de bactérias (KURT *et al.*, 2019). O grupo de bactérias *Thiobacillus* oxida o enxofre ou compostos de enxofre (sulfito SO_3^{2-} , tiosulfato $S_2O_3^{2-}$), com simultânea produção de ácido sulfúrico, conforme Equação 6. Algumas bactérias quando em baixa concentração de H_2S metabolizam sulfetos solúveis, convertem sulfatos (SO_4^{2-}) para sulfetos (S^{2-}), e sulfetos para enxofre. Há três espécies de bactérias envolvidas nesse processo de corrosão associado à formação de ácidos: *Thiobacillus thioparus*, *Thiobacillus thiooxidans* e *Thiobacillus concretivorus*. Essas espécies são aeróbias e autotróficas, a energia para a síntese do material celular é proveniente da oxidação do enxofre, conforme Equação 6 (GENTIL; CARVALHO, 2022):



Para o caso do gás sulfídrico, ou ácido sulfídrico, tem-se a Equação 7 e a Equação 8:



A temperatura que permite o crescimento dessas bactérias é entre 25-30°C, em alguns casos, os produtos metabólicos deixam o meio com pH em torno de 2, podendo chegar a menores valores. Devido a esses fatores, tubos de concreto ou aço carbono que sejam suscetíveis a esses microrganismos, sofrem destruição da parte superior, e isso em consequência ao desprendimento de gás sulfídrico de águas de esgotos ou poluídas, que é oxidado a ácido sulfúrico (GENTIL; CARVALHO, 2022).

2.7.3 Técnicas de avaliação da corrosão

A avaliação da corrosão de tanques, tubulações e estruturas metálicas pode ser feita a partir análises diretas ou indiretas. A forma direta por meio da visualização da corrosão, avaliação microestrutural. As técnicas indiretas, métodos não destrutivos de inspeção da corrosão utilizados são: ultrassom, radiografia, indução eletromagnética, emissão acústica, líquido penetrante, corrente parasita, inspeção com *pigs*. Os métodos de engenharia utilizados para monitoramento da corrosão são ferramentas de natureza não eletroquímica, como resistência elétrica e a avaliação da corrosão a partir da mensuração da taxa de corrosão de cupons, método aplicado no monitoramento de corrosão em dutos. Já os métodos eletroquímicos podem ser utilizados em diversos casos, com a determinação do estado passivo ou ativo do metal, por meio da medida do potencial do material, medida da resistência da polarização, podendo em alguns casos, mensurar a velocidade instantânea de corrosão (ROBERGE, 2019; GENTIL; CARVALHO, 2022).

Devido ser um método direto de avaliação da corrosão, a perda de massa auxilia na avaliação direta da gravidade da corrosão. Também denominado método

gravimétrico, esta técnica envolve as diferenças das massas antes e depois da exposição ao sistema que se deseja avaliar a corrosão (KIM *et al.*, 2021). A perda de massa, a área exposta e o tempo de exposição são relacionados para a expressão da taxa de corrosão do cupom, podendo ser expressa em *mpy* (milésimo de polegada de penetração por ano, ou *mmpy* (milímetro de penetração por ano). Devido ao cálculo das taxas de corrosão dos aços ser generalizada, este é utilizado para mensurar processo corrosivos uniformes (GEMELLI, 2001; GENTIL; CARVALHO, 2022).

O sentido físico e a classificação das taxas de corrosão quanto à escala de gravidade é dividida em quatro grupos, de acordo com a norma NACE-RP-07-75, exposta no Quadro 3.

Quadro 3 - Classificação da taxa de corrosão

Taxa de corrosão uniforme (mm/ano)	Classificação da corrosão
< 0,025	Baixa
0,025 a 0,12	Moderada
0,13 a 0,25	Alta
>0,25	Severa

Fonte: Gentil; Carvalho (2022)

Com a monitoramento das taxas de corrosão, é possível aprimorar a otimização de projetos envolvendo tubulações, tanques e equipamentos, uma vez que a vida útil do metal pode ser adequadamente contemplada. Por exemplo, uma tubulação projetada para parâmetros específicos de operação pode ser construída com margens dimensionais adicionais, levando em conta as perdas materiais decorrentes dos processos corrosivos. (ROBERGE, 2019; GENTIL; CARVALHO, 2022).

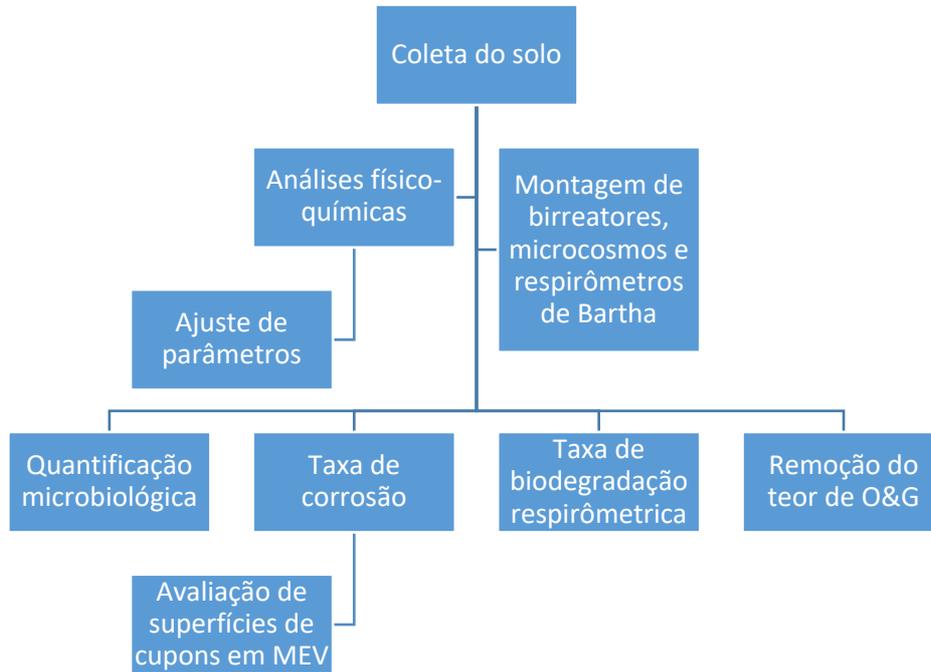
Há alguns métodos para realização das taxas de corrosão dos aços, os quais utilizam ácidos para a decapagem do produto de corrosão. A decapagem ácida é realizada por meio da imersão do cupom, ou a peça metálica, em soluções ácidas, em especial ácidos inorgânicos, podendo ser acrescidas de inibidores de corrosão, a fim de se evitar o ataque ao substrato metálico. Os principais ácidos inorgânicos utilizados são os ácidos sulfúrico, fosfórico, nítrico, fluorídrico e clorídrico. A

decapagem por ácido clorídrico se consiste na dissolução dos óxidos de ferro. Entretanto, há a desvantagem de desprendimento de vapores corrosivos, limitando sua utilização somente à temperatura ambiente. A concentração normalmente empregada é na faixa de 25 a 50% (GEMELLI, 2001; GENTIL; CARVALHO, 2022).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado para verificar a viabilidade de realização da biorremediação em solo artificialmente contaminado com 5% (p/p) de óleo diesel S10. Para abranger diferentes frentes de trabalho, o experimento foi dividido em três etapas, executadas simultaneamente. A **primeira etapa** consistiu-se no ensaio de biodegradação em microcosmos de pequena escala, cujo objetivo foi avaliar a bioestimulação, a partir da adição de nutrientes e do biopolímero goma xantana; nestes microcosmos, foram avaliadas a taxa de degradação do contaminante e a quantificação microbiológica, os microcosmos foram avaliados nos tempos 7, 14, 28, 42 e 86 dias. Na **segunda etapa**, foi realizado o estudo da corrosividade do solo contaminado em aço carbono ASTM A36, em que os *cupons* foram enterrados em biorreatores com os mesmos ajustes realizados nos microcosmos, com o cálculo da taxa de corrosão por gravimetria, e as superfícies dos substratos enterrados, analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), os tempos de análise foram os mesmos dos microcosmos. A **terceira etapa** consistiu em avaliar a biodegradação do óleo diesel em respirômetros de Bartha, e o tempo do ensaio respirométrico foi de 84 dias. Foram utilizadas as mesmas correções e variáveis nas três frentes do experimento, sendo as condições empregadas: B_{ct} - biorreator controle, contendo o solo peneirado e a umidade ajustada; B_{Di} - biorreator diesel, contendo o solo peneirado, a umidade ajustada e contaminado em 5% de óleo diesel; B_{Nu} - biorreator diesel com nutrientes, contendo o solo peneirado, a umidade ajustada, contaminado em 5% de óleo diesel e os nutrientes nitrogênio e fósforo ajustados em relação ao carbono orgânico total; e B_{Nu+Xa} - biorreator diesel com nutrientes e goma xantana, contendo o solo peneirado, a umidade ajustada, contaminado em 5% de óleo diesel, os nutrientes fósforo e nitrogênio ajustados em relação ao carbono orgânico total e 0,5% de goma xantana. Na Figura 6 encontra-se o fluxograma das etapas realizadas.

Figura 6 - Fluxograma experimental

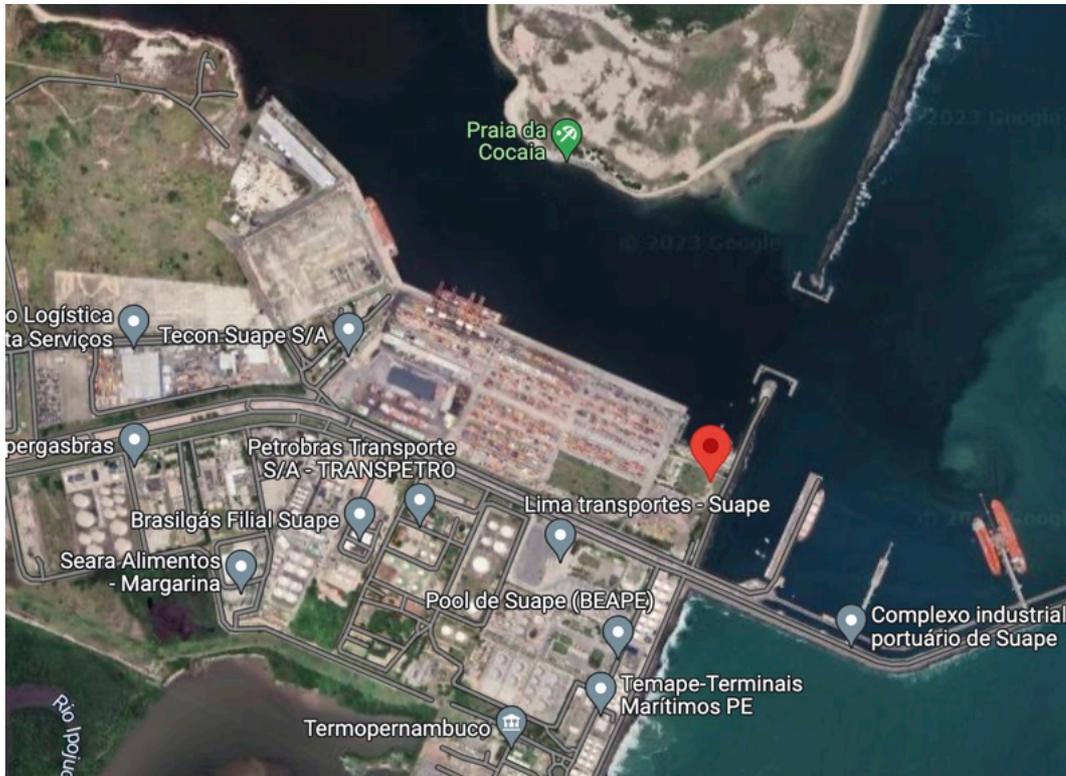


Fonte: A Autora (2023)

3.1 AMOSTRAGEM DO SOLO

O solo foi coletado no Porto de Suape, Estr. Engenho Salgado, município de Ipojuca - PE, conforme coordenadas GPS, exposto na Figura 7. Uma amostra de 60 kg de solo foi coletada em amostragem dispersa ao longo da área de 100 m². O local de amostragem foi escolhido para refletir a viabilidade do uso da técnica de bioestimulação no processo de biodegradação de uma possível contaminação do solo por óleo diesel, por se tratar de uma área muito próximas a tanques de armazenamento de combustíveis, como gasolina, óleo diesel e outros hidrocarbonetos. Além da alta probabilidade de haver microrganismos indígenas capazes de sobreviver em ambientes contaminados com derivados do petróleo e, conseqüentemente, capazes de degradá-los. Antes da coleta, certificou-se de que o local de coleta não continha contaminação direta com petróleo e seus derivados.

Figura 7 - Foto do local de coleta via satélite



Fonte: Google Maps (2023)

O solo foi coletado conforme ABNT-NBR-14283:1999, em uma profundidade entre 15 e 20 cm, conforme Figura 8, cuja área de amostragem foi percorrida em ziguezague, em diversos pontos diferentes. A amostra foi composta por várias amostras simples, posteriormente homogeneizadas manualmente, para obtenção de uma amostra composta. O solo coletado foi acondicionado em sacos plásticos limpos para o transporte.

Figura 8 - Profundidade de amostragem do solo



Fonte: A Autora (2023)

A amostra de solo foi espalhada pela bancada, Figura 9, em temperatura ambiente por 4 dias, até que fosse possível o peneiramento em malha 2,0 mm (ABNT-NBR-14283:1999). Em seguida, o solo foi armazenado em caixa organizadora de plástico com tampa, em temperatura ambiente, até a realização dos experimentos.

Figura 9 - Amostra de solo disposta em bancada



Fonte: A Autora (2023)

3.2 ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DO SOLO

As análises físico-químicas realizadas foram: granulometria, densidade real e aparente, classificação textural do solo, pH, umidade, capacidade de campo, estabilidade do solo, carbono orgânico total, nitrogênio total, fósforo, potássio, enxofre, ferro, teor de óleos e graxas e quantificação microbiológica.

3.2.1 Granulometria e caracterização do solo

As análises: granulométrica, densidade real e aparente, e classificação do solo foram realizadas em laboratório registrado com razão social Tecsolo, localizado na cidade de Recife (PE), seguindo metodologias propostas pela Embrapa (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

3.2.2 Análise de pH do solo

A determinação do pH do solo foi realizada conforme Luchese *et al.* (2001). Pesou-se 10 g de solo peneirado, juntamente com 25 mL de água destilada, deixando sob agitação por 15 minutos. Após descansar por 1 hora, o pH foi medido potenciométricamente, realizado em triplicata.

3.2.3 Análise de umidade

A determinação da umidade do solo foi realizada conforme procedimentos de Luchese *et al.* (2001), em que pesou-se 10 g de solo peneirado em placa de *petri*, com secagem em estufa a 105°C por 2 horas, esfriando-se em dessecador, e pesando a amostra novamente em balança analítica. Após pesar, a amostra foi seca em estufa novamente a 105°C por 1 hora, pensando-se novamente. O processo foi realizado até que se obtivesse massa constante.

A umidade residual do solo (W_g) foi calculada conforme Equação 9

$$W_g = \frac{\text{Peso}_{\text{úmido}} - \text{Peso}_{\text{seco}}}{\text{Peso}_{\text{úmido}}} * 100 \quad \text{Equação 9}$$

3.2.4 Análise de capacidade de retenção de água no solo (CRE)

A capacidade de retenção de água no solo foi determinada seguindo-se Luchese *et al.* (2002). Sobre um papel de filtro em funil de vidro, pesou-se 100g de solo peneirado, dispostos sobre proveta graduada de 100 mL, em triplicata. Verteu-se 100 mL de água destilada sobre a amostra de solo, de forma que a água percolasse e alcançasse a proveta, por 24 horas, conforme Figura 10.

Figura 10 - Capacidade de retenção de água no solo



Fonte: A Autora (2023)

Após as 24h, o volume de água filtrada foi determinado a partir da graduação da proveta. O cálculo da CRE é descrito pelas Equação 10 e Equação 11:

$$V_r = V_i - V_f \quad \text{Equação 10}$$

$$CRE (\%) = 100 - V_r \quad \text{Equação 11}$$

Em que:

V_r = volume retido pela amostra de solo

V_f = volume do filtrado

V_i = volume inicial de água = 100 mL

3.2.5 Análise preliminar de estabilidade do solo

Para a viabilização da condição do solo em relação ao ajuste de umidade, a adição do contaminante e a concentração da goma xantana (GX), foi realizado um teste de estabilidade com o objetivo de obter o melhor ajuste, de modo a evitar a

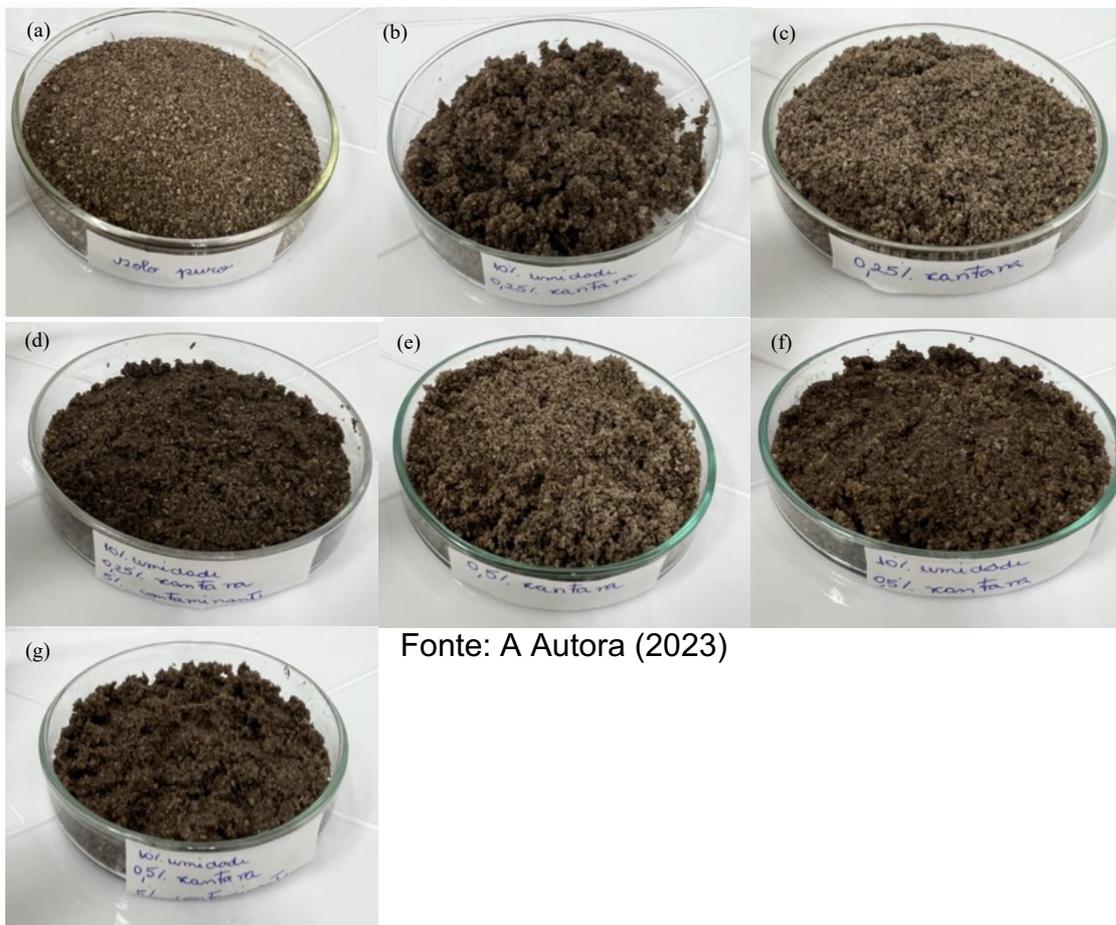
compactação do solo resultante, o que poderia afetar negativamente as condições do experimento, especialmente para realização da homogeneização dos biorreatores. As variações estudadas foram com os parâmetros: ajuste de umidade, concentração de goma de xantana e a contaminação de 5% de óleo diesel. As variações realizadas estão na Tabela 1, expostas na Figura 11.

Tabela 1 - Variações teste de estabilidade do solo

Variação	Solo	Óleo diesel S10 (%)	Umidade (%)	Goma xantana (%)
a	+	-	-	-
b	+	-	10,00	0,25
c	+	-	-	0,25
d	+	-	-	0,50
e	+	-	10,00	0,50
f	+	5,00	10,00	0,25
g	+	5,00	10,00	0,50

Fonte: A Autora (2023)

Figura 11 - Teste de estabilidade (a): Solo puro; (b): Solo, umidade em 10% e 0,25% GX; (c): Solo e 0,25% GX; (d): Solo e 0,5% GX; (e) Solo, umidade em 10% e 0,5% GX; (f): Solo, umidade 10%, 0,25% GX e 5% óleo diesel e (g): Solo, umidade em 10%, 0,50% GX e 5% óleo diesel



Fonte: A Autora (2023)

3.2.6 Análise carbono orgânico total

A análise do carbono orgânico foi realizada em laboratório externo à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), de acordo com a via Walkley Black, método de titulação após oxirredução por via úmida, metodologia descrita por EMBRAPA (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

3.2.7 Análises de nutrientes

As análises dos teores de nitrogênio total, fósforo, potássio, enxofre e ferro foram realizadas em laboratório Tecsolo, de acordo com metodologias da Embrapa (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

3.2.8 Teor de óleos e graxas

A análise dos teores de óleo e graxas também foi realizada no laboratório Tecsolo, foram determinados por meio da metodologia de gravimetria (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

3.2.9 Quantificação microbiológica

Os microrganismos quantificados foram: heterotróficas aeróbias e anaeróbias (BHA e BHAn), quantificados pela técnica do número mais provável (NMP). O método de NMP é baseado na análise estatística de distribuição dos microrganismos em suspensão. O procedimento foi realizado em três séries de cinco diluições ou mais, e a presença de microrganismos foi determinada pelos tubos que exibem turbidez. A concentração de microrganismos foi estimada a partir da tabela de número mais provável, com nível de confiança de 95% (DA SILVA *et al.*, 2021). As bactérias hidrocarbonoclasticas foram quantificados por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), pela técnica “*pour-plate*” (método da placa derramada). Todas as análises microbiológicas foram conduzidas utilizando-se uma única amostra para cada ponto temporal e sistema, o que não estabelece uma amostragem espacial com uma margem para cálculo de desvio padrão.

Para a quantificação dos grupos de microrganismos de interesse do tempo inicial $t=0$, e nos pontos de controle 7, 14, 28, 42 e 56 dias, preparou-se uma suspensão celular por meio da homogeneização de 10 g de solo em 90 mL de água

destilada estéril. Para o grupo de microrganismos anaeróbios, realizou-se as diluições decimais sucessivas em solução redutora; para os grupos de microrganismos aeróbios, realizou-se as diluições decimais sucessivas em água destilada estéril.

Os meios de cultura utilizados para a quantificação das bactérias heterotróficas aeróbias, anaeróbias e hidrocarbonoclasticas, estão descritos a seguir.

As bactérias heterotróficas anaeróbias foram quantificadas por meio da técnica do número mais provável (NMP/g de solo). Utilizando-se frascos do tipo penicilina (volume de 10 mL), contendo 9,0 mL de meio Tioglicolato (29,75 g/L), Ágar (0,75 g/L) e Resazurina (0,001 g/L), purgados com gás nitrogênio por 20 minutos, e 1,0 mL das respectivas diluições, que variou de 10^{-1} a 10^{-8} . Após inoculação, em triplicata, 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, foi verificado o crescimento dos microrganismos por meio da visualização da turvação do meio, e a concentração celular calculada em NMP/g solo, conforme Figura 12.

Figura 12 - Tubos inoculados para BHAn após viragem

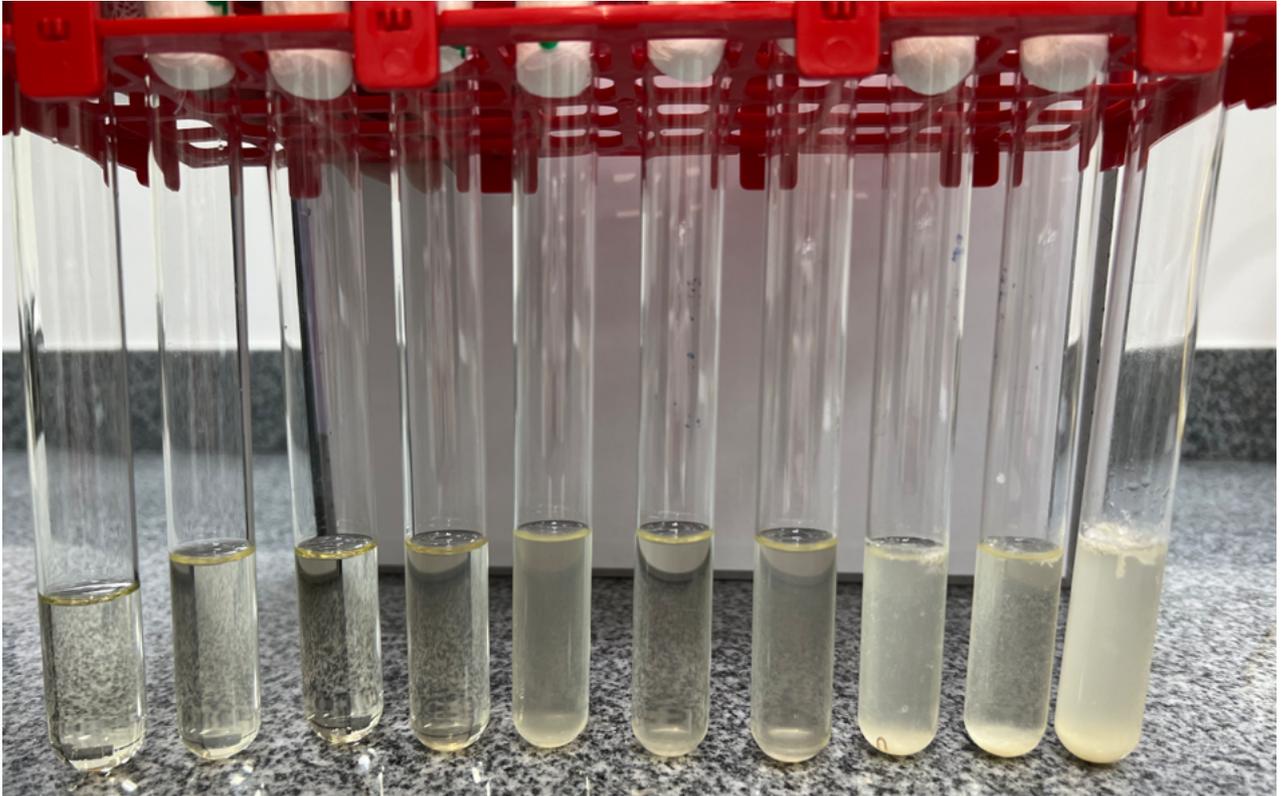


Fonte: A Autora (2023)

As bactérias heterotróficas aeróbias foram quantificadas por meio da técnica do número mais provável (NMP). O meio utilizado foi caldo nutriente, composto por: peptona de carne 5,0 g/L, extrato de carne 3,0 g/L, sacarose 20,0 g/L. Após 48 horas de incubação em temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, foi verificado crescimento dos

microrganismos pela visualização da turvação do meio, como pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 - Tubos de ensaio inoculados para BHA após viragem



Fonte: A Autora (2023)

As Hidrocarbonoclasticas foram quantificadas pela técnica "pour plate", de unidade formadora de colônias (UFC/g solo), metodologia adaptada de Ali *et al.*, (2019). Foi utilizado o meio mineral de Bushnell Hass Agar, da marca Himedia, cuja composição está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição do meio Bushnell Haas Agar

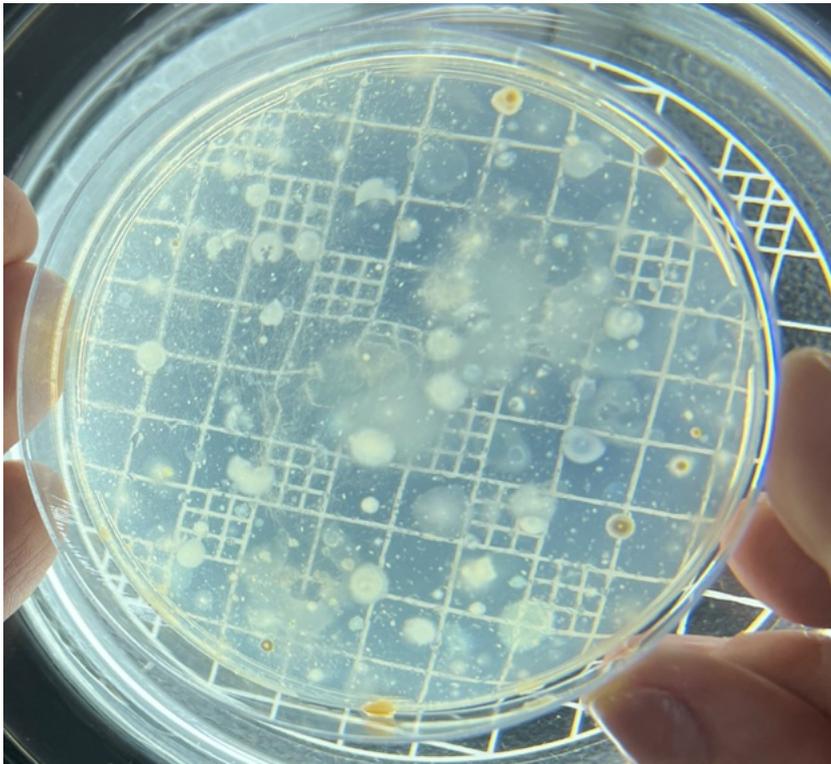
Componente	Concentração (g/L)
Sulfato de Magnésio	0,20
Cloreto de cálcio dihidratado	0,02
Fosfato de potássio monobásico	1,00
Fosfato de potássio dibásico	1,00
Nitrato de amônio	1,00
Cloreto férrico	0,05
Ágar	20,00

Fonte: A Autora (2023)

A inoculação foi realizada a partir das diluições seriadas em placas estéreis de poliestireno, com 1 mL de inóculo de cada diluição, que variou de 10^{-1} a 10^{-8} , aproximadamente 15 mL de meio Bushnell Haas Agar, e 0,16 mL de óleo diesel (1% do volume total), como única fonte de carbono e energia (CURIEL-ALEGRE *et al.*, 2022). O óleo diesel utilizado foi esterilizado com aplicação de UV, pelo tempo de 30 minutos, em cabine biológica. As placas foram inoculadas em triplicata, com a realização das placas em branco, sendo estas apenas com meio mineral e outra com meio mineral, adicionando-se 0,16 mL de óleo diesel estéril. Foram realizados teste de controle com e sem adição de óleo diesel e todas as inoculações para assegurar o padrão de crescimento das hidrocarbonoclásticas.

Após inoculação, as placas foram incubadas em temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 7 dias, para posterior contagem das unidades formadoras de colônias, para o cálculo da concentração celular, em UFC/g solo, conforme Figura 14.

Figura 14 - Unidades formadoras de colônias das bactérias hidrocarbonoclásticas



Fonte: A Autora (2023)

3.2 MICROCOSMOS

A biodegradação foi avaliada em quatro biorreatores, os quais denominou-se microcosmos, cujas bandejas de polipropileno, medindo 28 cm x 20,5 cm x 6,4 cm, contendo 3,0 kg de solo peneirado. Os microcosmos tiveram a umidade ajustada para 50% da capacidade de retenção, umidade suficiente para a saturação do solo possível à difusão do oxigênio na matriz do solo (MACCI *et al.*, 2021), calculada conforme **apêndice A**. Os ajustes realizados nos microcosmos bioestimulados, com os nutrientes nitrogênio e fósforo, por meio da adição de $NH_4NO_{3(s)}$ e $K_2HPO_{4(s)}$, respectivamente, foram explicitados no apêndice B. Para melhor homogeneização, os nutrientes foram dissolvidos na água do ajuste da umidade do microcosmos para 50% da CRE do solo. Os microcosmos montados foram: o biorreator solo controle B_{ct} , contendo apenas o solo peneirado e a umidade ajustada em 50% da capacidade de retenção; o biorreator solo diesel B_{Di} , contendo o solo peneirado com a umidade ajustada em para 50% da capacidade de retenção e contaminação de 5% (p/p) de óleo diesel S10; o biorreator solo nutrientes B_{Nu} , contendo solo peneirado, umidade ajustada em 50% da capacidade de retenção, bioestimulado com nutrientes nitrogênio e fósforo, em relação ao carbono já existente no solo, mais o carbono adicionado com a contaminação artificial realizada com o óleo diesel, sendo a proporção calculada C:N:P em (100:10:1); e o biorreator solo nutrientes e xantana B_{NU+Xa} , contendo o solo peneirado, umidade ajustada em 50% da capacidade de retenção, 5% (p/p) de óleo diesel S10, bioestimulado com nutrientes, com a mesma proporção do microcosmo B_{Nu} e 0,5% (p/p) de goma xantana.

A Tabela 3 apresenta as cargas de solo, água, diesel S10, nutrientes e goma xantana adicionados aos microcosmos, levando-se em consideração a massa de 3 kg do microcosmo.

Tabela 3 - Cargas de componentes adicionados aos microcosmos

Sistema	Solo (g)	Água (g)	Diesel S10 (g)	NH_4NO_3 (g)	K_2HPO_4 (g)	Xantana (g)
B_{Ct}	2745,00	255,00	-	-	-	-
B_{Di}	2595,00	255,00	150,00	-	-	-
B_{Nu}	2551,25	255,00	150,00	36,48	7,2754	-
B_{Nu+Xa}	2536,25	255,00	150,00	36,48	7,2754	15,00

Fonte: A Autora (2023)

Os ajustes realizados aos birreatores (4 kg) e respirômetros (50 g) executados da mesma forma dos ajustes dos microcosmos, exposta no Apêndice A e Apêndice B. Os quatro microcosmos podem ser vistos na Figura 15.

Figura 15 - Microcosmo controle (a) B_{Ct} ; (b) B_{Di} ; (c) B_{Nu} e (d) B_{Nu+Xa}



Fonte: A Autora (2023)

Como mostrado na Figura 16, os microcosmos foram mantidos fechados com plástico celofane, para evitar a evaporação.

Figura 16 - Microcosmos cobertos com plástico



Fonte: A Autora (2023)

A concentração de 5% de contaminante foi escolhida devido a evidências de que concentrações maiores tendem a diminuir a atividade microbiana, devido à toxicidade, influenciando a produção de biomassa bacteriana, além de prejudicar também a proporção dos nutrientes C:N:P e o oxigênio disponível aos microrganismos (KEBEDE *et al.*, 2021).

Com amostras do solo proveniente dos quatro microcosmos, foram realizadas as quantificações microbiológicas dos grupos de microrganismos de interesse: aeróbios heterotróficos, anaeróbios heterotróficos e das hidrocarbonoclasticas, nos tempos de 7, 14, 28, 35, 42 e 56 dias.

Ao final dos 84 dias de incubação foram realizadas as análises de teor de óleo e graxas dos sistemas estudados, seguindo metodologia citada em **seção 3.2.8**.

3.3 BIORREADORES PARA TAXA DE CORROSÃO

Para o estudo da corrosão dos *cupons* de material aço carbono ASTM A36, outros quatro biorreatores foram montados em bandejas de polipropileno, medindo 28 cm x 18,2 cm x 8,4 cm, com massa de 4 kg de solo peneirado, com os mesmos parâmetros ajustados no item 4.2, **solo controle (B_{ct})**, **solo diesel (B_{Di})** e **solo, diesel e nutriente (B_{Nu})** e **solo, diesel, nutrientes e xantana (B_{NU+Xa})**. Os cupons

foram enterrados a uma profundidade média nestes biorreatores para posterior realização das taxas de corrosão, 15 corpos de prova em cada biorreator, com dimensões médias de 10 mm x 20 mm x 6 mm, conforme Figura 17. As taxas de corrosão foram calculadas nos tempos: 7, 14, 28, 42 e 56 dias, em triplicata.

Os cupons de aço carbono ASTM A36, foram jateados previamente com esferas de vidro, limpos com álcool isopropílico e, para a remoção da umidade, imergidos em acetona. Após a limpeza, os corpos de prova foram secos com auxílio de ar quente, pesados em balança analítica, identificados, e então, enterrados aos respectivos biorreatores.

Figura 17 - Cupons de aço carbono ASTM A36



Fonte: A Autora (2023)

Os biorreatores foram mantidos em temperatura ambiente, em torno de 30°C, até o 56º dia de incubação. Para melhor manutenção da umidade dos sistemas, os biorreatores também foram mantidos cobertos, vistos na Figura 18.

Figura 18 - Biorreator solo controle (a) B_{ct} ; (b) B_{Di} ; (c) B_{Nu} e (d) B_{Nu+XA}



Fonte: Autora (2023)

3.3.1 Microestrutura do aço A36

Realizou-se o ataque químico do aço A36 com solução nital 2%, composta por 2% de ácido nítrico e 98% de álcool etílico. O ataque químico do aço foi realizado por imersão, durante 15 segundos. Após o tempo de imersão, o cupom foi lavado em água corrente para interromper o ataque químico e, seca por jato de ar quente e, em seguida, polida com lixas d'água #1000, #1200 e # 1500. Após polida, a superfície do metal foi observada em estereomicroscópio Axio Zoom V16 da Zeiss®, operando com *software* AxioVision, para que os contornos da microestrutura e as fases da liga pudessem ser visualizadas.

3.4 PERDA DE MASSA E TAXA DE CORROSÃO

Para cálculo da perda de massa e taxas de corrosão, os *cupons* enterrados foram retirados dos biorreatores, e submetidos a um processo de pré-limpeza do solo aderido, com auxílio de escova macia e água destilada. O solo aderido ao substrato foi removido para que não houvesse imprecisão no cálculo da perda de massa. Os cupons após retirada no $t= 14$ dias, dos biorreatores B_{ct} , B_{Di} , B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , estão expostos nas Figura 19.

Figura 19 - Cupom desenterrado do (a) B_{ct} ; (b) B_{Di} ; (c) B_{Nu} e (d) B_{Nu+Xa}



Fonte: A Autora (2023)

Após a limpeza preliminar, os substratos foram submetidos a ciclos de decapagens ácidas, em que os *cupons* foram imersos em solução de ácido clorídrico 15% (p/v) por 10 segundos, lavados em água corrente e lavados em água destilada novamente. Após decapagem, os corpos de prova foram imersos em álcool isopropílico e acetona, por 10 segundos e, posteriormente, secos com jato de ar quente (ASTM G1-03, 2011).

Após a decapagem ácida, os *cupons* foram pesados em balança analítica, e voltados ao processo inicial de decapagem, até que se obtivesse valores de massa constante, constatando a total remoção dos produtos de corrosão, em média 2 minutos.

As taxas de corrosão foram calculadas conforme Equação 12, contida na Norma ASTM G1-03 (2011):

$$\text{Taxa de corrosão} \left(\frac{\text{mm}}{\text{ano}} \right) = \frac{0,0565 \cdot 10^4 \cdot W}{\text{Área} \cdot t \cdot D} \quad \text{Equação 12}$$

Em que: W= perda de massa (g)
 Área= área total do cupom, descontando-se área de furo central (cm²)
 t= tempo de exposição (dias)
 D= densidade do aço (7,86 g/cm³)

3.5 ANÁLISE EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO

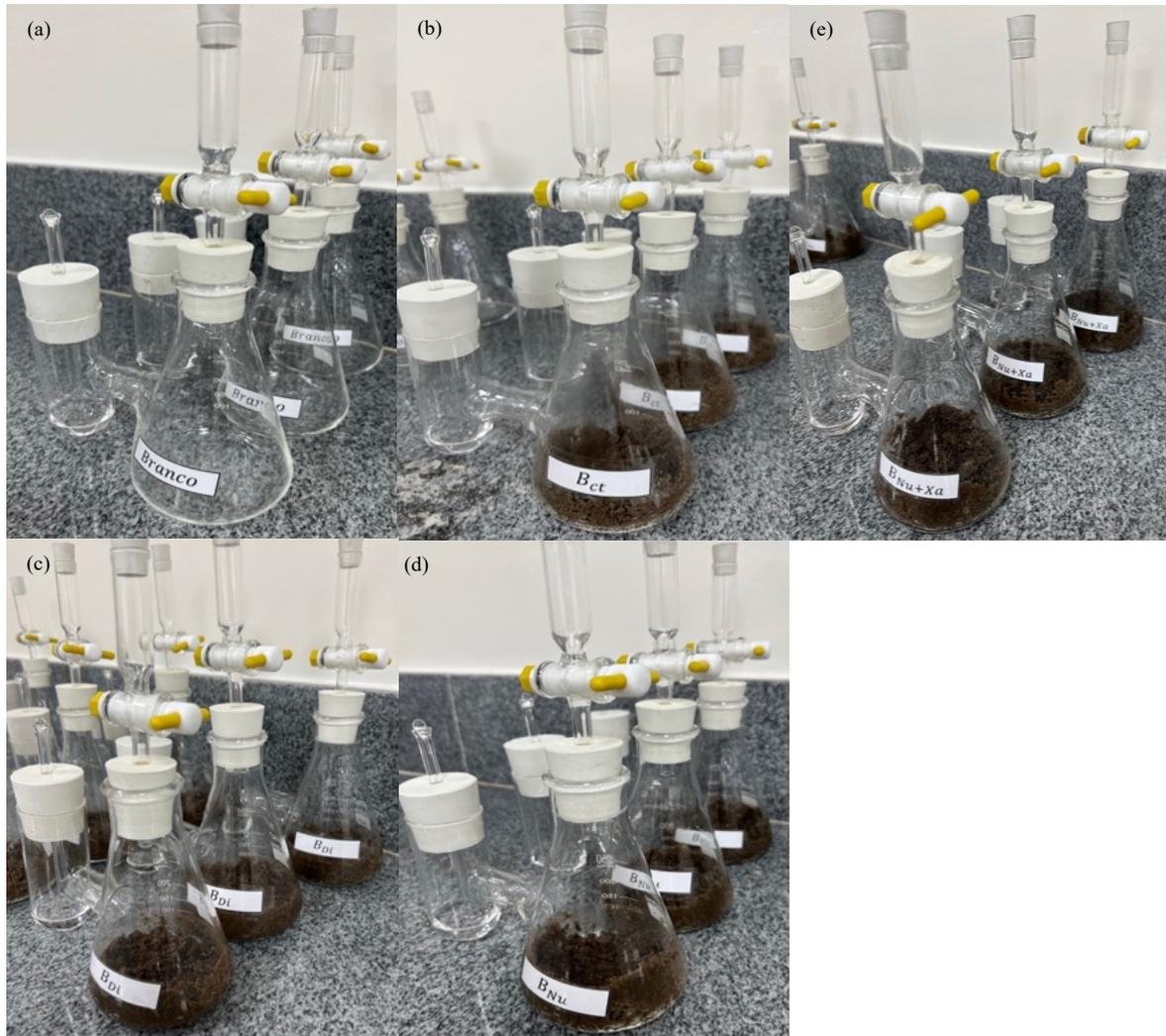
As superfícies dos *cupons* após realização das taxas de corrosão foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG), MIRA 3 da Tescan com *software* Mira TC. Foi realizada a análise química semi-quantitativa da composição metalográfica do metal, com a técnica de Espectroscopia de energia dispersiva (EDS), com o espectrômetro de energia dispersiva de raios-X associados ao MEV X-act 51-ADD007 da Oxford *Instruments* com *software* AZtec.

3.6 ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO COM RESPIRÔMETRO DE BARTHA

O ensaio de biodegradação em respirômetros de Batha seguiu os mesmos ajustes de parâmetros dos microcosmos e dos biorreatores. O ensaio foi realizado em triplicata, em que foram montados os respirômetros denominados branco, para descontar algum traço de $CO_{2(g)}$ dissolvido que a solução de KOH poderia conter.

Para avaliar a biodegradação do óleo diesel, foram montados, conforme ABNT-NBR-14283:1999, os seguintes sistemas de respirômetros: solo controle B_{ct} , contendo 50g de solo peneirado, com ajuste de umidade em 50% da CRE; solo diesel B_{Di} , contendo 50 g de solo peneirado, 5% do óleo diesel e a umidade ajustada em 50% da CRE; solo nutrientes, B_{Nu} , contendo 50g de solo peneirado, 5% de óleo diesel, a umidade ajustada em 50% da CRE e o ajuste dos nutrientes nitrogênio e fósforo na proporção de C=100:N=10:P=1; e o solo xantana, B_{NU+Xa} , contendo 50g de solo peneirado, a umidade ajustada em 50% da CRE, o ajuste dos nutrientes nitrogênio e fósforo na proporção de C=100:N=10:P=1 e 0,5% de goma xantana. Todos os respirômetros montados tiveram a adição de 10 mL de solução de KOH a 0,2 mol/L ao braço lateral da vidraria, onde o $CO_{2(g)}$ produzido reagia com a solução. Os respirômetros dos sistemas branco e B_{ct} , estão expostos na Figura 20.

Figura 20 - Respirômetros dos (a) sistema branco; (b) controle; (c) diesel; (d) nutrientes e (e) xantana



Fonte: A Autora (2023)

A quantificação do $CO_{2(g)}$ produzido pelos microrganismos contidos nos sistemas montados foi realizada por meio da medição da condutividade da solução de KOH . As soluções foram medidas com o equipamento condutímetro Digimed, modelo DM-32, célula com modelo DMC-010, $K = 1cm^{-1}$. Os respiômetros foram mantidos fechados, incubados em temperatura média de $28^{\circ}C$.

As leituras das condutividades dos sistemas foram realizadas utilizando-se pipeta de 10 mL para retirar a solução de KOH do braço lateral para um Erlenmeyer. Para a lavagem do braço lateral, utilizou-se 20 mL de água decarbonatada, antes da reposição da nova solução de KOH para leitura seguinte.

Com o auxílio da curva de calibração, explicitada no **Apêndice C**, a concentração de $CO_{2(g)}$ foi calculada em cada respiômetro estudado, para posterior

cálculo da taxa de biodegradação. As medidas das condutividades foram realizadas a cada 24h, até o 37º de ensaio, passando para a cada 48h até 73º dia, com as medidas finais realizadas até 84º dia realizadas a cada 72h.

3.6.1 Quantificação do $CO_{2(g)}$

A curva analítica foi construída com a partir da medida da condutividade de 11 soluções contendo volumes proporcionais de $KOH_{(l)}$ 0,2 M e $K_2CO_{3(l)}$ 0,1 M, de forma que o número de $CO_{2(g)}$ pudesse ser calculado estequiometricamente (MAZZEO *et al.*, 2020).

Inicialmente foram preparadas soluções de $KOH_{(l)}$ a 0,2 M e $K_2CO_{3(l)}$ a 0,1 M, com água fervida em autoclave a 121 °C, por 15 minutos, para que se eliminassem traços de gás carbônico dissolvido.

A construção da curva analítica (n° mols CO_2 x Condutividade (mS)), foi realizada a partir da leitura da condutividade dos seguintes pontos:

Primeiro ponto: $V_{KOH(0,2M)} = 10$ mL; $V_{H_2O} = 20$ mL $\rightarrow n_{CO_2} = 0$

Segundo ponto: $V_{KOH(0,2M)} = 9$ mL; $V_{K_2CO_2(0,1M)} = 1$ mL e $V_{H_2O} = 20$ mL

Utilizando-se $C_1V_1 = C_2V_2$ (Equação 13), tem-se: $0,1 M \times 1 mL = C_2 \times 10 mL \rightarrow$

$$C_2 = 0,01 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ de } K_2CO_3 \rightarrow n_{CO_2} = 0,01 \text{ mol/L}$$

Utilizando novamente a Utilizando-se $C_1V_1 = C_2V_2$ (Equação 13, tem-se: $0,01 \frac{\text{mol de } CO_2}{\text{L}} \times 0,001 L = 100 \mu\text{mol de } CO_2$.

Terceiro ponto: $V_{KOH(0,2M)} = 8$ mL; $V_{K_2CO_2(0,1M)} = 2$ mL e $V_{H_2O} = 20$ mL

Utilizando-se a Equação 14, tem-se $0,1 M \times 2 mL = C_2 \times 10 mL \rightarrow$

$$C_2 = 0,02 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ de } K_2CO_3 \rightarrow n_{CO_2} = 0,02 \text{ mol/L}$$

Utilizando-se a Utilizando-se $C_1V_1 = C_2V_2$ (Equação 13), tem-se: $0,02 \frac{\text{mol de } CO_2}{\text{L}} \times 0,01 L = 200 \mu\text{mol de } CO_2$.

E assim foi feito para o restante dos pontos medidos, até o 11º, em que se mediu a condutividade da solução contendo $V_{K_2CO_2(0,1M)} = 10$ mL e $V_{H_2O} = 20$ mL.

Com os pontos de $n^\circ \text{ mols } CO_2$ e de *condutividade (mS)*, plotou-se a curva analítica que pode ser vista no Apêndice C.

3.7 AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DOS MICROCOSMOS

Com o objetivo de se avaliar da taxa de biorremediação, a quantificação de óleos e graxas foi realizada por gravimetria, pela extração em *Soxhlet* (IT 06-07.133), realizada em laboratório externo à UFPE. Os tempos de amostragem para a análises foram: tempo inicial, do solo amostrado sem a contaminação artificial com óleo diesel, e das amostras dos quatro biorreatores estudados, B_{Ct} , B_{Di} , B_{Nu} , e B_{NU+Xa} , no tempo=84 dias de incubação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para melhor entendimento, a apresentação dos resultados e discussões desta pesquisa está dividida em exposição dos seguintes tópicos: características físico-químicas e quantificação microbiológica do solo antes da contaminação artificial com óleo diesel S10; caracterização físico-química do óleo diesel; escolha do melhor ajuste de umidade experimental; evolução da biodegradação a partir dos dados respirômetricos obtidos; quantificação microbiológica dos microcosmos ao longo do tempo experimental; variação do pH dos microcosmos ao longo do tempo experimental; eficiência da remoção dos óleos e graxas obtidos a partir das análises obtidas em laboratório externo à UFPE; análise das taxas de corrosão dos cupons de aço A36 e análise morfológica por MEV das superfícies dos cupons após decapagem.

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO SOLO INICIAL

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos com a análise de granulometria do solo. A proporção analisada foi de 95,7% de areia, 1,2% de silte e 3,1% de argila, com a categorização apresentada no Quadro 2, solo com as proporções areia > 80% e argila < 10%, são classificados com textura arenosa.

Tabela 4 - Granulometria do solo

Granulometria	Resultado
Areia (<i>g/kg</i>)	957,0
Silte (<i>g/kg</i>)	12,0
Argila (<i>g/kg</i>)	31,0
Densidade real (<i>kg/dm³</i>)	2,83
Densidade aparente (<i>kg/dm³</i>)	1,52
Classe textura	Arenoso

Fonte: A Autora (2023)

A ausência de agregação das partículas no solo arenoso pode facilitar a volatilização do poluente, uma vez que as partículas não se mantêm unidas e,

portanto, permitem a movimentação do poluente através do solo. Além disso, o espaço entre as partículas aumenta a oxigenação do solo, o que favorece as atividades microbiológicas, uma vez que microrganismos necessitam de oxigênio para sua sobrevivência e atividade metabólica. Essa maior oxigenação também aumenta a área de superfície efetiva, facilitando a acessibilidade do contaminante aos microrganismos e, conseqüentemente, sua degradação (KIM *et al.*, 2022).

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos com as análises preliminares do solo. O valor de pH neutro obtido na análise fez com que o solo tenha sido trabalhado em sua forma bruta, sem necessidade de neutralização. Fato que seria necessário caso o pH encontrado fosse ácido, devido a este parâmetro influenciar na atividade microbiana, com evidências que o pH ideal para a biorremediação deve estar entre 5 e 8 (KEBEDE *et al.*, 2021).

Tabela 5 - Parâmetros iniciais medidos no solo

Parâmetro	Resultados
pH	7,800
Umidade residual (%)	1,500
Capacidade de retenção (%)	20,000
COT (%)	0,150
Nitrogênio total (<i>mg/kg</i>)	124,600
Fósforo (<i>mg/kg</i>)	6,463
Potássio (<i>mg/kg</i>)	20,725
Enxofre (<i>mg/dm³</i>)	38,000
Ferro (<i>mg/dm³</i>)	30,000
Óleos e graxas (%)	0,250

Fonte: A Autora (2023)

O valor de carbono orgânico mensurado de 0,150% é coerente com a classificação da textura do solo, solos arenosos tendem a ter menor quantidade de carbono orgânico, uma vez que a matéria orgânica nesses solos são baixas em relação aos solos argilosos, por exemplo (NAYAL *et al.*, 2019; KEBEDE *et al.*, 2021).

Já as quantificações do nitrogênio, fósforo, nutrientes essenciais ao metabolismo microbiano, 124,6 mg/kg, 6,463 mg/kg, respectivamente, foram

ajustados para do biorreator com bioestímulos, cálculos explicitados em **Apêndice B**.

A análise de óleo e graxas de 0,250% demonstrou que a região a qual foi coletada a amostra de solo para este experimento se encontrava com baixo teor de resíduo oleoso proveniente de derrames ou vazamentos, pois a área de coleta foi em Porto de Suape, local suscetível a vazamentos de derivados do petróleo.

A Tabela 6 apresenta a quantificação microbiológica inicial do solo, realizada com os grupos das bactérias heterotróficas aeróbias e anaeróbias, e as bactérias hidrocarbonoclásticas, grupos também quantificados ao longo do tempo experimental.

Tabela 6 - Quantificação microbiológica inicial do solo

Grupo de bactérias	Concentração celular
Heterotróficas aeróbias	$1,10 * 10^8$ NMP/g
Heterotróficas anaeróbias	$2,00 * 10^4$ NMP/g
Hidrocarbonoclásticas	$6,80 * 10^5$ UFC/g

Fonte: A Autora (2023)

As primeiras análises dos grupos microbianos presentes no solo forneceram informações sobre as atividades dos microrganismos autóctones já adaptados ao ambiente local. Esses resultados foram utilizados para orientar a implementação da biorremediação do óleo diesel por meio da estimulação da microbiota indígena com nutrientes, com o intuito de alcançar uma taxa eficiente de biodegradação.

Com a concentração celular encontrada, a técnica de biorremediação se mostrou viável, pois a mineralização dos compostos orgânicos é fortemente associada à composição de microrganismos nativos no solo (NAYAL *et al.*, 2019).

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO DIESEL

O óleo diesel S10 utilizado para contaminar o solo deste experimento foi comprado em posto de combustível BR, em que o boletim de conformidade foi fornecido pelo mesmo, exposto na Tabela 7.

Tabela 7 - Caracterização físico-química do óleo diesel S10

Parâmetro	Resultado	Método
Aspectos visuais	Límpido	NBR 14954
Cor visual	Amarelada	Visual
Condutividade elétrica (pS/m)	79,0	ASTM D2624
Massa específica a 24°C (kg/m ³)	841,3	NBR7148
Ponto de fulgor (°C)	62,0	D56
Teor de água por Karl Fischer (ppm)	71,0	D6304

Fonte: A Autora (2023)

As análises físico-químicas realizadas no óleo diesel empregado neste experimento atestaram que o contaminante utilizado estava em conformidade com as especificações requeridas. O teor de água presente no óleo diesel foi determinado em 0,071 g/L e não foi considerado no cálculo para ajuste da umidade do solo.

4.3 ESCOLHA DO MELHOR AJUSTE UMIDADE EXPERIMENTAL

Os ajustes realizados no solo, incluindo a correção da umidade dentro da faixa da capacidade de retenção entre 50 e 70% e a adição de goma xantana, foram executados em conformidade com a análise preliminar de estabilidade apresentada na **seção 3.2.5** (ABNT, 1999). No teste de estabilidade, a concentração de goma xantana foi estabelecida para manter as características do sistema solo-água-óleo diesel sem desestabilização, evitando a compactação do sistema, devido às propriedades reológicas da goma xantana. Estas características foram observadas

visualmente após o teste de estabilidade realizado. Além disso, a GX altera a viscosidade de soluções e géis, característica importante no planejamento experimental com a matriz solo (BORGES *et al.*, 2008; DIAZ *et al.*, 2004).

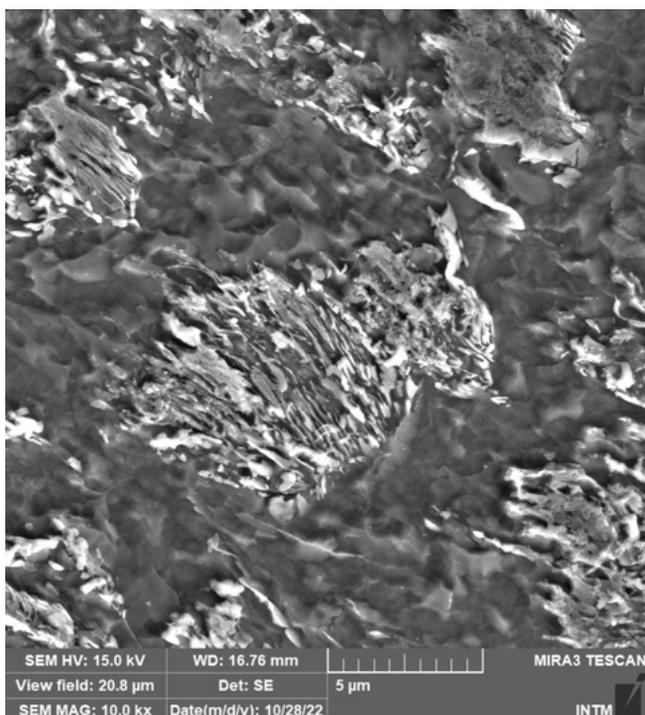
A correção selecionada foi de 0,50% de goma xantana, visto que os sistemas compostos por 0,25% e 0,5% garantiram a estabilidade adequada do solo, e o objetivo era estimular o sistema B_{NU+Xa} com a máxima quantidade de xantana que não causasse problema de desestabilidade dos biorreatores, microcosmos e respirômetros estudados. O ajuste de umidade para 50% da capacidade de retenção do solo foi realizado, resultando em umidade total de 10%.

Os biorreatores, microcosmos e respirômetros foram submetidos à suplementação de nutrientes por meio da adição de nitrato de amônio (NH_4NO_3) e fosfato dipotássico (K_2HPO_4). A proporção de nutrientes utilizada foi estabelecida em relação ao carbono orgânico total natural do solo e à contaminação por óleo diesel, seguindo a relação de (100:10:1) cálculo apresentado no Apêndice B. A decisão de balancear os nutrientes nitrogênio e fosfato foi fundamentada na elevada eficácia de biodegradação relatada em estudos científicos executados (BAPTISTA *et al.*, 2003; MARIANO *et al.*, 2009; BOSCO *et al.*, 2020). A umidade dos sistemas foi ajustada para 50% da capacidade de retenção (CRE), apresentado no Apêndice A. As cargas de solo, água, diesel S10, nutrientes e goma xantana estão expostas na **seção 3.2**.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO AÇO A36

A realização da espectroscopia de energia dispersiva (EDS) no aço A36 apresentou o espectro de composição deste aço, composto por 95,64% Fe, 2,29% C, 0,86% Co, 0,75% Mn, entre outros elementos de liga. Com o ataque de 2% de solução nital (**seção 3.3.1**), realizou-se a microestrutura do aço, apresentado na Figura 21. Os microconstituintes foram predominantemente compostos por ferrita, apresentando a cor mais clara, que indica baixo teor de carbono, e a perlita, apresentando a parte mais escura.

Figura 21 - Microestrutura do aço A36



Fonte: A Autora (2023)

4.5 VARIAÇÃO DO PH MICROCOSMOS

Uma das variáveis controladas neste experimento consistiu no monitoramento dos valores de pH dos sistemas. Conforme descrito na **seção 4.1**, constatou-se que o pH inicial do solo antes da montagem do experimento foi de 7,80. A Tabela 8 apresenta os valores de pH medidos ao longo dos 56 dias de experimento, no mesmo intervalo da realização das quantificações microbianas e taxas de corrosão dos aços.

Tabela 8 - pH dos sistemas estudados

Dia	B_{ct}	B_{Di}	B_{NU}	B_{NU+Xa}
7	8,26	8,09	7,41	7,19
14	8,06	8,11	7,21	7,16
28	8,08	7,42	7,51	7,11
42	8,38	8,07	7,24	7,05
56	8,32	7,85	7,36	7,08

Fonte: A Autora (2023)

Ao longo dos 56 dias de experimento, foi possível observar que os valores de pH dos sistemas **B_{ct}** e **B_{Di}** variaram relativamente pouco, sugerindo a baixa

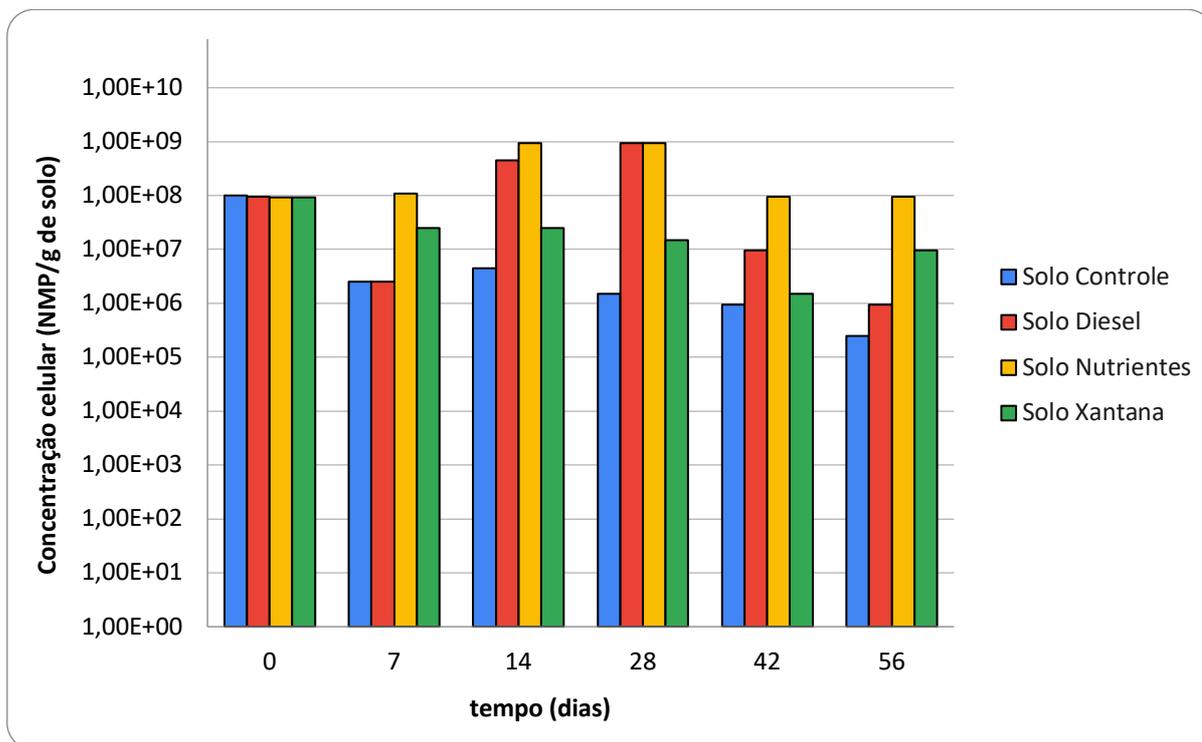
expressividade da atividade microbiana. A falta de estímulo com a suplementação de nutrientes no sistema B_{Di} contribuiu para isso.

Os sistemas B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , ainda que pouco expressivo, obtiveram diminuição dos valores de pH, em relação ao valor medido do solo puro. A diminuição do pH de sistemas de biodegradação sugere a expressividade da atividade microbiana. Estes resultados corroboram com estudos realizados por Miranda *et al.* (2007), que constatou redução do pH na biodegradação de óleo diesel, devido à produção de ácidos orgânicos como subprodutos da degradação de hidrocarbonetos pelas bactérias. Com a introdução das cargas de óleo diesel e nutrientes nos sistemas B_{Di} , B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , a diminuição inicial do pH, ainda que pequena, é atribuída à produção de metabólicos ácidos como subprodutos da metabolização do óleo diesel, com a produção do $CO_2(g)$ durante o processo de biodegradação (CARDOSO *et al.*, 2016). A diminuição do pH pode aumentar a solubilidade de micronutrientes como o fósforo, que foi introduzido ao solo, corroborando ainda mais a evidência da atividade microbiana (CURIEL-ALEGRE *et al.*, 2022). É possível inferir que a variação de pH dos sistemas teria sido mais significativa se a duração do experimento fosse estendida, considerando que o último ponto de análise de pH foi realizado em 56 dias experimento.

4.6 QUANTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Foram quantificadas as bactérias heterotróficas aeróbias e anaeróbias (BHA e BHAn), e as hidrocarbonoclásticas, nos tempos inicial, 7, 14, 28, 42 e 56 dias. Os dados da quantificação das bactérias heterotróficas aeróbias foram plotados no gráfico de $\log(\text{Concentração celular}) \times \text{tempo}$, apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Quantificação de bactérias heterotróficas aeróbias



Fonte: A Autora (2023)

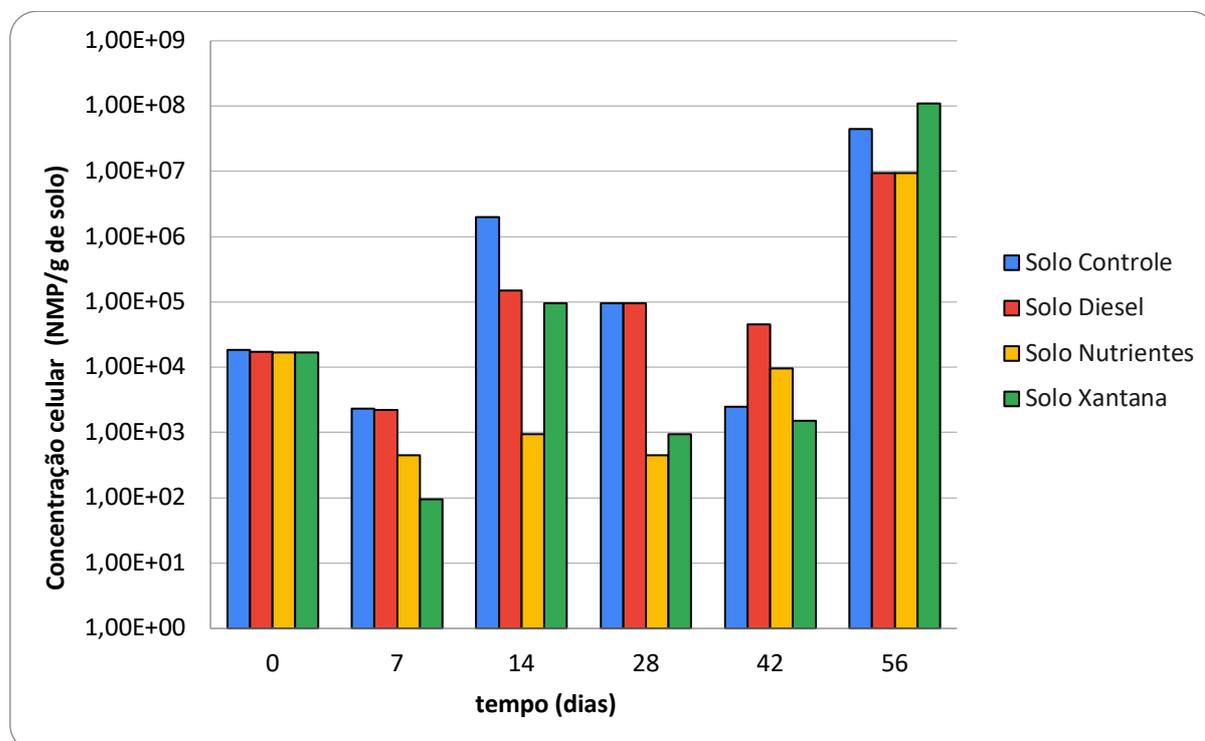
Durante o período experimental, constatou-se uma tendência de redução na concentração celular das BHA em relação à medida inicialmente de $1,00 \times 10^8$ NMP/g. O microcosmo B_{Ct} exibiu uma tendência decrescente na concentração bacteriana, o que é considerado normal, uma vez que as variáveis bióticas e abióticas do sistema interferem na dinâmica da microbiota presente no solo, o que pode ser afetado pela coleta do solo. A concentração celular das BHA teve um pequeno aumento entre os tempos 7 e 14 dias, porém nada expressivo, fato possivelmente relacionado à oxigenação do sistema por meio do revolvimento do solo.

Foi observada uma tendência de aumento na concentração celular no microcosmo B_{Di} , principalmente atribuído à contaminação por óleo diesel. No entanto, a população microbiana entrou em declínio antes dos outros sistemas, provavelmente devido ao esgotamento de nutrientes, que neste caso, não foi suplementado. A contaminação por óleo diesel resultou em uma proporção de carbono significativamente maior em relação à concentração de nutrientes pré-existentes no solo, bem como tornou o acesso aos nutrientes já presentes mais difícil (KEBEDE *et al.*, 2021).

Ao longo das quantificações realizadas, foram observados aumentos na concentração celular das BHA nos microcosmos B_{Nu} , o que é esperado em função da bioestimulação. Por outro lado, o sistema B_{Nu+Xa} apresentou menores variações na concentração celular, em comparação com B_{Nu} , possivelmente devido à alteração da dinâmica de disponibilidade de nutrientes aos BHA interferida pela GX. A concentração das BHA no microcosmo B_{Nu+Xa} diminuiu mais do que a do B_{Nu} . Isso pode ser atribuído à adição da GX, que possui diversas características funcionais: uma segunda fonte de carbono para o metabolismo microbiano, biodispersante e emulsificante, para facilitar o acesso dos microrganismos às moléculas do poluente. Porém, como a dinâmica de biodegradação dessa segunda fonte de carbono não é totalmente compreendida, é possível que ela tenha afetado o crescimento microbiano.

Os dados da quantificação das bactérias heterotróficas anaeróbicas foram plotados no gráfico de $\log(\text{Concentração celular}) \times \text{tempo}$, apresentado na Figura 23.

Figura 23 - Quantificação de bactérias heterotróficas anaeróbicas



Fonte: A Autora (2023)

Conforme investigado por Mariano *et al.* (2007) em um experimento de 56 dias de biorremediação de solo contaminado por vazamento de óleo diesel

armazenado em taque de posto de gasolina, a aplicação de estratégias de bioestimulação com nutrientes e bioaugmentação, resultou em um aumento significativo da concentração celular bactérias heterotróficas estimado em aproximadamente de 3 a 20 vezes. No experimento de biorremediação estimulada com nutrientes em solo contaminado artificialmente com petróleo bruto leve, realizado por Silva *et al.* (2022), foi observada uma rápida elevação no crescimento de bactérias mesofílicas no início do estudo, de $5,9 * 10^4 UFC/g$ para $3,4 * 10^9 UFC/g$, No entanto, após 30 dias, houve uma queda na concentração dessas bactérias, seguida por estabilização e uma diminuição gradual, com queda para $1,44 * 10^7 UFC/g$ ao final dos 180 dias de experimento. Esses resultados indicam uma provável redução dos nutrientes disponíveis às bactérias.

Como observado na Figura 23, a concentração inicial das bactérias heterotróficas anaeróbias foi baixa, com valor de $2,00 * 10^4 NMP/g$. Após a montagem dos sistemas, observou-se uma diminuição da concentração de BHAn no tempo 7 dias, principalmente nos sistemas B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , possivelmente devido a alterações nas condições de oxigenação, viscosidade, toxicidade, entre outras, decorrentes da carga de óleo diesel. Um solo recém contaminado por determinado poluente, pode resultar na diminuição drástica em algumas comunidades bacterianas, enquanto outras se tornarem abundantes (KEBEDE *et al.*, 2021). Porém, no tempo 14 dias, a concentração de BHAn aumentou significativamente, o que pode ser explicado pelas condições favoráveis para a anaerobiose.

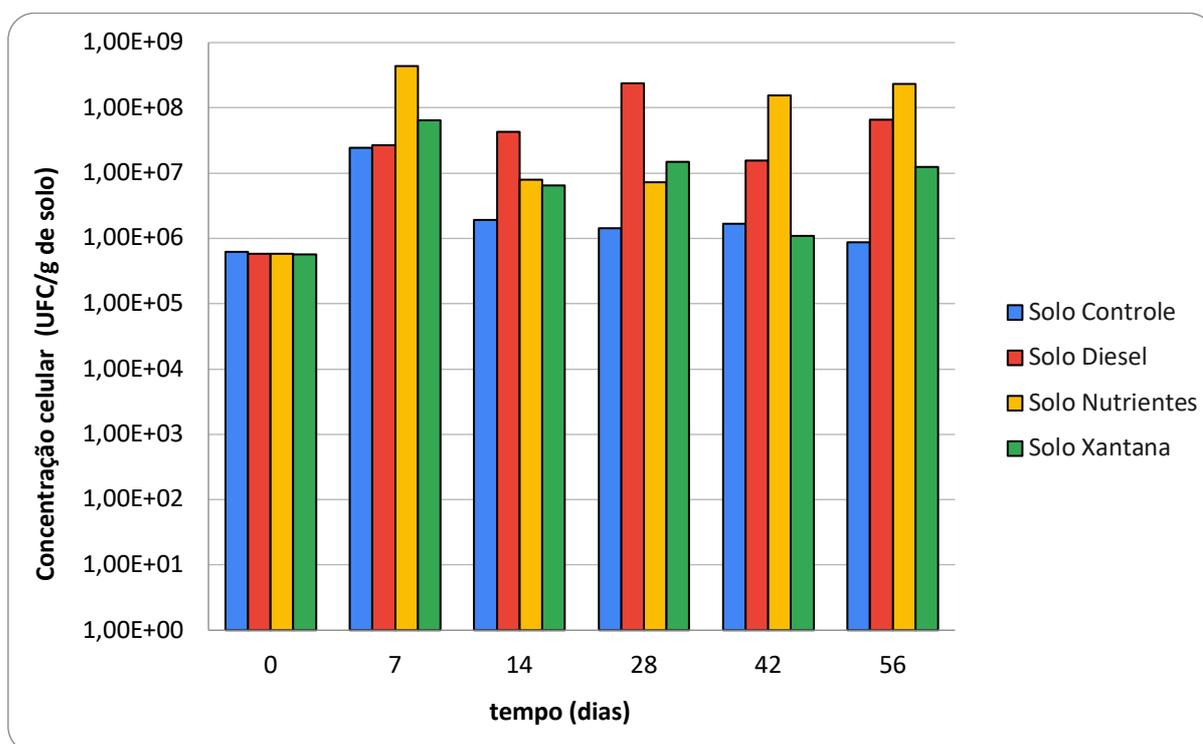
As concentrações de BHAn nos sistemas B_{Ct} , B_{Di} , B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , aumentaram significativamente. Enquanto o número de indivíduos aeróbios estava em ascensão por terem condições propícias ao metabolismo aeróbio, os indivíduos anaeróbios estavam em menor número. À medida que o número de indivíduos heterotróficos aeróbios aumenta, vai havendo escassez dos recursos, dentre eles, do oxigênio, momento em que o sistema se torna propício ao crescimento das bactérias heterotróficas anaeróbias (CARDOSO *et al.*, 2016). Ao final do experimento, observou-se as BHA em menor concentração e as BHAn em maior concentração. Nota-se que ao final dos 56 dias a concentração de indivíduos heterotróficos anaeróbios no sistema B_{Nu+Xa} foi significativamente maior, e isso pode ser explicado pela diminuição de oxigenação do solo, ou devido ao aumento da viscosidade do meio proporcionada pela GX, pois meios com altas viscosidades tendem a estimular o crescimento de microrganismos aeróbios (CARDOSO *et al.*, 2016). Como já

mencionado, a GX adicionada ao sistema B_{NU+Xa} possui propriedades reológicas, podendo alterar a viscosidade do meio, o que foi observado durante a montagem do sistema, em que o solo tendeu a se compactar, mesmo em condições de suplemento mínimo de água.

A concentração de bactérias sugerida para um processo de biorremediação bem-sucedido deve estar entre 10^4 e 10^7 UFC/g de solo, e uma concentração celular de 10^{+3} UFC/g de solo já não é ideal para se obter taxas de biodegradação eficientes (KEBEDE *et al.*, 2021).

Os dados da quantificação das bactérias hidrocarbonoclasticas foram plotados no gráfico de $\log(\text{Concentração celular}) \times \text{tempo}$, apresentado na Figura 24.

Figura 24 - Quantificação de bactérias hidrocarbonoclasticas



Fonte: A Autora (2023)

De acordo com Figura 24, o número inicial de organismos hidrocarbonoclasticas do solo era $6,24 \times 10^5$ UFC/g . Devido a área de coleta do solo ter sido próxima a tanques de combustíveis, cuja provável contaminação com derivados do petróleo é conhecida, a presença das hidrocarbonoclasticas foi

considerada altamente provável, e essa hipótese foi confirmada na quantificação inicial.

Observou-se um aumento na concentração de bactérias hidrocarbonoclásticas em B_{Ct} após 7 dias de incubação, o que pode ser explicado pelo aumento da oxigenação e umidade aportada na montagem dos sistemas. No entanto, após 7 dias devido à ausência de contaminação por óleo diesel, a concentração de bactérias diminuiu, possivelmente devido à falta de nutrientes, especialmente fonte de carbono.

A contaminação por óleo diesel resultou no aumento das concentrações de bactérias nos sistemas B_{Di} , B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , conforme esperado, devido à disponibilidade de hidrocarbonetos. Segundo Yalaoui-Guellal *et al.* (2020), a adição de $10^8 UFC/mL$ de bactérias hidrocarbonoclásticas isoladas em uma região da Nigéria propícia ao crescimento desses microrganismos resultou em uma significativa taxa de biodegradação de petróleo bruto, com 56,5% de biodegradação.

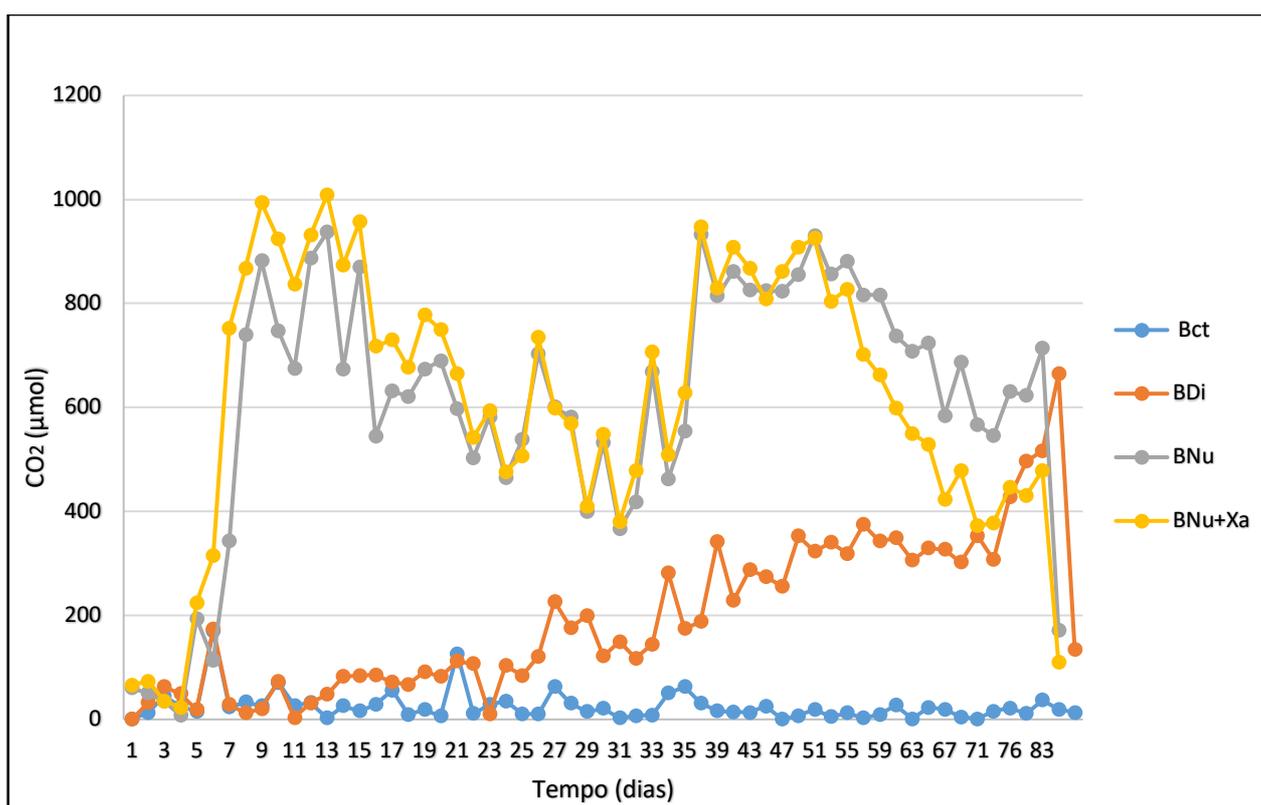
Como observado na Figura 24, a concentração de hidrocarbonoclásticas em todos os sistemas, com exceção de B_{Ct} , permaneceu elevada em relação à concentração inicial, devido à presença de contaminação por óleo diesel. Com base na pesquisa de Trejos-Delgado *et al.* (2020), pode-se observar uma clara correlação entre o aumento acelerado da concentração de bactérias heterotróficas e hidrocarbonoclásticas e o incremento na respiração basal da microbiota do solo, sugerindo uma associação intrínseca com o funcionamento metabólico microbiano.

Entre os sistemas contaminados com óleo diesel, B_{Di} , B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , o B_{Nu} apresentou maior aumento na contagem de UFC/g, resultado esperado devido à bioestimulação com nutrientes. Uma explicação admissível para a concentração de hidrocarbonoclásticas no sistema B_{Nu} ter sido maior do que em B_{Nu+Xa} foi que a adição da goma xantana, possa ter alterado a biodisponibilidade dos nutrientes para as bactérias. Essas bactérias são naturalmente produtoras de biossurfactantes (YALAOUI-GUELLAL *et al.*, 2020), e a combinação desse metabolismo natural com as propriedades emulsificantes da goma xantana pode ter alterado a dinâmica do sistema e impedido o crescimento das bactérias.

4.7 BIODEGRADAÇÃO RESPIROMÉTRICA

A avaliação da biodegradação do óleo diesel por meio da respiração basal do solo foi realizada por 84 dias, conforme Figura 25. A quantificação de CO_2 produzido pela microbiota presente no solo foi realizada diariamente até o 37º dia, passando para o intervalo de 48 horas até o 78º dia, e para cada 72 horas até o 84º dia de incubação. A representação gráfica da relação entre produção de CO_2 e a condutividade da solução de KOH utilizada para quantificar o CO_2 nos respirômetros está explicitada no **Apêndice C**, Figura 33.

Figura 25 - Produção de CO_2 ao longo dos 84 dias de incubação. B_{Ct} : solo controle; B_{Di} : solo contaminado com diesel; B_{Nu} : solo contaminado com diesel, bioestimulado com nutrientes; B_{Nu+Xa} : solo contaminado com diesel, bioestimulado com nutrientes e goma xantana



Fonte: A Autora (2023)

A produção de CO_2 apresentou padrões diferentes entre os respirômetros estudados. A produção do B_{Ct} apresentou taxas constantes ao longo dos 84 dias de incubação, havendo pequenas variações entre os dias quantificados. A produção mensurada pelos respirômetros B_{Di} se comportou com tendência relativamente

elevada ao longo dos 84 dias estudados, tendo um acréscimo a partir do 76° dia, quando as leituras passaram a ser realizadas a cada 72 horas. Os padrões das taxas diárias de produção de CO_2 dos B_{Ct} e B_{Di} foram notavelmente menores do que os respirômetros B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , visto que a microbiota indígena dos dois primeiros não foi estimulada com suplementação de nutrientes e goma xatana. O B_{Ct} exibiu valores muito baixos de produção de CO_2 , os quais permaneceram constante, muito provavelmente, devido às funções metabólicas normais da microbiota (SILVA *et al.*, 2007). Já o B_{Di} , por ter recebido a carga de óleo diesel, naturalmente, obteve taxas mais elevadas de produção de CO_2 , porém, como a microbiota não foi estimulada com acréscimo de nutrientes, a biodegradação não obteve os mesmos padrões vistos nos biorreatores bioestimulados. Além disso, solos com contaminação recente podem ser tóxicos aos microrganismos nativos, exigindo uma fase adaptação maior antes da degradação do poluente (MALETIĆ, 2001). No caso do B_{Di} que não recebeu aporte de nutrientes, é possível que os microrganismos tenham passado por um período de adaptação ao novo ambiente, o que pode ser evidenciado com o acréscimo no aumento na produção de CO_2 observado a partir do 23° dia.

Os respirômetros B_{Nu} e B_{Nu+Xa} tiveram padrões elevados e muito próximos entre si na produção de CO_2 . Com a carga de óleo diesel e o aporte de nutrientes, e nutrientes e xantana para o B_{Nu+Xa} , a produção de CO_2 apresentou taxas mais altas durante os primeiros 15 dias de amostragem. Devido ao acréscimo de carbono orgânico, as altas taxas de CO_2 podem ser explicadas pelo efeito denominado 'priming', que é o estímulo dos microrganismos nativos do solo por meio da contaminação de resíduos, que por causar, num curto período, a brusca alteração de carbono orgânico no solo, aumenta a respiração basal dos microrganismos. O efeito *priming* pode ocorrer imediatamente ou pouco tempo depois da adição de substâncias ao solo, principalmente em solos ricos em carbono e nitrogênio e, geralmente, ocorre em pulsos que estimulam as comunidades decompositoras presentes no solo, que utilizam a nova carga orgânica no metabolismo celular (KUZYAKOV *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2020).

O B_{Nu+Xa} em relação ao B_{Nu} , apresentou um pequeno aumento nas taxas de produção de CO_2 , visto que o aditivo de goma xatana de 0,5% contribuiu para o aporte de carbono orgânico. A funcionalidade da goma xatana de emulsificante pode ter contribuído, inicialmente, com para a biodisponibilidade do óleo diesel ao

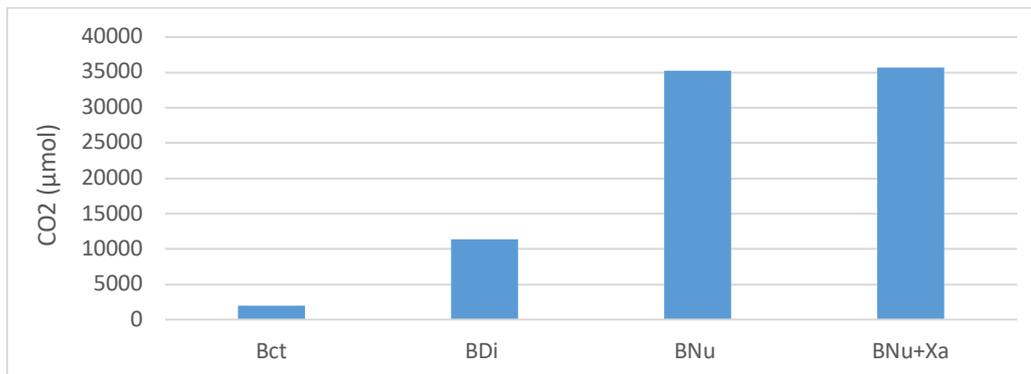
metabolismo microbiano, e por ser um polissacarídeo, fonte de carbono à microbiota presente no solo (CURIEL-ALEGRE *et al.*, 2022).

Em relação à quantificação do 84° dia, 24 horas após última leitura, os valores mensurados foram substancialmente inferiores aos valores obtidos anteriormente, quando as leituras estavam sendo feitas a cada 72 horas. Essa evidência também foi observada na quantificação a partir do 36° dia, quando houve um segundo pico de aumento na taxa de produção do CO_2 , sugerindo, novamente o efeito *priming*. Porém, a causa mais provável desse segundo aumento é o fato de as leituras terem sido realizadas a cada 48 horas, em vez de 24 horas. Como esse aumento da produção de CO_2 permaneceu elevado até o 51° dia, evidenciando uma intensificação metabólica. Esse aumento metabólico foi corroborado pelo aumento da concentração celular das bactérias hidrocarbonoclásticas, no sistema B_{Nu} , que apresentaram um aumento da concentração no período de $t=28$ a $t=42$, seguindo por outro aumento da entre os tempos 42 e 56 dias. Esses achados sugerem a correlação entre o aumento da respiração basal, isto é, a biodegradação do óleo diesel, e o aumento da concentração de bactérias hidrocarbonoclásticas (YALAOUI-GUELLAL *et al.* 2020).

Como pode se observar pela Figura 25, as produções do CO_2 no 51° dia nos respirômetros B_{Nu} e B_{Nu+Xa} começaram a declinar, mostrando que as substâncias de maior facilidade de biodegradação estavam diminuindo (MAZZEO *et al.*, 2020). O óleo diesel é uma mistura de hidrocarbonetos, apresentando componentes com diferentes graus de facilidade de biodegradação. Devido à essa mistura de vários componentes, a biodegradação dos hidrocarbonetos pode ser dividida em três fases distintas: rápida, estável e lenta (MACCI *et al.*, 2021). Neste experimento, as três fases foram observadas nos biorreatores B_{Nu} e B_{Nu+Xa} .

A Figura 26 apresenta a produção total de CO_2 obtida ao final dos 84 dias de incubação. Conforme o esperado, a taxa de respiração basal dos respirômetros B_{Nu} e B_{Nu+Xa} foi maior do que a observada nos respirômetros B_{Ct} e B_{Di} . Esse resultado é devido à ausência de carga de poluente em B_{Ct} , e à não estimulação com nutrientes B_{Di} artificialmente contaminado com óleo diesel.

Figura 26 - Produção total de CO_2 nos testes de respirometria ao final de 84 dias de incubação



Fonte: A Autora (2023)

O resultado obtido na produção acumulada de CO_2 dos respirômetros B_{Nu} e B_{Nu+Xa} foi 3 vezes maior do que o obtido no B_{Di} , comprovando a eficácia da estimulação por nutrientes em um sistema que se deseja realizar a biorremediação. Segundo Pontes *et al.* (2015), a biorremediação com bioestímulo de nutrientes pode favorecer consideravelmente a eficiência da biodegradação de um poluente em solo. Conforme evidenciado na Figura 26, a adição da goma xantana provocou um discreto aumento da produção total de CO_2 . Entretanto, essa variável pode ser considerada relativamente insignificante no âmbito estatístico.

4.7.1 Eficiência da biodegradação

Conforme evidenciado na **seção 3.3**, os biorreatores B_{Di} , B_{Nu} e B_{Nu+Xa} foram contaminados artificialmente com 5% de óleo diesel. Foi considerado que 84,6% da massa adicionada de óleo diesel era biodegradável, ou seja, 84,6% de carbono orgânico total, conforme demonstrado em Apêndice. Com os dados de análise do COT inicial da amostra de solo, fazendo-se o cálculo para a massa de solo e contaminante dos respirômetros B_{Ct} , B_{Di} , B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , conforme Equação 15 e Equação 16

$$m_{solo} = 50g; COT_{inicial} = 0,70\% \therefore m_{COT\ inicial} = 0,35\ g \quad \text{Equação 15}$$

$$m_{solo} = 50g; m_{COT\ solo} = 0,35\ g; m_{\acute{o}leo\ diesel} = 2,5\ g; COT_{\acute{o}leo\ diesel} = 84,6\% * 2,5 = 2,115g \therefore COT_{total} = 2,465g \quad \text{Equação 16}$$

A Tabela 9 apresenta as quantidades de carbono orgânico total iniciais calculadas, somando-se os COT inicial natural do solo e o COT do óleo diesel.

Tabela 9 - Carbono orgânico total inicial dos biorreatores

Carbono orgânico total	Resultado (mol)
B_{Ct} ,	0,0300
B_{Di}	0,2054
B_{Nu}	0,2054
B_{Nu+Xa}	0,2054

Fonte: A Autora (2023)

O acúmulo de CO_2 dos quatro sistemas estudados está exposto na Tabela 10, valor de carbono orgânico biodegradado pelos sistemas estudados.

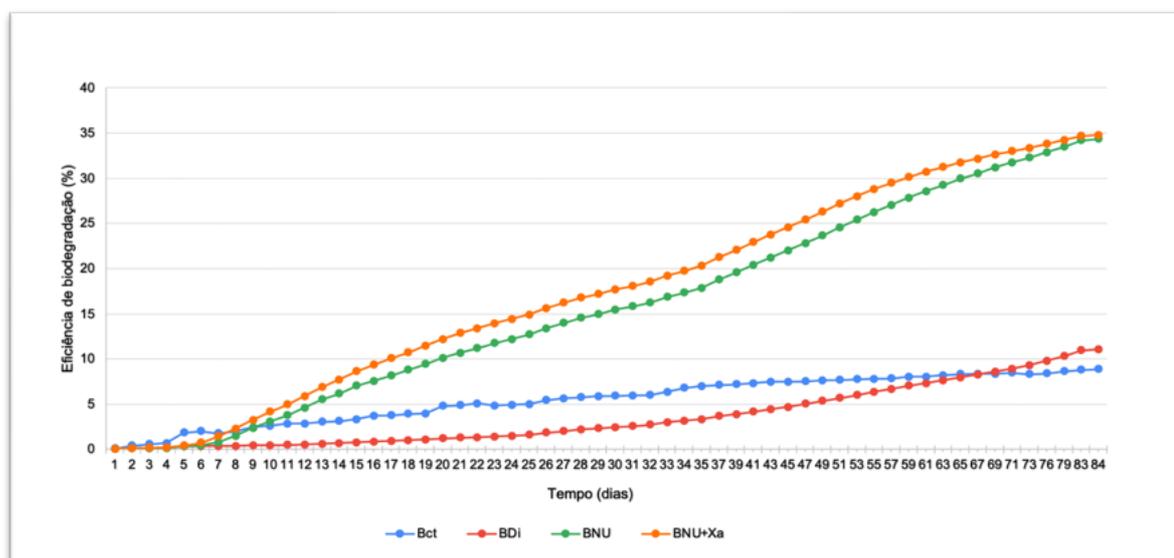
Tabela 10 - Carbono orgânico acumulado no tempo de 84 dias de incubação

Carbono orgânico total degradado acumulado	Resultado (mol)
B_{Ct} ,	1,4750E-03
B_{Di}	1,1389E-02
B_{Nu}	3,5278E-02
B_{Nu+Xa}	3,5720E-02

Fonte: A Autora (2023)

A eficiência de biodegradação pelo ensaio de respirometria foi calculado dividindo-se a quantidade carbono orgânico total biodegradado na amostra pela quantidade de carbono orgânico presente na amostra inicial. Para o cálculo da biodegradação do óleo diesel, admitiu-se que 50% do carbono biodegradado foram transformados em $CO_2(g)$ e 50% restante, transformado em biomassa (ABNT,1999). Portanto, o acumulado de $CO_2(g)$ produzido foi multiplicado por dois, para posterior cálculo da eficiência da biodegradação. A Figura 27 apresentam a eficiência de biodegradação dos sistemas B_{Ct} , B_{Di} , B_{Nu} e B_{Nu+Xa} .

Figura 27 - Eficiência de biodegradação



Fonte: A Autora (2023)

Com base na Figura 27, pode-se observar que as eficiências de biodegradação dos biorreatores B_{Nu} e B_{Nu+Xa} atingiram êxito em suas eficiências de biodegradação. Nota-se que a biodegradação teve um comportamento gradual durante todo o período de incubação de 84 dias. Ao observar as curvas dos biorreatores B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , pode-se notar um truncamento relativamente acentuado, sugerindo a ideia de que se o período de incubação tivesse sido estendido, as taxas de biodegradação poderiam ter sido maiores. Considerando que o óleo diesel é uma mistura complexa, alguns dos seus componentes são conhecidos como substâncias recalcitrantes, o que implica em um tempo de biodegradação mais prolongado. A Tabela 11 apresenta os valores numéricos das eficiências de biodegradação encontradas.

Tabela 11 - Valores de eficiência de biodegradação

Eficiência de biodegradação	Resultado (%)
Solo Controle (B_{Ct})	10,10
Solo diesel (B_{Di})	11,10
Solo nutrientes (B_{Nu})	34,35
Solo goma xantana (B_{Nu+Xa})	34,78

Fonte: A Autora (2023)

Embora os resultados alcançados na biodegradação do óleo diesel em solo no sistema B_{NU+Xa} não tenham atingido uma otimização comparável ao sistema B_{Nu} , a (GX) se apresenta como um aditivo de relevância a ser investigado nos fenômenos relacionados à biorremediação de solos contaminados com petróleo e seus derivados. Seu potencial como componente promissor na busca por soluções eficazes para a remediação de áreas afetadas por derramamentos de petróleo abre caminho para aprofundar estudos sobre seu papel e contribuição nesse contexto ambientalmente crítico. De acordo com estudos de Wang *et al.* (2017), a GX é um aditivo ecologicamente correto e efetivo na dispersão petróleo. Ao ser combinada com o emulsificante Corexit 9500, a GX resultou em uma taxa de biodegradação de 50% do petróleo presente numa matriz aquosa em 14 dias. Além disso, observou-se que a presença da GX permitiu a redução significativa na quantidade do dispersante Corexit 9500 para alcançar o mesmo desempenho na dispersão e, conseqüentemente, na biodegradação do petróleo.

Mariano *et al.* (2007), obtiveram uma taxa de 19,8% na biodegradação, em termos de mineralização, em solo arenoso contaminado com óleo diesel, no período de incubação de 55 dias. Para isso, foi ajustada a proporção dos nutrientes nitrogênio e fósforo, em relação ao carbono, para (100:15:1), e o surfactante Tween 80 na concentração de 0,2% (m/m), e adição de $10^5 UFC/g$ de consórcio bacteriano contendo as espécies: *Ochrobactrum anthropi*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Bacillus cereus*, isolados de biorremediação por *landfarming* da refinaria de petróleo Replan, localizada no município de Paulínia (SP). Em contraste, a bioestimulação com os nutrientes nitrogênio e fósforo, e o surfactante Tween 80, resultou em uma taxa de eficiência de mineralização de 15,2%, e a bioestimulação somente com nutrientes, 13,5%.

Seguindo o mesmo padrão de respiração basal, dos solos B_{Ct} e B_{Di} , exibiram eficiências de biodegradação constantes, conforme demonstrada na Figura 27, com B_{Ct} apresentando menor eficiência do que a B_{Di} , explicado pelo controle não ter sido contaminado com o óleo diesel. Além disso, o solo natural apresenta baixa quantidade de carbono degradável, o que conseqüentemente resultou em uma taxa reduzida de respiração basal. A eficiência de biodegradação obtida pelo biorreator sem bioestimulante comprova que a microbiota indígena contida no solo estudado necessita de um balanceamento adequado de nutrientes para ativar as vias metabólicas viáveis para o processo de biodegradação do óleo diesel. De acordo

com Mariano *et al.* (2007), a taxa de eficiência de biodegradação, em termos de mineralização, para o biorreator controle, contendo apenas o solo arenoso, foi de 8,1%.

Baseado em referências mencionadas, os resultados de eficiência de biodegradação em relação à mineralização dos compostos orgânicos contidos nos quatro sistemas estudados, considerando o carbono orgânico natural do solo no caso do B_{Ct} e o óleo diesel nos sistemas B_{Di} , B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , são congruentes com a técnica empregada neste estudo.

4.8 EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO ÓLEOS E GRAXAS

Como variável de resposta ao estímulo na biorremediação do óleo diesel, foi realizada a quantificação dos óleos e graxas (O&G) inicial e ao final dos 84 dias de experimento de biodegradação (respirometria). A concentração de óleo e graxas residuais era 0,25%, concentração inicial do B_{Ct} . Os sistemas B_{Di} , B_{Nu} e B_{Nu+Xa} foram contaminados com 5% (m/m) de óleo diesel S10, portanto a contaminação inicial de óleos e graxas era 5,70%, 5,80% e 5,82%, respectivamente. A contaminação próxima a 5% viabiliza o estudo da biorremediação em laboratório, pois concentrações muito altas de poluente podem inibir o metabolismo microbiano (KEBEDE *et al.*, 2021). A Tabela 12 apresenta ao teor de óleos e graxas no tempo inicial e final.

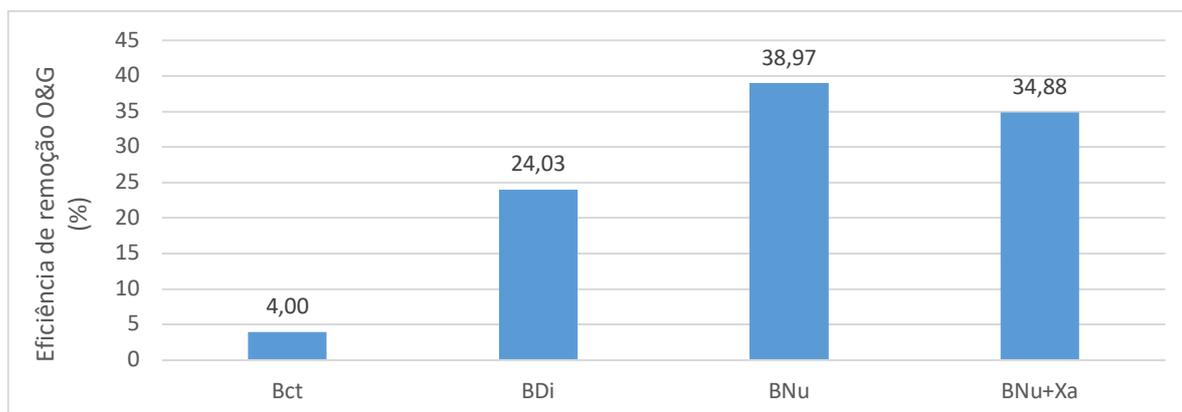
Tabela 12 - Teor de óleo e graxas

Tempo (dias)	B_{Ct} (%)	B_{Di} (%)	B_{Nu} (%)	B_{Nu+Xa} (%)
0	0,25	5,70	5,80	5,82
84	0,24	4,33	3,54	3,79

Fonte: A Autora (2023)

A Com o objetivo de monitorar a biodegradação do óleo em diesel nos sistemas de solo B_{Ct} , B_{Di} , B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , calculou-se os valores de eficiência de remoção quanto ao teor de óleos e graxas das estratégias de biorremediação empregada neste trabalho, apresentado na Figura 28.

Figura 28 - Eficiência remoção óleos e graxas



Fonte: A Autora (2023)

O teor dos O&G do sistema B_{Ct} teve uma pequena diminuição em relação ao teor inicial, com biodegradação de 4,00%. De acordo com os resultados obtidos na quantificação microbiológica e na taxa de biodegradação no ensaio de respirometria do B_{Ct} , a redução dos O&G está coerente com a presença da concentração celular bacteriana capaz de degradar o óleo residual do solo.

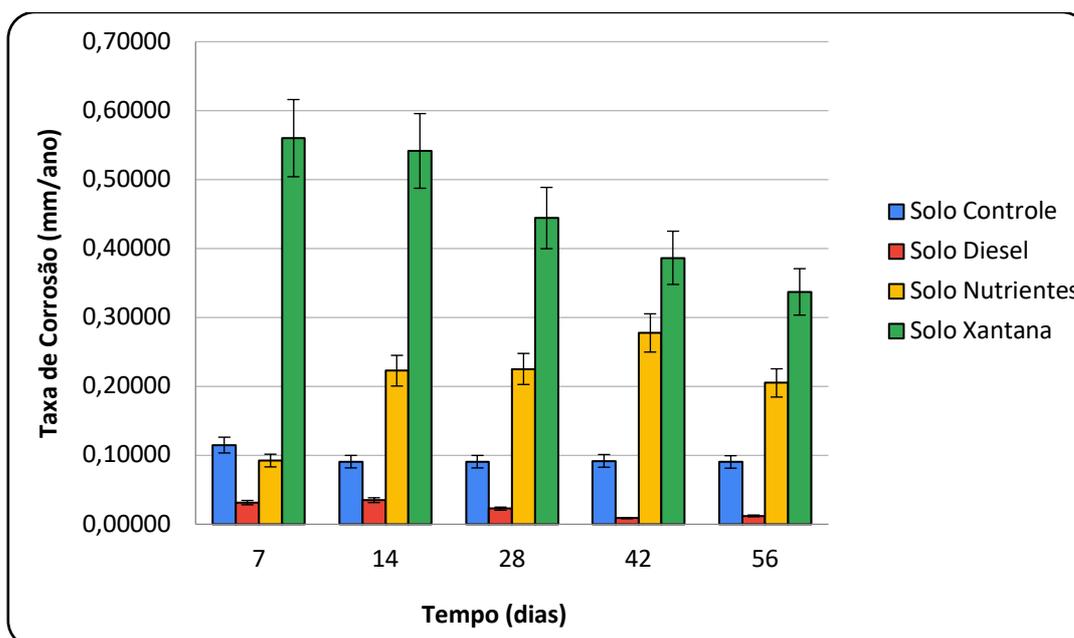
Os sistemas B_{Di} , B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , que foram contaminados com óleo diesel, resultaram em uma eficiência de remoção dos O&G maior do que a do sistema de controle, 24,03%, 38,97% e 34,88%, respectivamente. A bioestimulação de nutrientes dos sistemas B_{Nu} e B_{Nu+Xa} resultou em um aumento significativo na remoção dos óleos e graxas, sendo quase duas vezes mais eficiente do que o sistema B_{Di} . O B_{Di} apresentou uma concentração de bactérias aceitável para a biorremediação, que pode ter corroborado para a redução do teor de O&G. Essa redução, provavelmente, está relacionada também às intempéries naturais do solo, incluindo fenômenos da volatilização e o processo de atenuação natural do solo (SILVA *et al.*, 2022). Notou-se uma relativa diferença na eficiência de remoção dos O&G dos microcosmos B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , possivelmente devido à adição de GX, que pode ter interferido na distribuição do óleo diesel e na biodisponibilidade de nutrientes aos microrganismos. Esse fator pode ter impactado negativamente o metabolismo microbiano, conforme evidenciado pela concentração das bactérias hidrocarbonoclásticas. No sistema B_{Nu+Xa} , a concentração dessas bactérias foi inferior em comparação com o sistema B_{Nu} , que demonstrou um crescimento maior durante parte do período experimental.

O estudo conduzido por Silva *et al.* (2022) alcançou uma notável remoção de 90,4% de O&G em experimento que avaliou a biodegradação em petróleo bruto em solo arenoso previamente contaminado com 4% de petróleo bruto. A biodegradação foi bioestimulada com a adição de nitrogênio e fósforo na proporção C:N:P (100:1,25:1) durante o período de 180 dias. A significativa taxa de remoção obtida nesse estudo pode ser atribuída à escolha da proporção de bioestímulo utilizada, a qual parece ter desempenhado um papel positivo nos resultados alcançados, além do tempo experimental e, também, as possíveis variáveis experimentais entre o presente estudo.

4.9 TAXA DE CORROSÃO

A Figura 29 exhibe as taxas de corrosão dos biorreatores B_{Ct} , B_{Di} , B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , nos tempos 7, 14, 28, 42 e 56 dias. Os resultados indicam que os cupons enterrados no biorreator B_{Ct} tiveram maior ataque corrosivo em comparação aos enterrados no biorreator B_{Di} . Essa discrepância pode ser explicada pelo fato do óleo diesel, mesmo sendo um fator que pode influenciar a corrosão microbiana, apresentar características protetivas em relação ao aço-carbono A36. O biorreator B_{Ct} exibiu um comportamento mais estável ao longo do experimento, mantendo uma taxa de corrosão em torno de 0,100 mm/ano. A corrosão no sistema controle pode ser atribuída a parâmetros do solo arenoso, que na ausência de fontes externas de nutrientes, possui caráter corrosivo.

Figura 29 - Taxa de corrosão dos biorreatores B_{Ct} , B_{Di} , B_{Nu} e B_{Nu+Xa}



Fonte: A Autora (2023)

O efeito inibitório da taxa de corrosão em presença de petróleo foi estudado por Procópio *et al.* (2021). Em seus estudos, avaliaram a corrosão do aço API 5L, enterrado em solo salino, sob diferentes condições experimentais: reator controle, reator contaminado com petróleo bruto e reator contaminado com petróleo bruto com adição de surfactante. As taxas de corrosão dos aços encontradas foram 0,084 mm/ano, 0,023 mm/ano e 0,064 mm/ano, respectivamente, evidenciando a inibição da corrosão do metal quando submetido a resíduo oleoso, como o petróleo.

No que se refere às taxas de corrosão para os cupons enterrados nos biorreatores B_{Nu} e B_{Nu+Xa} , evidenciou-se que os biorreatores contendo estímulo de nutrientes e goma xantana exibiram comportamentos mais corrosivos dentre todos os sistemas investigados. Conforme mencionado, a GX possui efeito sobre as propriedades reológicas dos meios, tais como a viscosidade, a capacidade de retenção, a coesão, entre outros. (BORGES *et al.*, 2008; BERKANE *et al.*, 2022). Mesmo em baixas concentrações, (0,5% proporção em massa), como no presente estudo, foi observada a nítida alteração no biorreator B_{Nu+Xa} após receber a carga de goma xantana, dando um comportamento similar à compactação do solo, com aumento da coesão do solo. O aumento da coesão do solo possivelmente foi responsável por um maior crescimento de BHAn (**seção 4.6**), que excretam metabólitos corrosivos mais próximos dos aços (VEDELA, 2003). É plausível que a

adição de goma xantana no biorreator tenha resultado na formação de zonas de aeração diferencial nos cupons de aço, devido ao aumento da viscosidade, coesão e à compactação diferenciada causada por esse biopolímero nos meios, provocando um acréscimo nas taxas de corrosão (JAMBO *et al.*, 2008; GENTIL; CARVALHO, 2022).

As características observadas neste estudo provavelmente decorrem das interações estabelecidas pelas moléculas de (GX), um biopolímero aniônico e hidrofílico. Devido a essas propriedades, a GX possui a capacidade de formar ligações químicas com as partículas do solo e a água presente no meio. Essas interações podem levar ao surgimento de ligações eletrostáticas e de hidrogênio (CHANG *et al.*, 2015).

Chang *et al.* (2015) conduziram experimentos envolvendo a aplicação da (GX) como tratamento para diferentes tipos de solo na engenharia da construção. O objetivo desses experimentos era investigar as melhorias nas propriedades do solo, como estabilidade, coesão e resistência à erosão. Os resultados revelaram que a GX conferiu um reforço significativo para todos os tipos de solo estudados, incluindo argiloso, arenoso, vermelho, amarelo e solo natural. Além disso, notaram que a GX apresentou a capacidade de promover cimentação quando em contato com partículas de areia. Outro achado relevante foi que, ao longo do tempo, o teor de umidade do solo diminuiu progressivamente, resultando em um aumento correspondente da resistência à compressão do solo.

Esses resultados corroboram para a compreensão dos fenômenos constatados no biorreator B_{NU+Xa} , o qual exibiu um aumento visual na coesão/compactação do solo, além da formação heterogênea de porções de solo sobre os cupons, contribuindo para o surgimento das zonas de aeração diferencial mencionadas anteriormente.

Durante o procedimento de decapagem dos cupons nos tempos de controle das taxas de corrosão, notou-se que os cupons retirados do biorreator B_{Di} apresentavam pouca aderência das partículas de solo sobre as superfícies, apresentado na Figura 19, ao passo que os cupons retirados do reator B_{NU+Xa} apresentaram alta aderência das partículas do solo, exposto na Figura 19. Essas observações, especialmente a aderência das partículas de solo de forma diferenciada nos cupons retirados do biorreator B_{NU+Xa} , corroboram com a explicação das maiores taxas de corrosão serem encontradas nesse biorreator.

De acordo com a literatura, a aeração diferencial é um fator conhecido por gerar a corrosão de estruturas metálicas enterradas ao solo (GENTIL; CARVALHO, 2022). A observação visual de que os cupons retirados do biorreator B_{NU+Xa} apresentavam grande quantidade de partículas de solo com alta aderência e de forma não uniforme, sugere uma explicação admissível para as taxas de corrosão maiores nesse biorreator, como pode ser visto na Figura 30, cupom do biorreator B_{NU+Xa} , com 14 dias de experimento. A aderência das partículas pode ter provocado a formação de zonas com diferentes níveis de aeração, aumentando assim o potencial de corrosão e levando aos resultados observados.

Figura 30 - Região de cupom com depósitos não uniformes de solo



Fonte: A Autora (2023)

Segundo Gentil & Carvalho (2022), as áreas onde as partículas são depositadas atuam como regiões anódicas, caracterizadas por baixa concentração de oxigênio, enquanto as áreas livres das partículas do solo desempenham o papel de regiões catódicas.

Ao longo dos 56 dias de estudo da taxa de corrosão dos aços, notou-se que os valores encontrados não apresentaram aumento gradual dos valores de taxas de corrosão ao longo do tempo. Os cupons enterrados no B_{Ct} apresentaram taxas de corrosão relativamente similares, na ordem de $0,0957 \pm 0,012 \text{ mm/ano}$. Já os cupons em B_{Di} iniciaram com taxas de corrosão relativamente mais elevadas, $0,0314 \pm 0,0034 \text{ mm/ano}$, e ao final dos 56 dias, taxa de corrosão de $0,0121 \pm 0,0025 \text{ mm/ano}$.

De acordo com a classificação NACE-RP-07-75, a taxa média de corrosão dos aços no biorreator controle foi considerada moderada, conforme Quadro 3. Por

outro lado, os cupons de aços enterrados no biorreator diesel apresentaram a corrosão classificada como baixa, indicando que o óleo diesel S-10 desempenhou um papel protetivo contra a corrosividade do solo

Os cupons enterrados em B_{Nu} apresentaram taxas de corrosão constantes ao longo do tempo. Acredita-se que as taxas de corrosão tenham sido influenciadas pela atividade microbiológica intrínseca ao processo de biorremediação do óleo diesel, promovida pela bioestimulação da microbiota presente no solo. A taxa de corrosão no período de 7 dias do B_{Nu} foi de $0,0923 \pm 0,0034 \text{ mm/ano}$, valor que aumentou para $0,2050 \pm 0,0184 \text{ mm/ano}$ ao final dos 56 dias. De acordo com a classificação NACE-RP-07-75, os cupons enterrados em B_{Nu} foram classificados com uma taxa de corrosão alta, evidenciando que o bioestímulo da microbiota presente no solo com nutrientes favorece a eficiência da biodegradação do óleo diesel S10. No entanto, em contrapartida, o aumento na concentração celular dos microrganismos também resultou em um aumento da taxa de biocorrosão dos aços.

Embora a taxa de biodegradação basal no sistema B_{Nu} tenha sido semelhante àquela observada no sistema B_{Nu+Xa} , a taxa corrosão do aço no período de 7 dias deste biorreator foi quase 6 vezes maior, apresentando taxa de corrosão de $0,5600 \pm 0,0077 \text{ mm/ano}$. De acordo Oliveira *et al.* (2016) e Silva *et al.* (2021), a GX em sistemas aquosos demonstrou atuar como inibidor de corrosão eficaz em superfícies metálicas. No entanto, em matriz sólida, como no caso deste experimento com solo, não foram observados efeitos protetivos contra a corrosão, indicando que a ação inibidora da corrosão pode ser específica para ambientes aquosos e não se estendem efetivamente a ambientes sólidos, como o solo. A GX pode apresentar variações moleculares, dependendo das bactérias produtoras, fontes de carbono e nutrientes dos meios, o que resulta em estruturas diferenciadas, com presença de grupamentos ácido glucurônico, ácido pirúvico e grupo acetil em diferentes concentrações. Essas variações moleculares podem levar a diferentes interações com a superfície do aço, bem como com o solo e seus componentes, consequentemente, aumentando as taxas de corrosão do aço. A GX, sendo um biopolímero viscoelástico, altera a compactação e coesão dos solos, gerando depósitos de partículas de solo não uniformes sobre a superfície do cupom de aço. Essa deposição não uniforme de partículas de solo, produtos de corrosão e biofilmes

resultou em zonas de aeração diferencial nas superfícies, o que elevou as taxas de corrosão dos aços enterrados em sistema B_{NU+Xa} .

Observou-se que a corrosividade do sistema contendo GX não aumentou ao longo do tempo, sendo as taxas de corrosão dos aços no tempo final menores do que as taxas iniciais. Possivelmente as características do solo, juntamente aos filmes de produtos de corrosão desempenharam barreira de proteção aos aços.

De uma forma geral as taxas de corrosão dos aços nos biorreatores estudados tiveram uma tendência de queda ao longo do tempo experimental. A heterogeneidade do solo, juntamente aos filmes formados de produtos de corrosão, possivelmente atuaram como barreiras protetivas ao aço. Segundo Silva *et al.* (2021), camadas de ferrugem depositadas sobre o substrato metálico podem desempenhar papel protetivo, fato observado nos resultados das taxas de corrosão dos aços reduzidas no tempo final de 56 dias.

Apesar disso, as taxas de corrosão dos aços no biorreator B_{NU+Xa} ainda foram classificadas como severas, de acordo com a norma NACE-RP-07-75, constatando o grau de corrosividade desempenhado por esse solo.

4.10 ANÁLISE MORFOLÓGICA CUPONS

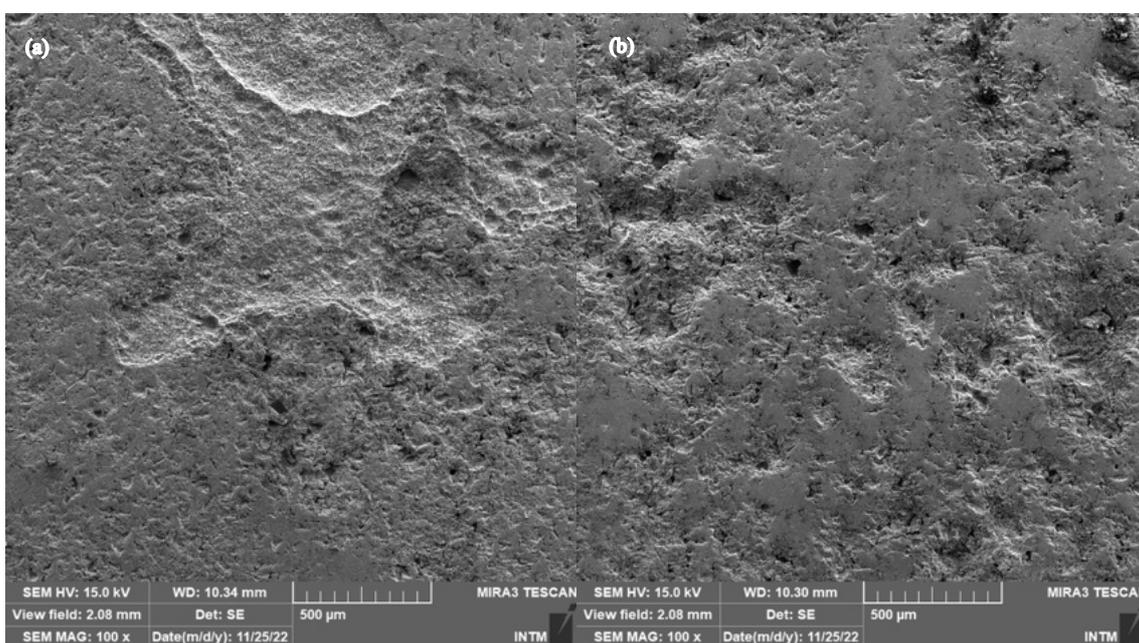
A Figura 31 apresenta as imagens de MEV das superfícies do aço A36 após a realização das decapagens ácidas, as quais removeram os produtos de corrosão. O aço submetido ao sistema B_{Ct} por 56 dias apresentou ataques localizados com formação de placas contendo escavações. Já o cupom submetido ao sistema B_{Di} apresentou alguns ataques localizados, porém com áreas relativamente não afetadas, em consonância com os resultados obtidos na análise das taxas de corrosão, indicando o óleo diesel como inibidor do processo corrosivo do solo.

Segundo Gentil & Carvalho (2022), os métodos de proteção temporária contra a corrosão atuam como uma barreira que impede a penetração da umidade e substâncias agressivas aos metais. No contexto específico do aço A36 submetido às condições presentes no biorreator B_{Di} , possivelmente o óleo diesel tenha atuado como um óleo protetivo, reduzindo o contato físico entre a superfície do aço e o meio agressivo, neste caso, o solo.

O efeito protetivo dos óleos em superfícies metálicas é amplamente estudado na proteção provisória contra a corrosão. Esses óleos podem ser de origem mineral ou

natural, dentre os quais o biodiesel de palmiste, que apresenta alta eficiência na proteção do aço SAE 1006, conforme relatado por Fontoura *et al.* (2019). Os ensaios realizados em nevoa salina demonstraram que apenas 0,76% da estrutura submetida foi danificada após a aplicação do biodiesel. A película formada sobre a superfície metálica impede a difusão de oxigênio e íons agressivos, bem como desloca moléculas de água (BOURAOUI *et al.*, 2019).

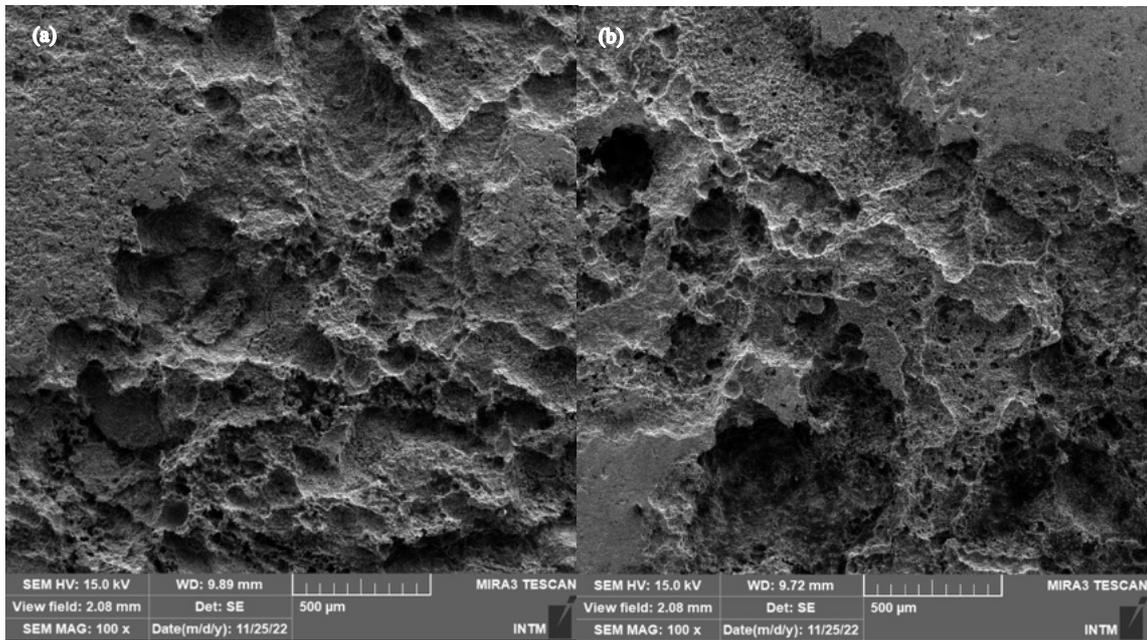
Figura 31 - Micrografia em MEV dos cupons dos sistemas: (a) B_{Ct} , (b) B_{Di} , no tempo de 56 dias



Fonte: A Autora (2023)

De acordo com Figura 32, observa-se que os cupons enterrados nos biorreatores B_{Nu} e B_{Nu+Xa} foram os mais afetados, em concordância com as taxas de corrosão encontradas. Possivelmente, isto ocorreu porque o bioestímulo à microbiota do solo resultou em uma maior eficiência da degradação do óleo diesel, ao passo que o efeito protetor que óleo diesel desempenhou no reator B_{Di} não foi observado nos biorreatores B_{Nu} e B_{Nu+Xa} . Pela micrografia, foi possível constatar que as superfícies desses cupons tiveram danos significativos, com presença escavações, e que o biorreator B_{Nu+Xa} apresentou placas com escavações mais profundas em comparação com os demais cupons.

Figura 32 - Micrografia em MEV dos cupons dos sistemas: (a) B_{Nu} , (b) B_{Nu+Xa} , no tempo de 56 dias



Fonte: A Autora (2023)

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no estudo da biorremediação com bioestímulo em solo arenoso, baseado no quadro experimental de quatro sistemas (solo controle B_{Ct} , solo diesel B_{Di} , solo nutrientes B_{Nu} e solo xantana B_{NU+Xa}), permitiram identificar os fatores que contribuem para a eficácia da técnica de biorremediação em resposta a um vazamento de óleo diesel em solo. A suplementação dos nutrientes nitrogênio e fósforo, ajustado em conformidade com o balanceamento do carbono orgânico natural de solo e o carbono adicional proveniente da contaminação artificial com óleo diesel, mostrou-se eficaz na bioestimulação da microrganismos autóctones do solo. Além disso, os ajustes de umidade e oxigenação dos solos, por meio do revolvimento do solo, foram fatores importantes nas taxas de biodegradação do contaminante óleo diesel.

As taxas de biodegradação de 10,10% e 11,10% nos sistemas B_{Ct} e B_{Di} , respectivamente, evidenciaram que a capacidade de biodegradação da microbiota não estimulada do solo é muito baixa. Esses resultados indicam que a microbiota indígena não foi suficiente para promover a degradação do óleo diesel ao longo do período de 84 dias de incubação. A biodegradação dos sistemas B_{Nu} e B_{NU+Xa} , 34,35% e 34,78%, respectivamente, comprovaram que o bioestímulo da microbiota do solo com aporte de nutrientes, fez com que o número de indivíduos aumentasse, propiciando a ativação das vias metabólicas capazes de degradar o óleo diesel.

A quantificação microbiológica realizada foi essencial para compreender o estímulo dos microrganismos no solo. Embora, em alguns momentos o aumento na concentração bacteriana não seguiu um padrão de aumento linear, as análises mostraram que o bioestímulo teve resultados satisfatórios no crescimento dos grupos bacterianos quantificados, como por exemplo, das bactérias hidrocarbonoclásticas, em que houve um aumento de quase 100 vezes na concentração bacteriana, indicando a eficácia do bioestímulo como estratégia de biorremediação em solo contaminado com óleo diesel.

A taxa de remoção dos óleos e graxas foi avaliada como uma segunda variável de controle da biorremediação do óleo diesel. Os resultados mostraram que o bioestímulo realizado com goma xantana teve um efeito negativo na eficiência de remoção dos óleos e graxas. Fato que pode ser explicado pelas propriedades emulsificantes e possíveis ligações químicas surgidas entre o sistema - GX, solo,

água e óleo diesel) – que provavelmente provocou alteração na viscosidade e dinâmica de distribuição entre os componentes presentes no sistema B_{NU+Xa} , podendo inclusive ter influenciado na análise de O&G, que foi realizada pelo método gravimétrico, uma vez que eficiência de biodegradação dos sistemas B_{Nu} e B_{NU+Xa} foram muito semelhantes.

Por outro lado, a taxa de remoção dos óleos e graxas no sistema B_{Nu} evidenciou que o estímulo nutricional da microbiota nativa do solo possui excelente resposta na remoção do óleo diesel em termos de óleos e graxas, com eficiência de 38,97% em 84 dias.

Atrelado ao estudo de biorremediação do óleo diesel, viu-se a necessidade de se avaliar a corrosividade dos sistemas estudados ao aço A36. Os resultados demonstraram que a estratégia de biorremediação bem-sucedida estimula os processos corrosivos aos metais. Com base nos valores das taxas de corrosão dos aços, notou-se que as maiores taxas de corrosão foram encontradas para os cupons enterrados em B_{Nu} e B_{NU+Xa} , sendo que a presença de goma xantana no biorreator B_{NU+Xa} aumentou significativamente o ataque corrosivo aos cupons, com a classificação da corrosão dos aços como alta e severa, respectivamente de acordo com os critérios estabelecidos pela NACE-RP-07-75

Os resultados obtidos por meio deste estudo serão úteis para a seleção das técnicas de biorremediação mais adequadas em áreas de solo contaminado com hidrocarbonetos, que possuam estruturas metálicas enterradas ou em contato com solo, como tanques de armazenamento ou tubulações, por exemplo.

Com a finalidade de aprimorar e abordar certas dificuldades enfrentadas durante o decorrer do experimento, torna-se pertinente a implementação de controles e a realização de aprimoramentos que possam ser aplicados em pesquisas subsequentes. Entre essas abordagens, destaca-se a incorporação de um pHmetro que viabilize o monitoramento diário do pH dos sistemas, juntamente com medições cotidianas de umidade e temperatura. Esses fatores constituem variáveis críticas que exercem influência sobre os processos de biodegradação e corrosão presentes no solo. Além disso, sugere-se a fabricação de um reator homogeneizador específico para o solo, visando garantir a homogeneidade dos nutrientes e da goma xantana que são adicionados aos sistemas.

REFERÊNCIAS

ABDALA, Vitor. Acidente com trem que levava 60 mil litros de óleo ameaça mangues do Rio. **Agência Brasil Empresa Brasil de Comunicação**. Publicada em 26, abril de 2005. Disponível em <<http://memoria.ebc.com.br/agenciabrasil/noticia/2005-04-26/acidente-com-trem-que-levava-60-mil-litros-de-oleo-ameaca-mangues-no-rio>>. Acesso em 14 abril 2021.

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

Acidente Ambiental provoca vazamento de 200 litros de diesel em Santa Catarina. *Diário Catarinense*. Santa Catarina, 26, maio, 2011. Disponível em <https://www.canalrural.com.br/noticias/acidente-ambiental-provoca-vazamento-200-litros-diesel-santa-catarina-14193/>. Acesso em 14 abril 2021.

ALI, Nedaa; Dashti, N.; Salamah, S.; Al-Awadhi, H.; Sorkhoh, N.; Radwan, S. Autochthonous bioaugmentation with environmental samples rich in hydrocarbonoclastic bacteria for bench-scale bioremediation of oily seawater and desert soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 8686-8698, 2016

ANDRADE, Juliano de Almeida; AUGUSTO, Fabio; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética química**, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.

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

ASKARI, M.; ALIOFKHAZRAEI, M.; AFROUKHTEH, S. Uma revisão abrangente sobre corrosão interna e rachaduras de oleodutos e gasodutos. **Journal of Natural Gas Science and Engineering**, v. 71, p. 102971, 2019. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.jngse.2019.102971>>. Acesso em 14 abril 2023.

AZEVEDO, Nuno *et al.* Biofilmes: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria. 1 ed. Porto: Publindústria, Edições Técnicas, 2012.

BAJARES, R. A.; DI MELLA, L. Study of the Corrosion Rate in the Couple of Steels ASTM A-36 and AISI/SAE 304 in a Water-coke of Petroleum System. **Procedia Materials Science**, v. 8, p. 702-711, 2015. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.mspro.2015.04.127>>. Acesso em 12 maio 2023.

BALSEIRO-ROMERO, Maria; MONTERROSO, Carmen; CASARES, Juan J. Environmental fate of petroleum hydrocarbons in soil: review of multiphase transport, mass transfer, and natural attenuation processes. **Pedosphere**, v. 28, n. 6, p. 833-847, 2018. Disponível em <[https://doi.org/10.1016/S0920-4105\(00\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0920-4105(00)00031-0)>. Acesso em 27 mar. 2023.

BAPTISTA, S. J.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. D. C. Avaliação da bioestimulação em solos argilosos contaminados com petróleo. In: **Congresso**

Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2, 2003, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: ABPG, 2003.

BERKANE, Hachemi Adda *et al.* Laboratory investigation on the effect of a combination of xanthan gum and clay on the behavior of sandy soil. **Innovative Infrastructure Solutions**, v. 7, n. 4, p. 269, 2022.

BORGES, Caroline Dellinghausen; VENDRUSCOLO, Claire Tondo. Goma Xantana: características e condições operacionais de produção. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 2, p. 171-188, 2008. Disponível em <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semnabio/article/view/3465>>. Acesso em 17 mai. 2021.

BOSCO, Francesca *et al.* Microcosm evaluation of bioaugmentation and biostimulation efficacy on diesel-contaminated soil. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 95, n. 4, p. 904-912, 2020.

BOURAOUI, Mohamed Monder *et al.* Inhibition efficiency of cinnamon oil as a green corrosion inhibitor. **Journal of Bio-and Tribo-Corrosion**, v. 5, p. 1-9, 2019. Disponível em <<https://doi.org/10.1007/s40735-019-0221-0>>. Acesso em 22 de abril 2023.

CÂNDIDO, Taíssa Guedes; MEIRA, Gibson Rocha; DE ABREU, Márcia Suzanna Dutra. Avaliação do processo de corrosão em armaduras comuns e galvanizadas. **Revista Principia-Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB**, n. 51, p. 148-157, 2020. Disponível em <<https://novo.periodicos.ifpb.edu.br/index.php/principia/article/view/3987/1432>>. Acesso 13 abril 2023.

CANUTO, R. A. **Dehydrogenases**. InTech Design Team. Croatia. P. 366, 2012.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo 2**. ESALQ, 2 ed. Piracicaba, SP: 2016. Disponível em <https://www.researchgate.net/profile/Daniel-Bini/publication/311788702_Metabolismo_Microbiano/links/585a809908ae64cb3d4ac507/Metabolismo-Microbiano.pdf>. Acesso em 19 abril 2023.

CARMO, Davi Lopes do; SILVA, Carlos Alberto. Métodos de quantificação de carbono e matéria orgânica em resíduos orgânicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 1211-1220, 2012. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/S0100-06832012000400015>>. Acesso em 20 out. 2021.

COUTINHO, Pablo Wenderson Ribeiro *et al.* Alternativas de remediação e descontaminação de solos—Biorremediação e Fitorremediação. **Nucleus**, v. 12, n. 1, p. 59-68, 2015.

COVIZZI, Luiz Gustavo *et al.* Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. Semina: **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 143-160, 2007. Disponível em <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/view/1897/1601>>. Acesso em 29 abril 2021.

CBN RECIFE. Refinaria Abreu e Lima é multada por vazamento de óleo. 15/09/2019. Disponível em <<https://www.cbnrecife.com/artigo/refinaria-abreu-e-lima-e-multada-por-vazamento-de-oleo>>. Acesso em 29 agosto 2022.

CHEN-CHARPENTIER, Benito M.; KOJOUHAROV, Hristo V. Biofilms in Porous Media: Mathematical Modeling and Numerical Simulation. **Environmental Bioremediation Technologies**, p. 481-511, 2007.

CURIEL-ALEGRE, Sandra et al. Evaluation of biostimulation, bioaugmentation, and organic amendments application on the bioremediation of recalcitrant hydrocarbons of soil. **Chemosphere**, v. 307, p. 135638, 2022

DAS, Nilanjana; CHANDRAN, Preethy. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. **Biotechnology research international**, v. 2011, 2011.

DA SILVA, Luciano Procópio. Estudos fisiológicos e moleculares da estirpe degradadora de hidrocarbonetos do petróleo *Dietzia cinnamea* P4. 2010. **Tese de Doutorado**. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO.

DA SILVA, Neusely *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 6. Ed. – São Paulo: Editora Blucher, 2021. 602 p.

DE MELO, Itamar Soares; De Azevedo, João Lúcio. Microbiologia ambiental. **Embrapa Meio Ambiente**-Livro científico (ALICE), 2008. Disponível em <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/15285>>. Acesso em 27 mar. 2023.

DE SOUZA, Rebeca. Sistema de atendimento a emergências ambientais causadas por vazamento de petróleo: uma análise a partir sa lei n. ° 9.966/2000 e de seus regulamentos. **Revista Brasileira de Direito do Petróleo, Gás e Energia**, v. 5, n. 1, p. 189-210, 2018.

DIAS, Ricardo D.C. *et al.* Acúmulo de biomassa e potássio em gramíneas em função da fonte fertilizante e do solo. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 33506-33518, 2020. Disponível em <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/14301/13379>>. Acesso 12 abril 2023.

DÍAZ, María Piedad *et al.* Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. **Biotechnology and bioengineering**, v. 79, n. 2, p. 145-153, 2002.

DIAZ, Patrícia Silva; VENDRUSCOLO, Claire Tondo; VENDRUSCOLO, João Luiz Silva. Reologia de Xantana: uma revisão sobre a influência de eletrólitos na viscosidade de soluções aquosas de gomas xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 15-28, 2004. Disponível em <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/view/1557>>. Acesso em 17 mai. 2021.

DZIOŃEK, Anna; WOJCIESZYŃSKA, Danuta; GUZIK, Urszula. Use of xanthan gum for whole cell immobilization and its impact in bioremediation-a review. **Bioresource Technology**, v. 351, p. 126918, 2022.

DZIOŃEK, Anna *et al.* Xanthan gum as a carrier for bacterial cell entrapment: Developing a novel immobilised biocatalyst. **Materials Science and Engineering: C**, v. 118, p. 111474, 2021. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article>>. Acesso em 25 mai. 2021.

ELELLA, Mahmoud H. Abu *et al.* Xanthan gum-derived materials for applications in environment and eco-friendly materials: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 104702, 2021.

EPBR. Análise do mercado de derivados no Brasil em 2020, por Fernanda Delgado e Marcelo Gauto. 04/01/2021. Disponível em <<https://epbr.com.br/analise-do-mercado-de-derivados-no-brasil-em-2020-por-fernanda-delgado-e-marcelo-gauto/>>. Acesso em 29 agosto 2022.

EXAME. Vazamento na refinaria Abreu e Lima, da Petrobras, atinge mangue em PE. 27/08/2019. Disponível em <<https://exame.com/brasil/vazamento-de-oleo-em-refinaria-da-petrobras-atinge-area-de-mangue-em-pe/>>. Acesso em 29 agosto 2022.

FRENCH, Katherine E.; ZHOU, Zhongrui; TERRY, Norman. Horizontal 'gene drives' harness indigenous bacteria for bioremediation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 15091, 2020.

FONTOURA, Luiz Antonio Mazzini; HELDT, Lauri. Avaliação de desempenho do biodiesel como protetivo temporário contra corrosão em metais. In: **XIX fórum de pesquisa científica e tecnológica (canoas)**. 2019. Disponível em <<http://www.conferencias.ulbra.br/index.php/fpu/xixforum/paper/view/13042>>. Acesso em 22 abril 2023.

FRAUCHES-SANTOS, Cristiane *et al.* A corrosão e os agentes anticorrosivos. **Revista virtual de química**, v. 6, n. 2, p. 293-309, 2014. Disponível em <<https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/490/422>>. Acesso em 13 abril 2023.

FROEHNER, Sandro; MARTINS, Raquel Fernandes. Avaliação do destino e bioacumulação de benzo (a) pireno através de simulação computacional. **Química nova**, v. 31, p. 1089-1093, 2008.

GARRIDO-SANZ, D.; Redondo-Nieto, M.; Guirado, M.; Pindado Jiménez, O.; Millán, R.; Martín, M.; Rivilla, R. Metagenomic Insights into the Bacterial Functions of a Diesel-Degrading Consortium for the Rhizoremediation of Diesel-Polluted Soil. **Genes**. 2019, 10, 456. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/genes10060456>>. Acesso em: 03 de mar. de 2023.

GAYLARDE, Christine Claire; BELLINASO, Maria de Lourdes; MANFIO, Gilson Paulo. Biorremediação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43, 2005.

GEMELLI, E. Corrosão de materiais metálicos e sua caracterização. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2001.

GENTIL, V.; CARVALHO, L. J. Corrosão. 7ª ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2022. p. 408.

GONZÁLEZ, Héctor H. Riojas *et al.* Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. **Living Chemistry**, v. 9, n. 3, pág. 120-145, 2010. Disponível em <<https://www.redalyc.org/pdf/863/86315692003.pdf>>. Acesso em 13 mai. 2021.

GOLDIN, A., 1987. Reassessing the use of loss-on-ignition for estimating organic matter content in noncalcareous soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 18 (10), 1111–1116.

GMAP: From mined-out areas to mini-forests. *The Manila Times*, 2023. Disponível em: <<https://www.manilatimes.net/2023/02/18/business/green-industries/gmap-from-mined-out-areas-to-mini-forests/1879156>>. Acesso em: 01 de mar. de 2023.

HACK, Celia. State issues final \$13.9 million cleanup plan for toxic site at 29th and Grove. *Kmuw*, 2023. Disponível em: <<https://www.kmuw.org/news/2023-02-08/state-issues-final-cleanup-plan>>. Acesso em: 01 de mar. de 2023.

HANSON, K. G. *et al.* News & Notes: Bioremediation of crude oil contamination with *Acinetobacter sp. A3*. **Current microbiology**, v. 35, n. 3, p. 191-193, 1997.

HU, Dong *et al.* A survey of microbial contamination in aviation fuel from aircraft fuel tanks. **Folia microbiologica**, v. 65, p. 371-380, 2020. Disponível em <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12223-019-00744-w>>. Acesso em 25 de mar. de 2023.

IQBAL, Aneela *et al.* Development of plant-microbe phytoremediation system for petroleum hydrocarbon degradation: an insight from alkb gene expression and phytotoxicity analysis. **Science of the Total Environment**, v. 671, p. 696-704, 2019.

IVANOVA, A.A., Mullaeva, S.A., Sazonova, O.I. *et al.* Current research on simultaneous oxidation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by bacteria of genus *Pseudomonas*. **Folia Microbiol** 67, 591–604 (2022). Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12223-022-00966-5>>. Acesso em: 02 de mar. de 2023.

JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti *et al.* Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

JAMBO, H. C. M.; FÓFANO, S. Corrosão – Fundamentos, Monitoração e Controle. Rio de Janeiro: Editora Ciência Moderna Ltda, 2008. 342p.

JAMES G, Warwood B, Hiebert R, Cunningham A. Microbial barriers to the spread of pollution. In: Valdes JJ (ed) Bioremediation. **Springer**, Dordrecht, pp 1–13, 2000.

JAVAHERDASHTI, Reza. Some thoughts about misconceptions surrounding the term 'biofilm'. **Corrosion Engineering, Science and Technology**, v. 55, n. 8, p. 681-684, 2020.

JAVAHERDASHTI, R.; ALASVAND, K. Biological treatment of microbial corrosion: opportunities and challenges. Amsterdam: **Elsevier**, 2019. P. 11-24

JERÔNIMO, Carlos Enrique de Medeiros; KITZINGER, W. G. C. M. Dimensionamento de um landfarming para tratamento de borras oleosas utilizando critérios de um reator batelada. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas-UFSM**, Santa Maria, e-ISSN, v. 2236, 2014.

KEBEDE, Gessesse *et al.* Factors influencing the bacterial bioremediation of hydrocarbon contaminants in the soil: mechanisms and impacts. **Journal of Chemistry**, v. 2021.

KIM, Changkyu *et al.* Global and local parameters for characterizing and modeling external corrosion in underground coated steel pipelines: A review of critical factors. **Journal of Pipeline Science and Engineering**, v. 1, n. 1, p. 17-35, 2021. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.jpse.2021.01.010>>. Acesso em 13 abril 2023.

LARCO. 40% um barril de petróleo viram diesel e 18% gasolina após o refino. PETRÓLEO Disponível em <<https://www.larcopetroleo.com.br/noticias/40-de-um-barril-de-petroleo-viram-diesel-e-18-gasolina-apos-o-refino/>>. Acesso em 29 agosto 2022.

KIM, Changkyu *et al.* Global and local parameters for characterizing and modeling external corrosion in underground coated steel pipelines: A review of critical factors. **Journal of Pipeline Science and Engineering**, v. 1, n. 1, p. 17-35, 2021. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.jpse.2021.01.010>>. Acesso em 14 abril 2023.

KIM, Sang Hyun *et al.* What determines the efficacy of landfarming for petroleum-contaminated soils: Significance of contaminant characteristics. **Chemosphere**, v. 290, p. 133392, 2022. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133392>>. Acesso em 25 de mar. de 2023).

KUMAR, Vankayalapati Vijaya. Microbial Remediation: A Natural Approach for Environmental Pollution Management. **Mycoremediation and Environmental Sustainability: Volume 3**, p. 171-185, 2021.

KURTH, Jonah C.; KRAUSS, Paul D.; FOSTER, Stephen W. Corrosion management of maritime infrastructure. **Transportation Research Record**, v. 2673, n. 12, p. 2-14, 2019. Disponível em < [0.1177/0361198119855333 journals.sagepub.com/home/trr](https://doi.org/10.1177/0361198119855333)>. Acesso em 12 maio 2023

KUZYAKOV, Yakov; FRIEDEL, J. K.; STAHR, Karl. Review of mechanisms and quantification of priming effects. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 11-12, p.

1485-1498, 2000. Disponível em <[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00084-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00084-5)>. Acesso 17 abril 2023.

LEAHY, Joseph G.; COLWELL, Rita R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.

LIANG, Fuyan *et al.* The organic composition of diesel particulate matter, diesel fuel and engine oil of a non-road diesel generator. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 7, n. 10, p. 983-988, 2005

LIMA, Suzy Darley de *et al.* Gerenciamento de áreas contaminadas por postos de combustíveis em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Revista Ambiente & Água**, v. 12, p. 299-315, 2017.

LIU, Hongwei; DAI, Yuning; CHENG, Y. Frank. Corrosion of underground pipelines in clay soil with varied soil layer thicknesses and aerations. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 3601-3614, 2020. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2019.11.006>>. Acesso em 13 abril 2023.

LIU, Xiao-Jun Allen *et al.* The soil priming effect: Consistent across ecosystems, elusive mechanisms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 140, p. 107617, 2020. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107617>>. Acesso em 17 abril 2023.

LONGO, Regina M.; RIBEIRO, Admilson Írio; MELO, Wanderley José de. Recuperação de solos degradados na exploração mineral de cassiterita: biomassa microbiana e atividade da desidrogenase. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p. 132-138, 2011. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/S0006-87052011000100019>>. Acesso em 10 mai 2021.

LU, C., Batianis, C., Akwafo, E.O. *et al.* When metabolic prowess is too much of a good thing: how carbon catabolite repression and metabolic versatility impede production of esterified α,ω -diols in *Pseudomonas putida* KT2440. **Biotechnology for Biotechnol** 14, 218 (2021). Disponível em <<https://doi.org/10.1186/s13068-021-02066-x>>. Acesso em: 03 de mar. de 2023.

LUCHESE, Eduardo Bernardi; FAVERO, Luzia O. B.; ERWIM, Lenzi. **Fundamentos da química do solo: teoria e prática**. Freitas Bastos, 2002.

MACCI, Cristina *et al.* Landfarming as a sustainable management strategy for fresh and phytoremediated sediment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 29, p. 39692-39707, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-021-13134-y>. Acesso em 26 de mar. de 2023.

MACHALE, Jinesh *et al.* Development of a novel biosurfactant for enhanced oil recovery and its influence on the rheological properties of polymer. **Fuel**, v. 257, p. 116067, 2019.

MALETIĆ, Snežana P. *et al.* Impact of hydrocarbon type, concentration and weathering on its biodegradability in soil. **Journal of Environmental Science and Health**, Part A, v. 46, n. 10, p. 1042-1049, 2011.

MALLMANN, Viviane *et al.* As vantagens da biorremediação na qualidade ambiental. **Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 23, n. 1, p. 12-15, 2019.

MARIANO, Adriano Pinto *et al.* Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 346-353, 2007. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200030>> Acesso em 18 abril 2023.

MAUGERI FILHO, Francisco; GOLDBECK, Rosana. Produção de polissacarídeos. **Biotecnologia Industrial-Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos**, v. 3, p. 219, 2019.

MAZZEO, Dânia Elisa Christofolletti *et al.* Effects of biostimulation by sugarcane bagasse and coffee grounds on sewage sludges, focusing agricultural use: Microbial characterization, respirometric assessment and toxicity reduction. **Waste Management**, v. 118, p. 110-121, 2020.

MELLO, Gabriela Sá Leitão de *et al.* Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 12, p. 71-78, 2007.

MENDONÇA, Amanda *et al.* A review on the importance of microbial biopolymers such as xanthan gum to improve soil properties. **Applied Sciences**, v. 11, n. 1, p. 170, 2020.

MIRANDA, Rita de Cássia *et al.* Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from the vicinity of Suape port in the state of Pernambuco-Brazil. **Brazilian Archives of biology and technology**, v. 50, n. 1, p. 147-152, 2007. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000100018>>. Acesso em 11 mai 2021.

MISHRA, Sanandhya; HUANG, Y; LI, J. *et al.* Biofilm-mediated bioremediation is a powerful tool for the removal of environmental pollutants. **Chemosphere**, v. 294, p. 133609, 2022.

MONTICELI, Francisco Maciel; DE ANDRADE RODRIGUES, Denise Celeste Godoy; CORRÊA, Sergio Machado. Desenvolvimento de biorreatores de bancada para Biorremediação de solo contaminado com diesel B5. **Acta Scientiae et Technicae**, v. 6, n. 1, p. 3-12, 2018. Disponível em <<https://doi.org/10.17648/uezo-ast-v6i1.199>>. Acesso em 11 mai. 2021.

MORAIS, José Mauro. Petróleo em águas profundas: uma história tecnológica da Petrobras na exploração e produção offshore. 2013. Disponível em <<http://repositorio.ipea.gov.br/handle/11058/1147>>. Acesso em 19 abril 2021.

MOREIRA, César Augusto; BRAGA, Antônio Celso de Oliveira. Aplicação de métodos geofísicos no monitoramento de área contaminada sob atenuação natural.

Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 14, n. 2, p. 257-264, 2009. Disponível em <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-41522009000200013&script=sci_arttext&tling=pt>. Acesso em 27 abril 2021.

MOTTA, A.C.V.; BARCELOS, M. Funções do solo no meio ambiente. In: LIMA, V.C.; LIMA, M.; MELO, V.F. (Eds.). **O solo no meio ambiente: abordagem para professores do ensino fundamental e médio e alunos do ensino médio**. Universidade Federal do Paraná. Departamento de Solos e Engenharia Agrícola. Curitiba, 2007. Disponível em <http://www.gestaoescolar.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/solo_escola/solo_meio_ambiente.pdf> Acesso em: 26 mar. 2023.

NORMA NACE RP-07-75. Standard recommended practice, preparation, installation, analysis and interpretation of corrosion coupons in oilfield operations. 2005.

NOVÁK, Viliam; HLAVÁČIKOVÁ, Hana. **Applied soil hydrology**. Springer, 2019. Disponível em <https://doi.org/10.1007/978-3-030-01806-1_2>. Acesso em 27 de mar. de 2023.

NUNES, L. P. **Fundamentos de resistência à corrosão**. Rio de Janeiro: Interciência: IBP: ABRACO, 2007.

OBA, Asime *et al.* Bioprospecting of Hydrocarbonoclastic Representative Bacteria. **Jornal de Proteção Ambiental**, v. 13, n. 6, p. 449-458, 2022. Disponível em <10.4236/jep.2022.136029> Acesso em 20 abril 2023.

OLIVEIRA, S. H. Estudo da utilização da xantana e hipoclorito de sódio como estratégia para controle da biocorrosão. 2010, 174p. 2011. Tese de Doutorado. Tese (**Doutorado em Engenharia Mecânica**) -Universidade Federal de Pernambuco– UFPE, Recife-PE.

OLIVEIRA, Sara H. *et al.* Control of microbiological corrosion on carbon steel with sodium hypochlorite and biopolymer. **International journal of biological macromolecules**, v. 88, p. 27-35, 2016.

ORTEGA, Marcelo F. *et al.* Weighted linear models for simulation and prediction of biodegradation in diesel polluted soils. **Science of the total environment**, v. 686, p. 580-589, 2019. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.441>>. Acesso em 16 abril 2023.

PETROBRAS. Óleo diesel–Informações técnicas. Assistência técnica (2021). Disponível em: <<http://sites.petrobras.com.br/minisite/assistenciatecnica/default.asp>> Acesso em 22 mai 2023.

PETRO NOTÍCIAS. Petrobras identifica vazamento de óleo na refinaria abreu e lima. 27/08/2019. Disponível em <<https://petronoticias.com.br/petrobras-identifica-vazamento-de-oleo-na-refinaria-abreu-e-lima/>>. Acesso em 29 agosto 2022.

PONTES, Patrícia Procópio; FONSECA, Letícia Rocha. Efeito da proporção de nutrientes na biorremediação de solo contaminado com óleo diesel. **Águas Subterrâneas**, 2015. Disponível em < <https://doi.org/10.14295/ras.v0i0.29630>>. Acesso em 10 mai 2023.

PREEDAWIPHAT, Pavaret *et al.* Mechanical investigations of ASTM A36 welded steels with stainless steel cladding. **Coatings**, v. 10, n. 9, p. 844, 2020. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/coatings10090844>>. Acesso em 12 maio 2023.

PROCÓPIO, L. O derramamento de óleo e o uso de surfactante químico reduzem a corrosão microbiana no aço API 5L enterrado em solo salino. **Environ Sci Pollut Res** 28, 26975–26989 (2021). Disponível em <<https://doi.org/10.1007/s11356-021-12544-2>>. Acesso em 25 de mar. de 2023.

QUIÑONES, L. COP26 closes with ‘compromise’ deal on climate, but it’s not enough, says UN chief. **UN News**. 13 de nov. de 2021. Disponível em < <https://news.un.org/en/story/2021/11/1105792>>. Acesso em 24 de mar. de 2023.

RAMIREZ, Maria Isabel *et al.* Contamination by oil crude extraction–Refinement and their effects on human health. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 415-425, 2017.

REGINATTO, Cleomar *et al.* Biorremediação de um solo argiloso contaminado com uma mistura de diesel e biodiesel através da bioventilação. **RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 14, n. 1, p. 43-58, 2012. Disponível em <<https://revistas.unicentro.br/index.php/RECEN/article/view/1575>>. Acesso em 04 mai. 2021.

ROBERGE, Pierre R. **Handbook of corrosion engineering**. McGraw-Hill Education, 2019.

SAJID, Hizb Ullah; KIRAN, Ravi. Influence of high stress triaxiality on mechanical strength of ASTM A36, ASTM A572 and ASTM A992 steels. **Construction and Building Materials**, v. 176, p. 129-134, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.05.018>>. Acesso em 12 maio 2023.

SEPARO. Why Are So Many Oil Refineries Closing?, 2021. Disponível em <<https://www.separo.com/separo-blog/why-are-oil-refineries-closing>>. Acesso em 08 agosto 2023.

SERRA, E. T. **Corrosão e proteção anticorrosiva dos metais no solo**. 1ª ed. EDITORA: Interciência, 2014.

SILVA, Pulkra *et al.* Tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate (THPS) with biopolymer as strategy for the control of microbiologically influenced corrosion in a dynamic system. **Chemical Engineering and Processing-Process Intensification**, v. 160, p. 108272, 2021.

SHAH, Sonia. A história do petróleo. Porto Alegre: **L&PM**, p. 240, 2007.

SHARMA, Babita; DANGI, Arun Kumar; SHUKLA, Pratyosh. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review. **Journal of environmental management**, v. 210, p. 10-22, 2018.

SPINELLI, Alessandra Carla Oliveira Chagas *et al.* Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel. **Tese (Doutorado)** - Geociências do Centro de Tecnologia - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p. 174. 2007.

SILVA, E.E., Azevedo, P.H.S., De-Polli, H., 2007. Determinação Da Respiração Basal (RBS) E Quociente Metabólico Do Solo (qCO₂). **Embrapa Agrobiologia**. <https://bit.ly/2sil4VF>.

SILVA, M. G. *et al.* Comparative evaluation of different bioremediation techniques for crude oil-contaminated soil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 19, n. 4, p. 2823-2834, 2022.

SINDIPETRO SJC. Meses após privatização, BR distribuidora é responsável por vazamento de diesel em lagoa de Betim (MG). 21/12/2021. Acesso em <<https://www.sindipetrosjc.org.br/p/2190/meses-apos-privatizacao-br-distribuidora-e-responsavel-por-vazamento-de-diesel-em-lagoa-de-betim-mg>> Acesso em 29 agosto 2022.

STELTING, Scott *et al.* Immobilization of *Pseudomonas* sp. strain ADP: a stable inoculant for the bioremediation of atrazine. **Applied clay science**, v. 64, p. 90-93, 2012. Disponível <<https://www.sciencedirect.com/science/article>>. Acesso em 17 mai. 2021.

STROTMANN, Uwe *et al.* Development and evaluation of an online CO₂ evolution test and a multicomponent biodegradation test system. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4621-4628, 2004. Disponível em <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.70.8.4621-4628.2004>. Acesso em 23 mar. de 2023.

SUJATHA, Evangelin Ramani *et al.* Enhancing the geotechnical properties of soil using xanthan gum—an eco-friendly alternative to traditional stabilizers. **Bulletin of Engineering Geology and the Environment**, v. 80, n. 2, p. 1157-1167, 2020. Disponível em <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10064-020-02010-7>>. Acesso em 17 mai. 2021

TAVARES, S. R de L. Técnicas de remediação. **Embrapa Solos**-Capítulo em livro científico (ALICE), 2013.

TEIXEIRA, P., Donagemma, G., Fontana, A., and Teixeira, W. Manual de Métodos de Análise de Solo. Brasília: **Embrapa**, 2017.

The Economic Times. OPEC, in contrast to IEA, sees lower 2022 oil demand growth. 11/08/2022. Disponível em <<https://economictimes.indiatimes.com/markets/commodities/views/opec-in-contrast->

to-ia-sees-lower-2022-oil-demand-growth/articleshow/93506635.cms>. Acesso em 29 agosto 2022.

TONINI, Rita Maria Costa Wetler; DE REZENDE, Carlos Eduardo; GRATIVOL, Adriana Daudt. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **CEP**, v. 28013, p. 602, 2010.

TORAL, Laura; RODRÍGUEZ, Miguel; SAMPEDRO, Inmaculada. Biotensioactivos microbianos. **Investigación y ciencia**, 2018.

TREJOS-DELGADO, Catalina *et al.* Biorremediação de Petróleo em um solo tropical contaminado usando reator. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, 2020.

UNEP. Planetary action. Climate, nature and chemicals & pollution. 2021. Acesso em: <<https://www.unep.org/resources/annual-report-2021>>. Acesso em 24 de mar. de 2023.

VIDELA, H. A. Biocorrosão, biofouling e deterioração de materiais. 1ªed. São Paulo: Editora Edagard Blücher Ltda, 2003. p. 148.

YADAV, Sangeeta; CHANDRA, Ram. Biofilm-mediated bioremediation of pollutants from the environment for sustainable development. **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: microbial biofilms**. Elsevier, p. 177-203, 2020.

YALAOUI-GUELLAL, Drifa *et al.* Biodegradation potential of crude petroleum by hydrocarbonoclastic bacteria isolated from Soummam wadi sediment and chemical-biological proprieties of their biosurfactants. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 184, p. 106554, 2020. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.petrol.2019.106554>>. Acesso em 20 abril 2023.

WALKER J, SURMAN S, JASS J. **Industrial biofouling detection, prevention and control**. New York, NY: Wiley; 2000.

WANG, Aiqin *et al.* The enhanced stability and biodegradation of dispersed crude oil droplets by Xanthan Gum as an additive of chemical dispersant. **Marine Pollution Bulletin**, v. 118, n. 1-2, p. 275-280, 2017.

WANG, Qingren *et al.* Potential approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution. **Journal of environmental protection**, v. 2, n. 01, p. 47, 2011.

WANG, Xiaofei *et al.* Microbial electrochemistry for bioremediation. **Environmental Science and Ecotechnology**, v. 1, p. 100013, 2020.

WASIM, Muhammad; DJUKIC, Milos B. External corrosion of oil and gas pipelines: A review of failure mechanisms and predictive preventions. **Journal of Natural Gas Science and Engineering**, p. 104467, 2022.

WILSON, N. G.; BRADLEY, G. The effect of immobilization on rhamnolipid production by *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 5, p. 525-530, 1996.

ZAHED, Mohammad Ali *et al.* Kinetic modeling and half life study on bioremediation of crude oil dispersed by Corexit 9500. **Journal of hazardous materials**, v. 185, n. 2-3, p. 1027-1031, 2011.

ZHONG, Lirong *et al.* Delivery of vegetable oil suspensions in a shear thinning fluid for enhanced bioremediation. **Journal of contaminant hydrology**, v. 175, p. 17-25, 2015. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/>>. Acesso em 17mai. 2021.

APÊNDICE A – CÁLCULO PARA AJUSTE DE UMIDADE DO SOLO PARA 50% DA CRE

O ajuste da umidade do solo recomendado é de 50 a 70% da capacidade de retenção do solo (ABNT-NBR-14283:1999). Para este cálculo, a amostra de solo após análise de capacidade de retenção, tem sua umidade medida. A umidade do solo após a capacidade de retenção representa 100% de saturação do solo, $W_{100\% CRE}$. A umidade do solo em 50% da capacidade de retenção será metade desta umidade encontrada. Logo, para ajustar a umidade do solo em 50% da capacidade de retenção, tem-se a Equação 17 (SPINELLI, 2007):

$$Umidade_{ajuste} = Umidade_{50\% CRE} - Umidade\ residual \quad \text{Equação 17}$$

Em que:

$Umidade_{ajuste}$ = água que deverá ser adicionada

$Umidade_{50\% CRE}$ = umidade do solo em 100% CRE

$Umidade\ residual$ = umidade residual (natural) do solo

APÊNDICE B – AJUSTE DE NUTRIENTES

A partir das análises físico-químicas explicitadas em **seção 4.1**, realizou-se os cálculos das quantidades de nutrientes adicionados aos biorreatores B_{Nu} , e B_{Nu+Xa} , com adição em (massa/massa).

O COT natural do solo analisado foi de 0,15%. Adaptado de Liang *et al.* (2005), que analisou as frações dos hidrocarbonetos contidos no óleo diesel, calculou-se a porcentagem de carbono orgânico contido do óleo diesel.

Portanto,

$$COT_{\text{óleo diesel}} = 84,6\%$$

$$COT_{\text{solo}} = 0,15\%$$

Considerando-se a massa dos microcosmos montados de 3 kg, contaminado em 5% de óleo diesel tem-se

$$COT_{3\text{ kg}}(\text{óleo diesel}) = 3000\text{ g} \times 0,05 \times 0,846 = 126,9\text{ g}$$

$$COT_{3\text{ kg}}(\text{Solo}) = 3000\text{ g} \times 0,015 = 4,5\text{ g}$$

Portanto, após contaminação artificial de 5% de óleo diesel, tem-se

$$COT_{\text{óleo diesel}} + COT_{\text{solo}} = COT_{3\text{ kg}}(\text{microcosmo}) = 131,4\text{ g}$$

Para seguir a recomendação do ajuste de nutrientes na proporção C:N:P=100:10:1, calculou-se, a seguir, as massas nos reagentes $NH_4NO_{3(s)}$ e $K_2HPO_{4(s)}$, como fontes de nitrogênio e fósforo, respectivamente.

Para o ajuste da proporção dos nutrientes em relação ao carbono ser C:N:P=100:10:1, fez-se a relação:

$$C : N : P = 131,4 : 13,14 : 1,314 \quad \text{Equação 18}$$

Com base na análise do teor de nitrogênio do solo, explicitado na **seção 4.1**, o teor natural de nitrogênio encontrado foi de $124,6 \frac{mg}{kg}$ de solo, portanto, considerando-se 3 kg de solo, tem-se $0,3738\text{ g de N}$.

Para o ajuste seguir a proporção mostrada na C : N : P = 131,4 : 13,14 : 1,314 Equação 18 calculou-se:

$$Massa_{N_{ajuste}} = 13,14 - 0,3738 = 12,7662\text{ g}$$

Como o $NH_4NO_{3(s)}$ possui 35% de nitrogênio, tem-se:

$$Massa_{NH_4NO_{3(s)}_{ajuste}} = \frac{12,7662}{0,35} = 36,4748\text{ g de } NH_4NO_{3(s)}$$

Com base na análise do teor de fósforo do solo, explicitado na **seção 4.1**, o teor natural de fósforo encontrado foi de $6,4629 \frac{mg}{kg}$ de solo, portanto, considerando-se 3 kg de solo, tem-se 19,389 mg de P.

Para o ajuste seguir a proporção mostrada na C:N:P = 131,4:13,14:1,314 Equação 18, calculou-se”

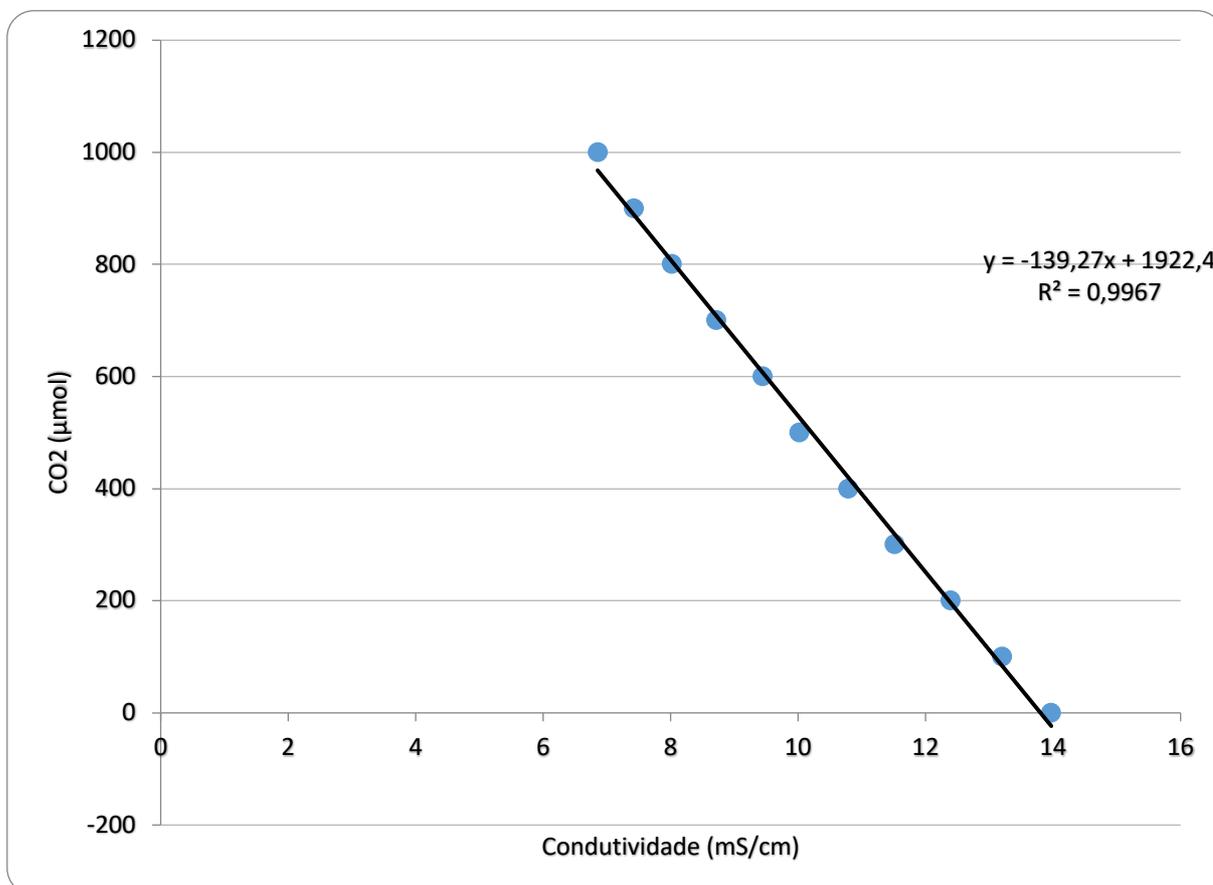
$$Massa_{P_{ajuste}} = 1,314 - 0,019389 = 1,2046 \text{ g}$$

Como o $K_2HPO_{4(s)}$ possui 17,794% de fósforo, tem-se:

$$Massa_{K_2HPO_{4(s)ajuste}} = \frac{1,2046}{0,17794} = 7,2754 \text{ g de } NH_4NO_{3(s)}$$

APÊNDICE C - CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CONDUTIVIDADE

Figura 33: Curva analítica de ensaio respirométrico



Fonte: A Autora (2023)