



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

JOÃO HENRIQUE BARROS DE PONTES

**MICRO-ORGANISMOS EFICAZES NA BIORREMEDIACÃO/BIOCORROSÃO DE
AÇO CARBONO EM SOLOS CONTAMINADOS COM DIESEL.**

Recife

2023

JOÃO HENRIQUE BARROS DE PONTES

**MICRORGANISMOS EFICAZES NA BIORREMEDIACÃO/BIOCORROSÃO DE
AÇO CARBONO EM SOLOS CONTAMINADOS COM DIESEL.**

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

Orientador (a): Sara Horácio de Oliveira Maciel

Coorientador (a): Larissa Oliveira da Silva

Recife

2023

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

Pontes, João Henrique Barros de .

Microrganismos eficazes na biorremediação/biocorrosão de aço carbono em
solos contaminados com diesel. / João Henrique Barros de Pontes. - Recife,
2023.

104p : il., tab.

Orientador(a): Sara Horácio de Oliveira Maciel

Coorientador(a): Larissa Oliveira da Silva

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

Inclui referências, apêndices.

1. Aço-carbono. 2. Bioaumento. 3. Biocorrosão. 4. Biorremediação. 5. Diesel
S-10. I. Maciel, Sara Horácio de Oliveira. (Orientação). II. Silva, Larissa
Oliveira da . (Coorientação). IV. Título.

660 CDD (22.ed.)

JOÃO HENRIQUE BARROS DE PONTES

**MICRORGANISMOS EFICAZES NA BIORREMEDIACÃO/BIOCORROSÃO DE
AÇO CARBONO EM SOLOS CONTAMINADOS COM DIESEL.**

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

Aprovado em: 04/10/2023

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



SARA HORACIO DE OLIVEIRA MACIEL
Data: 06/10/2023 17:36:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Sara Horácio de Oliveira Maciel (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente



MARIA DE LOS ANGELES PEREZ FERNANDEZ
Data: 06/10/2023 16:21:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Maria de Los Angeles Perez F. Palha (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente



JUAN FELIPE GONZALEZ ALBA
Data: 06/10/2023 15:45:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Juan Felipe González Alba (Examinador Externo)

Pesquisador Laboratório de Refino e Tecnologias Limpas

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois só tenho a agradecer a Ele por tudo o que Ele fez e continua fazendo por mim, sempre me protegendo e provendo tudo o que preciso.

Aos meus pais, pois batalham muito para me dar o melhor possível e, até mesmo com dificuldades financeiras, sempre me incentivam a persistir nos meus objetivos com conselhos, amor e carinho. Amo vocês demais.

Aos meus avôs e avós, sempre me ajudaram quando puderam, principalmente nos momentos de necessidade, me incentivando nos estudos e a querer sempre ser uma pessoa melhor.

Ao PRH 30.1, que aprendi coisas novas e conheci pessoas incríveis como a professora Celmy, um amor de pessoa, sempre muito atenciosa com todos os seus bolsistas e tive acesso à muitas oportunidades, como as inúmeras visitas às indústrias.

À minha professora orientadora, Sara Horácio, que exerceu seu papel com excelência, sempre me ajudando em tudo no trabalho e me ensinou muito tanto na área científica quanto ensinamentos de vida.

À minha Co-orientadora, Larissa Oliveira, que sempre esteve paciente e disposta a ajudar, me ensinou muito no laboratório e me ajudou a colocar em prática tudo que aprendi nas aulas de microbiologia, além de me auxiliar muito na construção do TCC e no processo dos experimentos como um todo. Agradeço a todos os momentos, foram muito legais, além dos bolos incríveis.

Ao meu amigo e colega de laboratório, Paulo Firmino, que me ajudou imensamente na preparação dos meios, nas inoculações, limpeza das vidrarias e leituras dos resultados. Além de que nos conhecemos no laboratório e nos tornamos amigos, então, além de toda a ajuda, o processo foi descontraído e divertido em todos os momentos de almoço e lanche na hora da pausa no i-LITPEG.

Aos meus amigos e colegas de laboratório que também me ajudaram muito em tudo no laboratório, principalmente na limpeza das vidrarias e nas decapagens. Além de todos os momentos descontraídos também nas pausas dos lanches.

Ao pessoal do laboratório COMPOLAB-LBC, que todos ajudaram de alguma maneira para que esse trabalho fosse possível, além de que conheci pessoas incríveis, que me receberam de braços abertos e com os melhores horários do cafezinho. Com certeza, vocês são muito especiais para mim.

RESUMO

A contaminação do solo por petróleo e derivados é um grande risco à saúde da fauna e flora e para os seres humanos, visto que podem deixar um solo e as águas próximas impróprias para a sobrevivência de plantas e, consequentemente, de animais, afetando indiretamente os seres humanos. Porém, a contaminação pode afetar os seres humanos diretamente, pois derivados do petróleo são altamente tóxicos para a saúde humana, podendo causar câncer e outros problemas de saúde como doenças pulmonares. Para isso, a biorremediação surge como uma técnica importante para recuperar um solo contaminado por petróleo e seus derivados, como o óleo Diesel. O acréscimo de produtos químicos nos tratamentos para remediar solos, pode incidir em acréscimos nas taxas de corrosão dos materiais; a análise é relevante para que não danifiquem estruturas importantes, principalmente metálicas, como as comumente utilizadas em diversas indústrias como a petroquímica. O objetivo deste trabalho foi remediar o solo, coletado em área próxima à refinaria Abreu e Lima, localizada no Porto de Suape, com Diesel S-10, através de um bioaumento com um consórcio microbiano formado por as bactérias *L. casei*, *L. acidophilus* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, avaliando a eficiência desse consórcio em degradar os hidrocarbonetos do solo por um período de 56 dias. Além disso, foi inferida as taxas de corrosão dos aços carbono ASTM A36, inseridos nos biorreatores utilizados na pesquisa. O uso do bioaumento através do consórcio mostrou ser viável no solo de área da refinaria Abreu e Lima, porém fica recomendado atentar para o tipo de tratamento a ser realizado, pois ações *in situ* podem incrementar a corrosão de estruturas enterradas no início dos tratamentos, mas as taxas de corrosão dos aços diminuem e estabilizam-se com o tempo.

Palavras-chave: Aço-carbono; Bioaumento; Biocorrosão; Biorremediação; Diesel S-10.

ABSTRACT

Soil contamination by petroleum and its derivatives poses a significant risk to the health of fauna, flora, and humans alike, as it can render soil and nearby waters unsuitable for the survival of plants and, consequently, animals, indirectly affecting humans. However, contamination can also directly impact humans since petroleum derivatives are highly toxic to human health, potentially causing cancer and other health problems such as lung diseases. In this regard, bioremediation emerges as an important technique for restoring soil contaminated by petroleum and its derivatives, such as Diesel oil. The addition of chemicals in soil remediation treatments can lead to increased corrosion rates of materials. Therefore, it is crucial to analyze and assess their impact to avoid damage to important structures, especially metallic ones commonly used in various industries, such as the petrochemical sector. The objective of this study was to remediate soil collected in an area near the Abreu e Lima refinery, located in the Port of Suape, contaminated with S-10 Diesel oil. This was achieved through a bioaugmentation process using a microbial consortium composed of the bacteria *L. casei*, *L. acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The efficiency of this consortium in degrading soil hydrocarbons was evaluated over a period of 56 days. Additionally, corrosion rates of ASTM A36 carbon steels inserted in the bioreactors used in the research were inferred. The use of bioaugmentation through the consortium has shown to be feasible in the soil of the Abreu e Lima refinery area. However, it is advisable to carefully consider the type of treatment to be performed, as *in situ* actions can initially increase the corrosion of buried structures. Nevertheless, the corrosion rates of the steels decrease and stabilize over time.

Keywords: Bioaugmentation; Biocorrosion; Bioremediation; Carbon Steel; Diesel S-10;.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Composição de solo ideal	20
Figura 2 –	Esquema do respirômetro de Bartha	29
Figura 3 –	Processo de formação do biofilme pelos microrganismos	31
Figura 4 –	Recipientes com o solo peneirado e os resíduos retidos na peneira, respectivamente	36
Figura 5 –	ANálise da capacidade de retenção da água	38
Figura 6 –	Frasco contendo os microrganismos eficazes utilizados no experimento	43
Figura 7 –	Inóculo do consórcio de microrganismos pronto para ser utilizado	44
Figura 8 –	Sistemas de 3 e 5 kg, utilizados para o solo com consórcio e outro para solo “estéril”, respectivamente	46
Figura 9 –	Respirômetros de Bartha em operação	48
Figura 10 –	Gráfico CO ₂ produzido versus condutividade	51
Figura 11 –	Diluição seriada para isolamento de microrganismos	53
Figura 12 –	Tubos de ensaio com os meios já inoculados e após as horas de incubação	48 54
Figura 13 –	Frascos de penicilina após a viragem (-1 ao -3) e antes da viragem (-4 ao -6)	56
Figura 14 –	Placas após a inoculação e incubadas por 5 dias	57
Figura 15 –	Placas após a inoculação e período de incubação de 48 horas	58
Figura 16 –	Poços utilizados para inoculação das hidrocarbonoclásticas	59
Figura 17 –	Seringa e filtro estéril utilizados na esterilização do óleo Diesel	59
Figura 18 –	Corpos de prova enterrados no biorreator de 4 kg	60
Figura 19 –	Corpos de prova utilizados na taxa de corrosão	61
Figura 20 –	Microscópio metalúrgico Olympus BX51M e Microscópio de mesa Hitachi TM3000, respectivamente	62

Figura 21 –	Quantidade de CO ₂ produzido pelo solo “estéril” e pelo solo com o consórcio de microrganismos eficazes no período de 35 dias.	65
Figura 22 –	Produção acumulada de CO ₂ nos ensaios respirométricos Solo “estéril”, Bioaumento e Controle	67
Figura 23 –	Eficiência da biodegradação	68
Figura 24 –	Tubos contendo meio aeróbio	70
Figura 25 –	BHA no sistema esterilizado ao longo dos 35 dias estudados	71
Figura 26 –	BHA no sistema com bioaumento ao longo dos 56 dias estudados	72
Figura 27 –	Tubos contendo meio anaeróbio	73
Figura 28 –	BHAn no sistema esterilizado ao longo dos 35 dias estudados	74
Figura 29 –	BHAn no sistema com bioaumento ao longo dos 56 dias estudados	74
Figura 30 –	BHAn no sistema com bioaumento ao longo dos 56 dias estudados	75
Figura 31 –	Hidrocarbonoclásticas no sistema “estéril” ao longo dos 56 dias estudados	76
Figura 32 –	Hidrocarbonoclásticas no sistema com bioaumento ao longo dos 56 dias estudados	77
Figura 33 –	Colônias de fungos na placa de Petri	78
Figura 34 –	Fungos no sistema com bioaumento ao longo dos 56 dias estudados	79
Figura 35 –	Colônias de bactérias e leveduras na placa de Petri	80
Figura 36 –	Bioaumento de bactérias e leveduras no sistema de bioaumento ao longo dos 56 dias estudados	81
Figura 37 –	Taxa de corrosão do biorreator controle – desvio padrão da triplicata	83
Figura 38 –	Taxa de corrosão do biorreator com bioaumento – desvio padrão da triplicata	84
Figura 39 –	Microscopia óptica em corpos de prova no t = 7 e 14 dias.	86
Figura 40 –	Microscopia óptica em corpos de prova no t = 28 e 42 dias.	86
Figura 41 –	Microscopia óptica em corpo de prova no t = 56 dias.	87

Figura 42 –	MEV em corpos de prova no $t = 7$ e 14 dias.	88
Figura 43 –	MEV em corpos de prova no $t = 28$ e 42 dias.	88
Figura 44 –	MEV em corpo de prova no $t = 56$ dias.	89
Quadro 1 –	Composição química do aço-carbono ASTM A-36	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Componentes do biorreator controle	45
Tabela 2 –	Componentes do biorreator com menor concentração celular	45
Tabela 3 –	Componentes do biorreator com consórcio de microrganismos	45
Tabela 4 –	Componentes do biorreator	47
Tabela 5 –	Componentes do respirômetro para o sistema controle	48
Tabela 6 –	Componentes do respirômetro para os sistemas “estéril” e bioaumento	48
Tabela 7 –	Componentes do meio Caldo Nutriente para 1 L de água destilada	54
Tabela 8 –	Componentes da solução redutora para 1 L de água destilada	55
Tabela 9 –	Componentes do meio tioglicolato para 1 L de água destilada	55
Tabela 10 –	Componentes do meio <i>Sabouraud</i> para 1 L de água destilada	56
Tabela 11 –	Componentes do meio TSA para 1 L de água destilada.	57
Tabela 12 –	Componentes do meio BH líquido para 1 L de água destilada	58
Tabela 13 –	Classificação da taxa de corrosão	61
Tabela 14 –	Resultados da análise de granulometria do solo	63
Tabela 15 –	Propriedades físico-químicas do solo estudado	64
Tabela 16 –	Propriedades físico-químicas do óleo Diesel S-10	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASTM	American Society for Testing and Materials
BH	<i>Bushnell-Haas</i>
BHA	Bactérias Heterotróficas Aeróbias
BHAn	Bactérias Heterotróficas Anaeróbias
CO	Carbono Orgânico
MO	Matéria Orgânica
NBR	Normas Brasileiras
NMP	Número Mais Provável
PCA	<i>Plate Cont Ágar</i>
TFSA	Terra Fina Seca ao Ar
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVO GERAL	17
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO PETRÓLEO E SEUS CONTAMINANTES	18
2.1.1	Problemática ambiental do Petróleo e seus derivados	18
2.2	DIESEL E SEUS IMPACTOS	18
2.3	SOLO	20
2.3.1	Contaminação do solo	21
2.4	BIORREMEDIÇÃO	23
2.4.1	Bioaumentação	25
2.4.1.1	Consórcio	27
2.4.2	Determinação da biodegradação por respirometria	28
2.5	CORROSÃO	29
2.5.1	Corrosão Microbiológica	30
2.5.2	Aço-carbono ASTM A-36	32
2.5.3	Microscopias	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	COLETA DO SOLO	35
3.2	ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DO SOLO	36
3.2.1	Teste de granulometria	36
3.2.2	Análise da capacidade de retenção de água no solo	38
3.2.3	Análise da umidade do solo	39
3.2.4	Análise do pH	39
3.2.5	Análise de carbono orgânico total	39
3.2.6	Análise de óleos e graxas	40
3.2.7	Análise da densidade de partículas	40
3.2.8	Análise da densidade aparente	41
3.2.9	Análise da porosidade	42
3.2.10	Esterilização do solo	42

3.2.11	Análises microbiológicas	42
3.3	CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS PARA O BIOAUMENTO	43
3.4	PREPARO DO INÓCULO DO CONSÓRCIO DE MICRORGANISMOS	43
3.5	BIORREATORES	44
3.5.1	Biorreatores bandejas	44
3.5.2	Respirômetros de Bartha	47
3.5.2.1	Leitura dos respirômetros	49
3.5.2.1.1	<i>Curva de calibração da condutividade e molaridade de CO₂</i>	49
3.5.2.1.2	<i>Cálculo da eficiência da biodegradação (EB)</i>	51
3.6	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	52
3.6.1	Quantificação das bactérias heterotróficas aeróbias (BHA)	53
3.6.2	Quantificação das bactérias heterotróficas anaeróbicas (BHAn)	55
3.6.3	Quantificação dos fungos filamentosos e leveduras	56
3.6.4	Quantificação das bactérias e leveduras do consórcio	57
3.6.5	Quantificação das hidrocarbonoclásticas	58
3.6.5.1	Esterilização do óleo Diesel	59
3.7	TAXA DE CORROSÃO	60
3.7.1	Microscopias	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1	CARACTERIZAÇÃO	63
4.1.1	Caracterização físico-química do solo	63
4.1.2	Caracterização físico-química do óleo Diesel	65
4.2	TAXA DE BIORREMEDIADAÇÃO POR RESPIROMETRIA	65
4.3	QUANTIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS	69
4.3.1	Bactérias heterotróficas aeróbias (BHA)	70
4.3.2	Bactérias heterotróficas anaeróbias (BHAn)	73
4.3.3	Hidrocarbonoclásticas	75
4.3.4	Fungos	78
4.3.5	Consórcio de bactérias e leveduras	80
4.3.6	Eficiência dos óleos e graxas residual.	82

4.4	TAXA DE CORROSÃO	82
4.5	MICROSCOPIA	86
4.5.1	Microscopia Óptica	86
4.5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	87
5	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

Desde a revolução industrial, a produção em grande escala tem se tornado uma realidade cada vez mais comum, porém mais tecnológica com o passar dos anos. Um grande desafio desse progresso tecnológico é o gerenciamento dos resíduos gerados em grande quantidade por essas indústrias (Santana *et al.*, 2020). Uma das formas que a atividade antropológica gera a contaminação dos ecossistemas é por meio de incidentes com o petróleo e seus derivados, como o incidente que provocou o derramamento de petróleo no Brasil, em agosto de 2019. Durante o incidente, petróleo cru de alta densidade vazou de um navio petroleiro de bandeira grega, atingindo a costa Nordeste e Sudeste do país (Andes, 2021). O petróleo vazado continha quantidades consideráveis de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA), composto altamente tóxico para o ser humano, cuja presença está associada ao desenvolvimento de doenças como câncer de pulmão e pele (CETESB, 2018; Leite, 2022).

O óleo Diesel é a fonte energética mais utilizada em todo o mundo e tem grande importância econômica. Sua produção envolve três estágios principais: extração, processamento primário de petróleo e refino. O processo de extração pode ser feito de duas formas: *onshore* (em terra) ou *offshore* (no mar), sendo que, no Brasil, a predominância é *offshore*, com cerca de 91 %. Apesar disso, em acidentes ocorridos em plataformas, o petróleo pode acabar contaminando o mar e o solo, gerando diversos problemas socio ambientais (Sanchez Moore; Matsuura; Kulay, 2016).

Em 1979, no mar do Caribe, o petroleiro Atlantic Empress colidiu com o petroleiro Aegean Captain liberando 287 mil toneladas de óleo no mar, porém não causou danos significativos ao meio ambiente. Outro acidente, próximo a Porto Rico, ocorreu com o petroleiro Zoe Colocotroni em que a embarcação ficou encalhada e liberou 5 mil toneladas de óleo (Hörnke, 2013; Anjos, 2014).

Outro exemplo de vazamento acidental na indústria petrolífera é o vazamento de resíduos oleosos da Refinaria de Abreu e Lima, em que foram liberados ao mar cinco metros cúbicos de óleo, atingindo um córrego que passa por áreas internas dos limites da refinaria (EPBR, 2019). A refinaria foi multada por causar impactos negativos na fauna e flora da região, além de apresentar um plano de remediação (CBN Recife, 2019). A contaminação dos ecossistemas com petróleo e derivados pode acontecer desde a extração, refino, transporte e armazenamento (Andrade,

2022). Há formas de minimizar os impactos negativos causados pela contaminação desses compostos orgânicos, com danos ao meio ambiente, fauna e flora.

Algumas técnicas de contenção da poluição são empregadas nos ecossistemas quando poluídos com os derivados do petróleo, dentre elas: incineração, atenuação natural, biorremediação, oxidação química, entre outros. (Andrade; Augusto; Jardim, 2010). A biorremediação, uma proposta menos agressiva ao meio ambiente, traz resultados também muito satisfatórios, pois tem a vantagem de ser mais segura, simples de aplicar e apresentar um ótimo custo-benefício (Reginatto; Colla; Thomé, 2011).

A biorremediação é um processo de descontaminação de um ambiente contaminado, em que se utiliza micro-organismos inseridos ou provenientes do próprio meio, como fungos e bactérias, que possuem capacidade de metabolizar determinados poluentes (Silva, 2016). Para que esse processo seja eficiente é necessário que se considere alguns fatores muito importantes do meio que se deseja biorremediar, como temperatura, pH, presença ou não de oxigênio, e nutrientes no meio (Souza; Santos Junior; Santos, 2016).

O bioaumento, uma estratégia implementada na biorremediação, técnica de interesse deste trabalho, em que há a introdução de micro-organismos específicos para acelerar a degradação de determinados poluentes no solo. Micro-organismos endógenos podem ser introduzidos no solo, ou não, cujas vias metabólicas possuem capacidade de degradar o poluente de interesse, tornando viável a biodegradação. Essa via pode ser realizada *in situ*, na própria área contaminada, ou *ex situ*, em que a área contaminada é transferida do local de origem para ser tratada (Araújo, 2017).

A corrosão é um fenômeno de desgaste do material que o homem vem tentando minimizar ou solucionar há muito tempo, pois causa prejuízos para os diversos setores industriais. Esse fenômeno acontece em muitos materiais, predominantemente em metais e ligas, como a mais utilizada - aço-carbono - quando estão expostos ao ar atmosférico, sais dissolvidos presentes no ar e à água (Silva et al., 2014).

A corrosão microbiológica é um processo de deterioração mais ocorrido na indústria petrolífera (Gentil; Carvalho, 2022). O material é degradado, não somente pelas intempéries do meio, mas também pela presença dos micro-organismos, que afetam e influenciam os processos corrosivos, sendo mais frequente as bactérias. A biocorrosão causa grandes impactos negativos em muitos ambientes industriais,

degradando maquinários, tubulações e tanques de armazenamento, de indústrias como as de petróleo e naval (Araújo, 2018).

Na indústria do petróleo, há muitas tubulações e tanques que se encontram sob o solo e que podem sofrer corrosão por diversos motivos como umidade, acidez, salinidade e presença de oxigênio, além dos próprios microrganismos. Quanto aos microrganismos, a atenção durante a biorremediação é essencial, pois eles atuam no solo degradando os derivados do petróleo, porém em contato com os equipamentos, podendo causar corrosão microbiológica, consequentemente (Silva, 2018).

1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ação de um consórcio de micro-organismos eficazes na biorremediação de solo contaminado com óleo Diesel S-10 e o impacto sobre as taxas de corrosão do aço carbono ASTM A36.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o solo de área próxima à refinaria do Porto de Suape de Abreu e Lima;
- Avaliar a taxa de biodegradação do óleo Diesel S-10 (B10) por ensaio de respirometria e teor de óleos e graxas no tempo de 56 dias;
- Quantificar a microbiota do solo *in natura* e ao longo do tempo experimental, bactérias heterotróficas aeróbias e anaeróbias (BHA, BHAn), hidrocarbonoclásticas (BH), fungos filamentosos e leveduras dos solos;
- Avaliar o efeito corrosivo do tratamento sobre os cupons de aço carbono A36 enterrados no solo, por meio da quantificação das taxas de corrosão do aço-carbono e análises das superfícies dos aços;
- Analisar a biodegradação sob a influência da contaminação com o Diesel S-10 no solo ajustado com água e nutrientes, em biorreatores com e sem o consórcio de microrganismos;
- Comparar a biodegradação dos biorreatores estudados com um solo com menor concentração de microrganismos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO PETRÓLEO E SEUS CONTAMINANTES

O petróleo é um composto complexo formado, em sua maior parte, por hidrocarbonetos aromáticos e saturados. Uma parcela desse composto pode conter outros elementos além de carbono e hidrogênio como oxigênio, nitrogênio e enxofre, que são classificados como impurezas e podem ser separados por processos de hidrotratamento (Serafim, 2011; Guedes Júnior, 2021).

No solo contaminado com petróleo, pode-se encontrar diversos compostos, dentre os quais os hidrocarbonetos são predominantes, como por exemplo: benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno e seus isômeros. Esses hidrocarbonetos têm como característica principal a presença de um único anel aromático, chamados de monoaromáticos. Esses hidrocarbonetos monoaromáticos representam um grande problema para o meio ambiente e a saúde do ser humano pois, o benzeno por exemplo, é um composto comprovadamente cancerígeno, podendo causar leucemia (Andrade; Augusto; Jardim, 2010).

2.1.1. Problemática ambiental do Petróleo e seus derivados

Quanto aos impactos negativos para o meio ambiente, podem ser listados, por exemplo: emissão de gases, vazamentos de óleo em dutos ou tanques de armazenamento no solo ou mar, vazamento ou derramamento de resíduos da lavagem dos tanques de navios petroleiros, dentre muitos outros. Esses impactos influenciam diretamente na fauna e a flora pois podem bloquear a captação de oxigênio e absorção de nutrientes das plantas quando o óleo entra em contato com elas, tanto em meio terrestre quanto em meio marítimo. Por exemplo, os fitoplanctons não conseguem realizar fotossíntese por causa do aumento da turbidez da água do mar, reduzindo a quantidade de luz que chega na água (Martins *et al.*, 2015).

2.2. DIESEL E SEUS IMPACTOS

O óleo Diesel é um derivado do petróleo obtido por destilação composto por hidrocarbonetos de 8 a 16 carbonos e uma pequena parcela de átomos de oxigênio, nitrogênio, enxofre e metais além de adição de aditivos específicos para aumentar seu desempenho (Kimura, 2010; CETESB, 2020). Os produtos comercializados no Brasil de Diesel são: S-10, S-500, S-1800 e Diesel marítimo. Quanto aos três primeiros,

correspondem aos teores máximos de enxofre contidos no óleo, sendo, respectivamente, de 10 mg/kg, 500 mg/kg e 1800 mg/kg (CETESB, 2020; Petrobrás, 2021).

O Diesel S-10, utilizado neste trabalho, tem coloração que varia de incolor a amarelada, não contém aditivos e é comercializada em regiões metropolitanas para uso rodoviário. O Diesel S-500 também é usado para área rodoviária, contém cor avermelhada, sem aditivos. Por outro lado, o S-1800 é utilizado para gerar energia em termelétricas, por exemplo: transporte ferroviário e mineração a céu aberto. Diesel marítimo é utilizado em embarcações, de cor amarelada, forte odor, bastante límpido e com ponto de fulgor de 60 °C (Petrobrás, 2021; Centenário Diesel, 2020).

O óleo Diesel pode ser classificado em dois tipos. O primeiro é o tipo A, que é obtido por processos de refino do petróleo e processamento do gás natural, não apresentando adição de Biodiesel em sua composição. O tipo B, é obtido da mesma forma do tipo A, porém há a adição do Biodiesel em sua composição (Petrobrás, 2021).

O Diesel encontrado nos ecossistemas em decorrência de contaminação entra em contato com o ambiente devido a eventos de grande envergadura, como vazamentos de oleodutos, bem como em incidentes de menor escala, como a contaminação do solo nas proximidades de instalações industriais, por exemplo.

Na água, o óleo é facilmente dispersado por causa dos componentes polares do Diesel, os componentes voláteis são evaporados da superfície da água. No solo, o Diesel penetra de diferentes formas a depender do tipo de solo. Há a degradação do Diesel pelo solo, porém ocorre de forma muito lenta e depende das condições climáticas do ambiente e físicas-químicas do solo, também chamada de atenuação natural (CETESBa, 2020).

Quanto à saúde humana, os efeitos são diversos, pois o óleo Diesel pode prejudicar a saúde a longo ou curto prazo. Alguns dos efeitos pela exposição aguda (curto prazo) são irritação local e nos olhos, assim como náuseas, vômito e diarreia. A exposição crônica (longo prazo) podem ser dermatite e câncer. O óleo Diesel leve não é classificado como cancerígeno para o ser humano, apesar dos produtos gerados pela sua combustão poderem ser carcinogênicos, o Diesel marítimo é potencialmente cancerígeno, além dos gases de escapamento de motores a óleo Diesel que são cancerígenos (CETESBb, 2020).

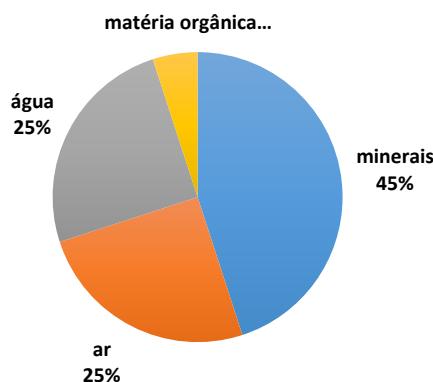
O Biodiesel é um dos óleos que vêm como alternativa para o óleo Diesel tradicional, sendo obtido através de transesterificação e craqueamento. Têm algumas vantagens em relação ao óleo Diesel e depende menos do petróleo, pois é fabricado a partir de fontes vegetais como girassol, mamona e dendê, considerados não tóxicos e com quantidade de cetano maior em relação ao óleo Diesel do tipo A (Souza; Chaar; Souza; Jeffreys; Souza; Costa; Santos, 2009; Hexag Medicina, 2022).

O Biodiesel, por sua vez, possui um problema durante sua estocagem por causa de sua propriedade higroscópica, capacidade de reter água. Como sua origem é vegetal, sua composição é formada por muitas cadeias carbônicas insaturadas (duplas ligações), deixando-as vulneráveis ao ataque do oxigênio que, por sua vez, deteriora o Biodiesel (BiodieselBR, 2012).

2.3 SOLO

O solo é constituído pelas fases sólida, líquida e gasosa, uma estrutura heterogênea, que gera diferentes micros *habitats*, mas que se interagem fortemente (Oliveira, 2021; CETESB, 2013). A porção sólida é composta por rochas; a líquida, de água, soluções inorgânicas e orgânicas e a gasosa, por dióxido de carbono, oxigênio e outros gases. É importante ter conhecimento sobre a constituição do solo, pois nos experimentos são considerados, por exemplo, quantidade de água intrínseca ao solo, para que a terra não fique supersaturada. Na Figura 1, pode-se observar que a maior parte da composição do solo são de minerais, que dentre eles estão a porção de rocha, totalizando 50 % do total (CETESB, 2013).

Figura 1. Composição do solo



Fonte: CETESB, 2013.

Dentre a porcentagem que representa a matéria orgânica, estão inclusos os microrganismos como bactérias, fungos e protozoários. Esses seres vivos são responsáveis pela degradação de resíduos orgânicos e síntese de substâncias húmicas. As substâncias húmicas são responsáveis pela capacidade do solo de reter a água, têm um poder tamponante e são fonte de nutrientes para os próprios microrganismos, principalmente de carbono (Oliveira, 2021).

O tipo de solo também influencia de forma significativa a eficiência da biorremediação. Solos arenosos são melhores de realizar a técnica, pois são altamente porosos, facilitando a difusão de oxigênio e, consequentemente, o processo de degradação aeróbico (Silva, 2007).

2.3.1 Contaminação do solo

O termo poluição é definido como qualquer alteração feita no meio ambiente que seja prejudicial à saúde, segurança e bem-estar da população. As modificações ambientais, como erupções vulcânicas e queima espontânea de florestas, são naturais e sempre ocorrem ao longo do tempo, não sendo considerados no termo definido (Viana, 2015).

A poluição do solo está relacionada com alterações provocadas em suas características por causa de concentrações elevadas de um determinado elemento, tornando o solo impróprio para uso dos seres vivos. A contaminação do solo, se não controlada, pode levar a sérios problemas ambientais, podendo chegar a contaminar a água subterrânea (Kist Steffen; Bemfica Steffen; Antonilli, 2011).

A contaminação do solo muitas vezes não é percebida rapidamente, portanto, é preciso haver gerenciamento rigoroso. A contaminação pode gerar danos graves ao meio ambiente como um todo ao redor do solo, muitas plantas, por exemplo, tiram seus nutrientes nos primeiros centímetros de solo e, com ele contaminado com óleo Diesel, por exemplo, sofre um grande risco de bloquear os canais de captação de nutrientes, assim como liberar substâncias tóxicas para os vegetais (Oliveira, 2021).

Ao entrar em contato com o solo, o poluente, pode ser adsorvido, lixiviado pelas águas de infiltração ou arrastado pelo vento ou águas de escoamento superficial,

podendo chegar aos lençóis freáticos e corpos d'água, o que pode ser muito perigoso, pois chegando neste ponto, o poluente pode ser transportado para outras regiões com facilidade, e colocar em risco o abastecimento de água (CETESB, 2013).

Alguns poluentes são altamente tóxicos para as plantas como o dióxido de enxofre (SO_2), fluoretos, óxidos de nitrogênio (NO_x), ozônio troposférico (O_3), amônia, material particulado produzido pela manufatura do cimento, por exemplo e metais como zinco, berílio, mercúrio, níquel e zinco. Todos esses poluentes podem se acumular nas plantas de diversas formas, sendo um preocupante impacto a redução da fotossíntese (CETESB, 2013).

Outro nocivo poluente é o gás sulfídrico (H_2S), gerado nas unidades de tratamento de gás ácido e recuperação de enxofre, altamente irritante e tóxico para os seres humanos, podendo causar diversas doenças como bronquite crônica, conjuntivite, convulsões e pode levar a óbito se inalado de forma aguda e em quantidades consideráveis (Mariano, 2001). Alguns outros poluentes orgânicos também são extremamente problemáticos, como é o caso dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

Os HPAs são compostos formados de carbono e hidrogênio, organizados em dois ou mais anéis aromáticos. São obtidos pela combustão incompleta de compostos orgânicos como acontece em fábrica de corante, produção de carvão vegetal e nos processos de extração, refino e transporte do petróleo e seus derivados (Jacques; Bento; Antoniolli; Camargo, 2006).

Alguns tipos de HPAs são o benzo(a)antraceno e benzo(b)fluoranteno, compostos significativamente perigosos, pois, além de afetar as plantas são compostos carcinogênicos, genotóxicos ou mutagênicos para os seres humanos, podendo levar ao desenvolvimento de doenças como o câncer (Paraíba; Saito, 2005).

Um grupo de compostos orgânicos denominado de BTX (Benzeno, Tolueno e Xileno), também são componentes do produzidos durante o refino do petróleo, como na reforma catalítica. Nos seres humanos, esses compostos são tóxicos e podem

causar diversos problemas de saúde, pois são depressores do sistema nervoso central e podem ser tóxicos até em baixas concentrações (Amaral *et al.*, 2017; Mariano, 2001).

Já para o meio ambiente, o tolueno pode ser degradado pelos microrganismos; o xileno também pode ser degradado por microrganismos, porém ele tem uma boa mobilidade através solo, onde consegue persistir por muitos anos. Já o benzeno pode causar narcose, que é o acúmulo de uma substância química nas membranas celulares, interferindo no funcionamento normal das membranas (Mariano, 2001).

2.4 BIORREMEDIAÇÃO

Há diversos tipos de tratamento para o solo contaminado, dentre eles, a biorremediação, técnica de interesse deste trabalho, oxidação química e remoção multifásica. A biorremediação, é uma técnica que utiliza os microrganismos nativos ou cultivados para degradar um poluente de interesse e recuperar o solo contaminado (Andrade; Augusto; Jardim, 2010).

A biorremediação pode ocorrer por meio de respiração aeróbia ou anaeróbia, ou com esses dois tipos de respiração, a depender da via metabólica do microrganismo. De acordo com Díaz *et al.* (2004), a degradação de produtos derivados do petróleo é acelerada em condições aeróbicas. As bactérias aeróbias dependem do oxigênio para realizar o mecanismo de ativação, enquanto as anaeróbias metabolizam os compostos na ausência de oxigênio. Esses microrganismos absorvem o contaminante, digerindo-o e transformando em produtos como gás carbônico e água, liberando-os no local tratado (Morais Filho; Coriolano, 2016). Os microrganismos empregam várias estratégias para aumentar a disponibilidade de poluentes hidrofóbicos, como a formação de biofilmes e produção de biossurfactantes (Zahed *et al.*, 2011).

Existem estratégias diferentes que podem ser utilizadas nessa técnica. Os tipos de biorremediação *in situ* existentes são: bioestimulação, bioaumentação, *biosparging*, atenuação natural, fitorremediação e bioventilação. Os processos *ex situ* são: *landfarming*, *biopiling*, compostagem, biofiltro, bioaumentação, biorreator (Silva, 2022). Para cada uma dessas estratégias, alguns fatores precisam ser levados em consideração, pois afetam diretamente no processo de biodegradação

dos compostos xenobióticos no ambiente. Dentre os pontos, a estrutura química do poluente, temperatura, pH, características físicas, presença ou não de metais pesados e adaptação dos microrganismos é uma variável importante de ser analisada. Essas variáveis podem e devem ser ajustadas quando necessário para que o processo tenha sua máxima eficiência (Leonel *et al.*, 2010).

A atenuação natural utiliza dos processos biológicos naturais que, de forma aeróbica ou anaeróbica, descontamina o solo sem a necessidade de interferência humana. Os microrganismos quando se aderem a um material com propriedades filtrantes, utiliza-se o Biofiltro para remediar o substrato. O *Biopiling* utiliza de pilhas feitas com material orgânico (Silva, 2022).

Com o objetivo de otimizar o crescimento dos microrganismos e sua capacidade de degradação, o biorreator é empregado como um tratamento local, com condições específicas controladas, como temperatura, pH, agitação e aeração do solo adequados. Na compostagem, tem-se o objetivo de decompor derivados do petróleo junto com outros resíduos orgânicos presentes no meio, além de ser utilizada na decomposição do lixo orgânico (Silva, 2022).

O *landfarming* tem como objetivo a inserção do contaminante, em sua forma sólida ou líquida, na parte superior do solo para ser degradado microbiologicamente posteriormente. Os rejeitos são posteriormente incorporados ao solo por meio de aração e gradagem. A utilização de plantas e seu metabolismo para amenizar ou descontaminar uma área de solo contaminada é denominada de fitorremediação. As plantas precisam ter boa capacidade de retenção, profundo sistema radicular e alta taxa de crescimento, além de serem altamente resistentes ao poluente de interesse (Leonel *et al.*, 2010).

A bioventilação consiste na adição de oxigênio nos espaços vazios do solo com o objetivo de aumentar o crescimento dos microrganismos naturais do solo ou introduzidos pela bioaumentação. Essa técnica depende de a capacidade do ar ser dispersada através do solo e é recomendável para microbiota aeróbica (Tretin; Braun; Balestrin; Thomé, 2017).

A bioestimulação consiste na estimulação da microbiota adicionando mais nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio. Tanto para o bioestímulo quanto para o bioaumento, a proporção de nutrientes ideal para utilizar na biorremediação é de C:N:P:K (100:10:10:1) (Fonseca; Pontes, 2015).

Cada nutriente é fundamental para algumas funções realizadas pelos microrganismos. O carbono serve como fonte de energia orgânica para os microrganismos heterotróficos e inorgânica para os autotróficos, além do dióxido de carbono (CO_2) ser importante para o metabolismo de ambos, sendo utilizada em sua forma de carbonato (CO_3^{2-}) ou bicarbonato (HCO_3^-) (Nicolau, 2014). O nitrogênio é necessário para síntese de proteínas, ácidos nucleicos (CropLife Brasil, 2021). O fósforo é essencial pois é um componente dos nucleotídeos, servem para armazenamento de energia celular como ATP e ADP e também são utilizados, assim como o nitrogênio, para a síntese de ácidos nucleicos como ADN (ácido desoxirribonucleico) e ARN (ácido ribonucleico) (Nicolau, 2014).

O potássio é responsável pelo sistema de antiporte Na^+/K^+ , são solubilizados pelas bactérias, aumentando o crescimento de alguns tipos como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* e *Penicillium*. O potássio é posteriormente liberado pelas bactérias para uso das plantas, por meio da ação de ácidos orgânicos e inorgânicos produzidos pelos microrganismos que agem com a liberação de H^+ ou complexantes (Cola; Simão, 2012).

A bioaumentação, técnica de interesse deste trabalho, se consiste no processo de biorremediação que tem como objetivo a avaliação da capacidade de degradação de um poluente de interesse por meio do aumento da concentração de microrganismos, ou inserção, geralmente, de um consórcio de bactérias e/ou fungos, por exemplo, que são capazes de realizar esse processo de biodegradação (Mariano *et al.*, 2008).

2.4.1 Bioaumentação

Alguns parâmetros são fundamentais para que o bioaumento ocorra de forma adequada, como as características dos microrganismos, que são: estabilidade genética, alta capacidade de degradação dos poluentes, alto nível de atividade enzimática e a capacidade de competir com a população nativa do solo, além de que eles não podem ser tóxicos (Oliveira, 2008). Segundo Colla (2012), a bioestimulação e bioaumentação sucessivas, em que se ocorre a inoculação dos microrganismos em estágios, podem aumentar a eficiência da biodegradação, pois a concentração dos agentes degradadores se mantém adequada, na ordem de 10^6 a 10^9 UFC/g de solo seco (Łebkowska *et al.*, 2011).

Algumas bactérias são referenciadas como mais utilizadas nesse processo: *Acidovorans*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Comomonas* e *Micrococcus*. Os consórcios microbianos são recomendados na biodegradação de solos contaminados, pois os microrganismos interagem entre si, possibilitando relações de mutualismo, além de possuir enzimas específicas para determinados tipos de compostos recalcitrantes, aumentando as possibilidades de degradação dos poluentes (Wetler-Tonini; Rezende; Gravitol, 2010).

Desde 2007, a aplicação do bioaumento é permitida no Brasil respeitando as normas técnicas da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) e sua aprovação de uso depende de fatores, tais como os tipos de microrganismos utilizados e a área de aplicação (Andrade; Augusto; Jardim, 2010). Muitas espécies de microrganismos conseguem metabolizar os derivados de petróleo, gerando produtos como dióxido de carbono e água. Do total de contaminante metabolizado, 50% são transformados em CO₂, e o restante é utilizado na produção de biomassa.

Para que a biorremediação aconteça, são necessárias algumas condições que afetam a velocidade de reprodução dos microrganismos, tais como a umidade, para que as reações aconteçam; o oxigênio – receptor de elétrons no metabolismos microbiano, para que os hidrocarbonetos oxidem de forma mais rápida; contato óleo-água, relação que controla a velocidade de degradação e oxidação e a quantidade de nutrientes (nitrogênio, enxofre e fósforo) adequada para o bom crescimento dos microrganismos (Serafim, 2011).

Atualmente, a atenção tem sido voltada para o uso de consórcios microbianos, pois, em comparação com as culturas puras, estes apresentam maior eficácia na degradação dos hidrocarbonetos. Sua eficácia é resultado da maior capacidade do consórcio em utilizar grandes quantidades de HAPs como fonte de carbono e conseguir mineralizar esses derivados do petróleo, transformando-os em CO₂ e água. Devido a ação de mais de um microrganismo, os seus metabolismos se complementam, enquanto alguns microrganismos utilizam o óleo Diesel diretamente, outros utilizam de intermediários produzidos pelos primeiros microrganismos (Jacques; Bento; Antoniolli; Carmargo, 2006).

Por causa do grande número de enzimas envolvidas durante o processo de degradação do petróleo, a maior parte dos microrganismos nativos do solo não

conseguem metabolizar os compostos mais complexos. Portanto, surgiu a importância de se isolar e selecionar microrganismos nativos ou não do solo que consigam degradar o petróleo e seus derivados para que sejam utilizados na biorremediação de solo contaminado (Jacques; Bento; Antoniolli; Carmago, 2006).

Algumas das espécies de bactérias eficazes na degradação de hidrocarbonetos são dos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Gordonia*, entre outros. Para os fungos, algumas espécies são dos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, entre outros (Jacques; Bento; Camargo, 2007).

2.4.1.1 Consórcio

As bactérias do gênero *Lactobacillus*, mais especificamente *L. casei* e *L. acidophilus* são gram-positivas, forma de bastonetes e não formam esporos. São estritamente fermentativas, resistentes à ambientes ácidos (Hammes; Vogel, 1995). Suas aplicações têm relação com a indústria de alimentos pois são probióticos, sendo utilizados na preparação de iogurtes, leites fermentados e queijos, mas também são utilizadas para degradar derivados de petróleo (BURITI; SAAD, 2007).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular que cresce em pH entre 5.0 e 6.0. É ácido-resistente e bastante utilizada para degradar óleos e compostos aromáticos (Linde *et. al.*, 2022). A utilização desses microrganismos de forma separada é possível, mas pode conter limitações, por isso se utiliza do consórcio de microrganismos para realizar a biorremediação com resultados mais eficazes, pois suas ações são combinadas para degradar os derivados de petróleo (Montagnoli, 2011).

Para o solo, existem inúmeras espécies de bactérias e fungos que realizam a biodegradação de hidrocarbonetos, sendo a concentração desses microrganismos maior e mais ativa em solo já contaminado (Jacques; Bento; Camargo, 2007). Porém, em uma comparação mais direta, os fungos têm vantagem, pois as bactérias têm sua capacidade de degradação diminuída à medida que a cadeia carbônica aumenta, enquanto que os fungos não são afetados por essa condição (Serafim, 2011).

2.4.2 Determinação da biodegradação por respirometria

A respirometria é um método utilizado para medir a ação microbiana na degradação de compostos orgânicos como o óleo Diesel. O método consiste em medir a respiração basal do solo, a partir da quantidade de dióxido de carbono (CO_2) liberada no processo de degradação do composto pelos microrganismos utilizando os respirômetros de Bartha, padronizado pela técnica ABNT-NBR 14.283, de 1999 (Carmona, 2016).

Com isso, é possível avaliar o nível de tratamento dos resíduos contidos no solo, assim como a taxa de aplicação em condições ideais de umidade do solo, ajustes de pH e nutrientes do solo, caso seja necessário, e a manutenção das condições aeróbias para que a degradação ocorra com o máximo rendimento possível (Mello, Morita, Manfredini, Rivera, 2007).

São utilizadas vidrarias específicas chamadas de respirômetros de Bartha visto na Figura 2, onde na primeira câmara, frasco “Erlenmeyer”, ocorre a biodegradação dos compostos pelos microrganismos nativos ou introduzidos no solo, produzindo CO_2 . O CO_2 que é transferido para a segunda câmara, o braço lateral, reage com a solução de KOH, produzindo K_2CO_3 , como mostrado nas equações 1 e 2, sendo medida sua condutividade. Pela proporção de K_2CO_3 e CO_2 ser 1:1 mol, a medição do CO_2 é feito indiretamente (Fernandes, 2023).

Biodegradação da matéria orgânica:

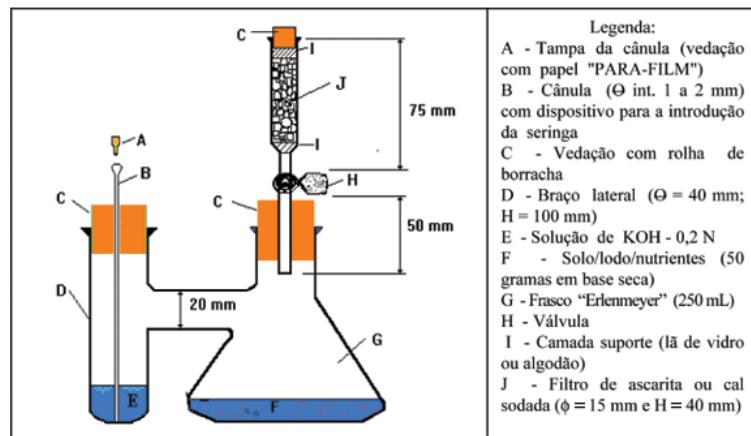


Absorção do CO_2 gerado:



Admite-se que 50% do carbono biodegradado (C) são transformados em CO_2 , portanto, o gás carbônico quantificado no ensaio respirométrico (CO_2) representa 50% de todo o carbono biodegradado, e os 50% restante, se transformam em húmus e biomassa (NBR 14283 – ABNT, 1999).

Figura 2. Esquema do respirômetro de Bartha



Fonte: Mello, Morita, Manfredini, Rivera (2007).

2.5 CORROSÃO

A corrosão é um processo espontâneo que causa a deterioração por ação física, química ou eletroquímica do material, geralmente metálico, de forma uniforme em toda a superfície ou localizada, podem atingir camadas mais profundas do metal (Vieira, 2013). Esse processo faz com que a durabilidade e desempenho desses materiais fiquem comprometidos, levando a consequências como desgaste, modificações estruturais e transformações químicas, podendo causar sérios problemas nos mais variados setores, principalmente nas industriais química e petroleira. Acidentes em locais como esses podem acarretar sérios danos, inclusive, riscos à integridade dos seres humanos e acometer o meio ambiente (Frauches-Santos; Albuquerque; Oliveira; Echevarria, 2014).

A corrosão que mais preocupa a indústria do petróleo é a eletroquímica, devido a presença de sais, gases dissolvidos e microrganismos do fluido de perfuração e da água de produção. Na produção de petróleo e seus derivados, há a formação de H₂S e CO₂ que acidificam o meio e aumentam a taxa de corrosão. O ácido sulfídrico estimula e acelera a corrosão causando a plasticidade do aço e rachaduras, enquanto que o dióxido de carbono dissolvido em água gera o ácido carbônico que mesmo não sendo tão corrosivo quanto o oxigênio, pode causar corrosão por pites (Frauches-Santos; Albuquerque; Oliveira; Echevarria, 2014).

A própria água funciona como eletrólito causando a corrosão, pois ela hidrolisa alguns compostos como cloretos, aumentando a acidez do meio (Frauches-Santos;

Albuquerque; Oliveira; Echevarria, 2014). A presença da água juntamente com outros sais, areia e oxigênio também aumenta a corrosividade, além de provocar um processo erosivo do material (Vieira, 2013).

Microrganismos também podem dar condições para a ocorrência de pilhas por aeração diferencial levando à intensa corrosão, pois essas pilhas são formadas sob depósitos porosos como biofilmes ou material inorgânico, gerando uma diferença de concentração de oxigênio, motivo pela qual a corrosão acontece na parte menos aerada (anodo) (Felipe *et al.*, 2013). O principal agente causador desse tipo de corrosão é a deposição de matéria orgânica na superfície do material (Carvalho, 2006).

2.5.1 Corrosão Microbiológica

A corrosão microbiológica está ligada à formação dos biofilmes, que se inicia com a adesão dos microrganismos ao substrato, por meio da excreção das substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que se adere fortemente à superfície do metal, iniciando a formação do biofilme microbiano, que além de acelerar a corrosão do material, protege os microrganismos, pois cria uma barreira de proteção contra possíveis soluções, como os biocidas (Dalla Costa *et al.*, 2016). Na indústria do petróleo, a corrosão é extremamente perigosa, podendo desencadear acidentes bastante graves, pois reduz a vida útil dos materiais metálicos. Alguns exemplos são os oleodutos, que podem gerar vazamentos de petróleo e seus derivados, resultando em enormes prejuízos ambientais como a morte dos animais marinhos, pela alta taxa de poluição lançada (Moreira, 2021).

A remoção desses biofilmes demanda custos, pois necessitam de limpeza e manutenção dos equipamentos. A prevenção e a proteção contra corrosão diminuem a degradação de metais e materiais e, portanto, contribuem de maneira significativa para a conservação de recursos, com danos mínimos aos ecossistemas (Gentil; Carvalho, 2022). A indústria do petróleo possui estratégias de inibição, interferência e/ou remoção dos biofilmes, pois os métodos convencionais que utilizam somente agentes químicos apresentam bastante resistência pelos microrganismos (Noronha *et al.*, 2017).

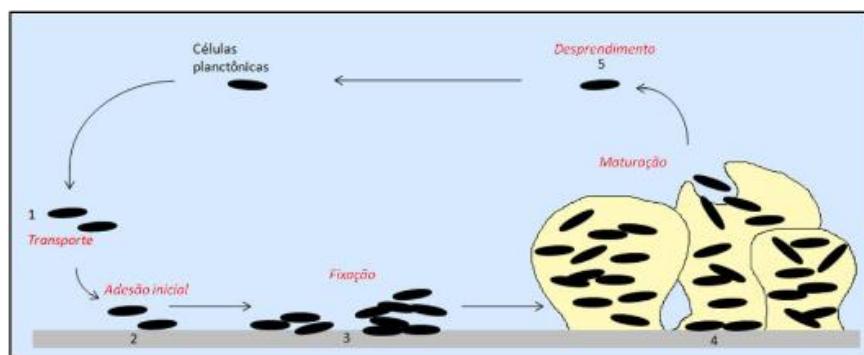
A corrosão microbiologicamente induzida ou biocorrosão, envolve a deterioração do material pela ação de microrganismos que, na maioria dos casos,

envolve bactérias, mas também pode ocorrer pela atividade de fungos e algas (Vieira, 2013). Alguns parâmetros devem ser levados em consideração para ocorrer a corrosão, por exemplo, concentração de oxigênio dissolvido, presença de sais, pH, condutividade e outros. Esses parâmetros podem ser influenciados pelos microrganismos quando esses produzem o biofilme, que é uma complexa comunidade de microrganismos e substâncias poliméricas extracelulares (extracellular polymeric substance, EPS) todos ligados à superfície do metal (Teixeira, 2021).

Muitos problemas relacionados à corrosão dos materiais metálicos estão associados aos microrganismos, como o aumento no consumo de energia pelo sistema devido à formação de biofilmes nos permutadores de calor. Além disso, esses biofilmes que se acumulam, chamados também de *biofouling*, reduzem a vida útil dos equipamentos e apresentam riscos à saúde humana, podendo causar doenças como a legionelose, uma forma de pneumonia provocada pela bactéria *Legionella* (Mota; Prantera, 2009).

Na imagem da Figura 3 é detalhado o processo de formação do biofilme produzido pelos microrganismos durante o processo metabólico.

Figura 3. Processo de formação do biofilme pelos microrganismos.



Fonte: Felipe *et al.* (2013).

A corrosão pode ocorrer por diversos processos e mecanismos, sendo a corrosão induzida e/ou influenciada por microrganismos um dos tipos de corrosão mais preocupantes para a indústria do petróleo. A corrosão microbiológica pode ser dividida como: tipo 1, causada por microrganismos eletrogênicos, que utilizam gás hidrogênio como transportador de elétrons, atacando o aço-carbono e o aço

inoxidável, por exemplo, usando catálise enzimática no citoplasma para redução de um oxidante. O tipo 2 é causado por microrganismos fermentativos que secretam metabólicos corrosivos e são oxidados na superfície do metal, não é necessário acceptor externo de elétrons e produzem metabólicos bastante ácidos. O tipo 3 pode ser causada por uma substância orgânica extracelular microbiana que, por sua vez, causa corrosão por mecanismos como as diferenças de aeração nas superfícies dos aços e também acidez localizada. Diversos microrganismos estão relacionados com a biocorrosão, mas alguns grupos microbianos se destacam no processo: bactérias precipitantes do ferro, oxidantes do enxofre, produtoras de exopolímeros e as bactérias redutoras de sulfato (GU, 2012; Gentil; Carvalho, 2022).

2.5.2 Aço-carbono ASTM A-36

O aço-carbono é uma liga composta, principalmente, por ferro e carbono (proporção de cerca de 0,008 % a 2,11 % de carbono) e alguns elementos secundários como silício, manganês, fósforo e enxofre. O aço-liga são aços-carbono que apresentam um teor maior que o normal de elementos secundários (Panonni, 2002).

Os aços-carbono podem ser divididos em 3 tipos: aços de baixo teor de carbono, médio teor de carbono e alto teor de carbono. Os aços de baixo teor de carbono possuem concentração abaixo de 0,3 %, são bastante dúcteis e bons para trabalho mecânico e soldagem. No entanto, não são suscetíveis à temperas. Os aços de médio carbono possuem concentração de carbono entre 0,3 % e 0,7 %, são temperáveis e possuem ótima tenacidade e resistência. Os aços de alto teor de carbono possuem concentração de carbono acima de 0,7 % e apresentam alta dureza e resistência após passar pelo processo de têmpera. Para os aço-liga, podem ser divididos em baixo teor de ligas ($> 8\%$) e alto teor de ligas ($< 8\%$) (Panonni, 2002).

O aço-carbono ASTM A-36 é um aço estrutural de grãos finos, de baixa liga, baixo carbono, ligados ao manganês, enxofre e fósforo controlados, altamente resistentes e baixa liga (ASBL), possuem limite de escoamento de 170 a 275 Mpa e dependem do teor de carbono para desenvolver sua resistência (Panonni, 2002). No quadro 1, estão listadas a proporção de cada elemento que forma o ASTM A-36.

Quadro 1. Composição química do aço-carbono ASTM A-36

Elemento químico	Quantidade do ASTM A-36 (%)
C	Máx. 0,26
Mn	-
P	Máx. 0,04
S	Máx. 0,05
Si	Máx. 0,40
Ni	-
Cr	-
Mo	-
Cu	0,20
V	-
Nb	-
Propriedades mecânicas	
Limite de resistência	400-550
Limite de escoamento	Mín. 250

Fonte: adaptado de Panonni (2002).

O aço-carbono ASTM A36 é utilizado em diversas áreas como estruturas metálicas em geral, implementos rodoviários, como chassis de caminhões e construção civil, também é utilizado em tanques de armazenamento de petróleo e seus derivados (Lima Júnior *et al.*, 2014; Allgayer, 2017).

2.5.3 Microscopias

A microscopia tem por objetivo a observação de objetos que não seriam possíveis de serem vistos a olho nu, somente ampliados por microscópio. A observação desses objetos pelo microscópio é causada por princípios da óptica como reflexão e refração e a dispersão cromática, que consiste na refração da luz branca se dispersando em outras cores básicas, por exemplo. Dos tipos de microscopia foram utilizadas neste trabalho, a microscopia óptica e a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Mannheimer, 2002).

A microscopia óptica é um microscópio luminoso (ML) e utiliza da radiação de ondas luminosas que são refratadas através da lente do equipamento. A área

observada por esse tipo é apresentada de forma brilhante e os objetos de interesse aparecem de forma mais escura. O microscópio óptico consegue atingir aumentos úteis de até 1000x (Galleti, 2003).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) utiliza radiação gerada por feixe de elétrons, que são também refratadas pela lente do equipamento, passando pelo objeto a ser estudado e tendo sua imagem gerada em sequência com o tempo, à medida que o objeto é varrido pelos feixes. Sua capacidade de ampliação é alta chegando a valores entre 200.000x e 400.000x, isso se deve à utilização de raios eletrônicos de curto comprimento de onda e diminuição da distância focal (Galleti, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Materiais Compósitos, Corrosão e Biocorrosão (CompoLab-LBC), no Instituto de Petróleo e Energia (i-LITPEG) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), na cidade do Recife, Pernambuco.

O experimento foi dividido nas seguintes partes:

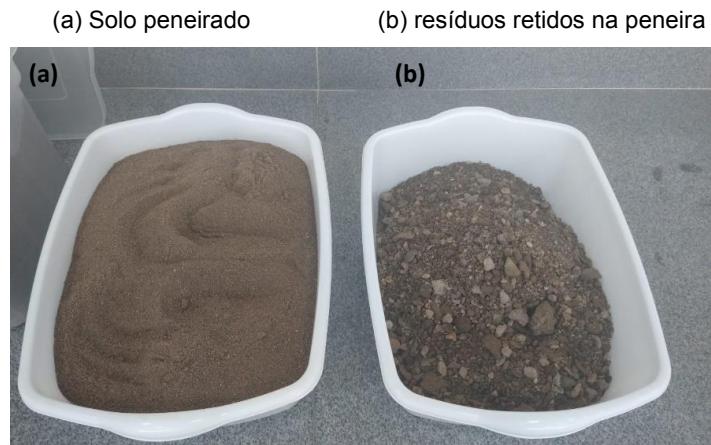
- 1 – Coleta e caracterização físico-química do solo;
- 2 – Preparação dos inóculos de bactérias e leveduras (consórcio microbiano);
- 3 – Montagem dos biorreatores e dos respirômetros de Bartha com os inóculos e carga de óleo Diesel;
- 4 – Análise microbiológica dos solos;
- 5 – Análise do índice de biodegradação do óleo Diesel pelo ensaio de respirometria;
- 5 – Análise das taxas de corrosão dos corpos de prova de aço-carbono ASTM A36, enterrados no solo contaminado com o Diesel S-10 e biorreatores com o bioaumento do consórcio microbiano e o controle.

3.1 COLETA DO SOLO

O solo coletado foi de área próxima à refinaria de Abreu e Lima, no porto de Suape, no município de Ipojuca (PE). A coleta foi feita de acordo com a norma ABNT-NBR-14283:1999. A área da coleta foi de aproximadamente 400 m², em que foram recolhidas amostras em diversas regiões, utilizando um cavador de solo, em uma profundidade de aproximadamente 15 cm. As amostras coletadas foram armazenadas em recipientes limpos de PVC.

A amostra de solo foi homogeneizada e misturada, com secagem em bancada, dentro do laboratório, em ambiente seco e arejado, por 4 dias. Após secagem, o solo foi peneirado em malha de 2,0 mm e armazenado em uma caixa de plástico com tampa, em temperatura ambiente para ser utilizado posteriormente. O solo após peneiramento foi denominado de Terra Fina Seca ao Ar (TFSA). Na Figura 4, pode-se observar o solo peneirado e resíduos como cascalho e britas.

Figura 4. Recipientes com o solo peneirado e os resíduos retidos na peneira, respectivamente.



Fonte: O autor (2023).

3.2 ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DO SOLO

Foram tomadas amostras de 500 g de TFSA para realização das análises de granulometria, carbono orgânico total e teor de óleos e graxas em 3 pontos: $t= 0$, $t= 42$ e $t= 56$ dias.

A caracterização do solo foi realizada seguindo normas e procedimentos:

- Coleta do solo (Luchese, 2002; Embrapa, 2017; ABNT-NBR-14283:1999);
- Preparação das amostras de solo no laboratório (Luchese, 2002; Embrapa, 2017);
- Curva de neutralização do solo (ABNT-NBR-14283:1999);
- Capacidade de retenção da água no solo (Luchese, 2002);
- Determinação do teor de umidade do solo (Embrapa, 2017);
- Teste de pH (Luchese, 2002);
- Carbono orgânico total (Carmo; Silva, 2012);
- Óleos e graxas (metodologia 5520 D e E);
- Densidade de partículas (Embrapa, 1997);
- Densidade aparente (Embrapa, 1997);
- Porosidade (Embrapa, 1997).

3.2.1. Teste de granulometria

As análises de granulometria e classificação do solo foram feitas de acordo com a metodologia da Embrapa – Manual de Métodos de Análise de Solo (1997).

Foi colocado 20 g de TFSA em copo de plástico de 250 mL e adicionados 100 mL de água e 10 mL de hidróxido de sódio. Agitado e deixado em repouso por 24h, cobrindo o copo com um vidro de relógio.

Foi transferido o conteúdo para copo metálico do agitador elétrico “stirrer” com auxílio de jato de água, deixando o volume em torno de 300 mL. O copo foi deixado no agitador por 5 minutos.

O conteúdo foi peneirado com peneira de 20 cm de diâmetro e malha de 0,053 mm (nº 270), colocada sobre um funil apoiado em um suporte composto por proveta de 1000 mL. O material retido foi lavado na peneira com água, colocado a mais de 3 metros de altura, para que obtivesse uma pressão uniforme na mangueira e uma lavagem eficiente e rápida das porções de solo. O volume de água foi completado até o menisco, com auxílio de uma pipeta.

A suspensão foi agitada por 20 minutos com bastão, tendo este, na extremidade inferior, uma tampa de borracha com furos e diâmetro um pouco menor que o cilindro ou proveta. O tempo de conclusão da agitação foi marcado.

O branco foi feito, colocando-se o dispersante utilizado em proveta de 1000 mL contendo água. O volume foi completado, agitando-se por 20 segundos e anotado o tempo. A temperatura do branco e da amostra foram medidas e verificada o tempo de sedimentação da fração argila para 5 cm de profundidade. O tempo foi calculado introduzindo uma pipeta de 50 mL com pipetador automático de borracha até a profundidade de 5 cm e coletada a suspensão.

Foi transferida para cápsula de porcelana juntamente com a porção proveniente da lavagem da pipeta e repetida essa operação para o branco. A cápsula foi colocada em estufa e deixada em repouso durante 24h, até evaporar completamente a suspensão. Foi retirada e colocada em dessecador até esfriar, pesado-se posteriormente com aproximação de 0,0001 g, para determinar a argila e o resíduo do branco.

A areia retida na peneira 0,053 mm foi lavada com jato forte de água corrente. A fração de areia foi transferida para lata de alumínio numerada e com peso conhecido, eliminado o excesso de água e colocado em estufa. Após secagem de 5 horas, foi deixado esfriar e pesado com aproximação de 0,05 g, obtendo-se o peso da areia grossa + areia fina. Essa fração foi transferida para peneira de 20 cm de diâmetro e malha de 0,2 mm (nº 70) e colocada sobre recipiente metálico de mesmo diâmetro e separado a areia grossa.

A areia fina foi transferida para a mesma lata onde foi anteriormente usada para pesar. As duas frações de areia foram colocadas separadamente em sacos plásticos e anotados o número da amostra, para serem realizadas a análise mineralógica.

3.2.2. Análise da capacidade de retenção de água no solo

A análise de capacidade de retenção de água, como mostrado na Figura 5, foi feita em triplicata, segundo Luchese (2002). Foram adicionadas 100 g de TFSA em um funil de vidro, com papel de filtro. O conjunto de funil, papel de filtro e amostra de TFSA, posicionado sobre uma proveta graduada de 250 mL. 100 mL de água destilada foram vertidos sobre a amostra de solo no funil, com 24 horas de descanso, até que percolasse o máximo de água possível pelo sistema. Após as 24h, o volume de percolado foi anotado.

A capacidade de retenção da água é dada pela Equação 3.

$$\text{Capacidade de retenção água (Cr)} = \left(\frac{V_i - V_r}{V_i} \right) * 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

- Cr = porcentagem (%);
- Vi = Volume inicial (mL);
- Vr = Volume final (mL).

Figura 5. Análise da capacidade de retenção da água.



Fonte: autor (2023).

3.2.3. Análise da umidade do solo

A análise da umidade do solo foi realizada utilizando-se o solo da análise da capacidade de retenção de água, a partir do cálculo da diferença gravimétrica após a secagem da amostra de solo (Embrapa, 2017).

Foram pesados 10 g, dos 100 g de solo úmido, da análise de capacidade de retenção em placas de Petri, em triplicata. A amostra foi seca em estufa a 105°C, com massa pesada a cada 2 horas e repetição do ciclo de secagem e pesagem até a constância dos pesos.

O teor de umidade foi determinado pela fórmula da Equação 4 abaixo:

$$W_g = \frac{P_u - P_s}{P_u} * 100 \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

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

P_u = Peso da amostra de TFSA úmido (g);

P_s = Peso da amostra seca (g).

3.2.4. Análise do pH

A análise de pH foi realizada segundo método de Luchese (2002). Pesou-se 10 g de TFSA, em triplicata, em um béquer contendo 25 mL de água destilada. A suspensão água+solo foi mantida em agitação magnética por 5 minuto. Após repouso de 20 minutos, mediu-se o pH do sobrenadante com pHmetro (Digimed DM-22).

3.2.5. Análise de carbono orgânico total

A análise de carbono orgânico total foi feita segundo método Walkley-Black modificado (Leite; Bernardes; Oliveira, 2004; Conceição *et al.*, 1999).

O método consiste na oxidação do carbono orgânico do solo pelo Cr⁶⁺ na presença de H₂SO₄ concentrado, na qual o excesso de Cr⁶⁺ é titulado com Fe²⁺, sendo utilizados dicromato de potássio e sulfato ferroso. Em que, segue-se a fórmula 5.

$$\text{Conteúdo de MO} = \text{CO} * 1,724$$

Equação 5

Em que:

MO – Matéria Orgânica (g/kg de solo);

CO – Carbono Orgânico;

1,724 – Fator de correção.

3.2.6. Análise de óleos e graxas

A análise de óleos e graxas foi realizada a partir da metodologia 5520 D e E, em que de 5 g de TFSA foram pesados e transferidos para cartuchos específicos para extração. As amostras foram levadas ao Soxhlet, à 80 °C, reticulada a uma velocidade de 3 ciclos/min por 4 horas. Os solventes utilizados foram acetona e hexano na mesma proporção. Por fim, com a recuperação dos solventes, o teor de óleos e graxas foi calculado por gravimetria (Teixeira *et al.*, 2017).

O teor de óleos e graxas é determinado pela Equação 6.

$$\text{OG} = \left(\frac{P_1 - P_2}{m} \right) * 1000$$

Equação 6

Em que:

P_1 = massa do balão com resíduo de óleos e graxas (g);

P_2 = massa do balão vazio (g);

m = massa de TFSA utilizada (g);

OG = teor de óleos e graxas na TFSA (g/g).

3.2.7. Análise da densidade de partículas

20 g de amostra de TFSA, previamente seca em estufa a 105°C por 24h foram transferidas para um balão volumétrico de 50 mL. Foi adicionado álcool etílico P.A. ao balão até a formação do menisco de 50 mL (Embrapa, 1997).

O valor do volume de TFSA (V_B) foi calculado de acordo com a Equação 7.

$$V_s = V_B - V_A \quad \text{Equação 7}$$

Em que:

V_s = volume de TFSA (cm³);

V_B = volume do balão (cm³);

V_A = volume do álcool etílico (cm³).

Com o valor do volume de TFSA encontrado foi possível encontrar o valor da Densidade de Partículas (D_p) pela Equação 8.

$$D_p = \frac{M}{V_s} \quad \text{Equação 8}$$

Em que:

D_p = densidade de partículas (g/cm³);

M = massa de solo (g);

V_s = volume do solo (cm³).

3.2.8. Análise da densidade aparente

A densidade aparente foi realizada segundo metodologia da EMBRAPA (1997), em que uma proveta de 10 mL foi pesada, com massa (A). Foi adicionado TFSA até o menisco de 10 mL da proveta, a qual teve sua massa aferida, massa (B).

A densidade aparente é calculada pela Equação 9.

$$DA = \frac{B - A}{100} \quad \text{Equação 9}$$

Em que:

DA = densidade aparente (g/cm³);

A = peso da proveta (g);

B = peso da proveta + TFSA (g).

3.2.9. Análise da porosidade

A análise de porosidade foi realizada utilizando-se os resultados obtidos nas análises da densidade de partículas e densidade aparente, pois a porosidade é a razão entre o volume ocupado pelos poros e a densidade aparente do solo (EMBRAPA, 1997).

A porosidade foi calculada pela Equação 10.

$$P (\%) = \left(\frac{D_p - D_a}{D_p} \right) * 100 \quad \text{Equação 10}$$

P = porosidade (%);

D_p = densidade da partícula (g/cm³);

D_a = densidade aparente (g/cm³).

3.2.10 Esterilização do solo

Foram adicionados 500 g de TFSA em saco plástico autoclavável e submetido à esterilização em autoclave a 121 °C por 30 minutos, em 2 dias seguidos. Foi realizada uma verificação da eficiência do processo de esterilização do solo, análises de quantificações de bactérias heterotróficas aeróbias e anaeróbias (BHA e BHAn) e consórcio de bactérias e leveduras nos meios de cultura citados na seção 3.2.11, (Mello *et al.*, 2007).

3.2.11. Análises microbiológicas

Foram feitas análises para conhecimento das concentrações iniciais da microbiota do solo, que não passou pelos processos de esterilização e do solo após realização do bioaumento com o consórcio de bactérias e leveduras, no tempo inicial (T = 0 dias).

Foram realizadas inoculações para quantificar as Bactérias Heterotróficas Aeróbias (BHA) pelo método do Número Mais Provável (NMP) em caldo nutritivo, Bactérias Heterotróficas Anaeróbias (BHAn) pelo método do NMP em meio tioglicolato, fungos pelo método *pour-plate* em meio *Sabouraud*, consórcio de bactérias e leveduras pelo método *pour-plate* em meio *Tryptic Soy Agar* (TSA) e as Hidrocarbonoclásticas pelo método NMP em meio *Bushnell- Hass* (BH).

3.3 CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS PARA O BIOAUMENTO.

O consórcio de micro-organismos eficazes, da marca Dr. Higa's Original, cuja composição é formada por água (95%), melaço de cana líquido (5%) e micro-organismos naturais sem alterações genéticas *L. casei* ($> 4,7 \times 10^4$ UFC/mL), *L. acidophilus* ($> 7,9 \times 10^4$ UFC/mL) e *Saccharomyces cerevisiae* ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL). Na Figura 6 está exposto o frasco contendo o consórcio que foi utilizado nos experimentos.

Figura 6. Frasco contendo os microrganismos eficazes utilizados no experimento



Fonte: O autor (2023).

3.4 PREPARO DO INÓCULO DO CONSÓRCIO DE MICRORGANISMOS

O inoculo foi preparado conforme instruções do fabricante, uma solução composta por 5% do produto, 5% de melaço de cana e açúcar, misturados em 90% de água limpa. A solução foi homogeneizada e deixada em fermentação por 4 dias. Após o período de fermentação, o inóculo apresentou mudança de coloração, de marrom escuro para marrom alaranjado, odor agrioce e pH 4. Na Figura 7 está exposto o inóculo preparado.

Figura 7. Inóculo do consórcio de microrganismos pronto para ser utilizado



Fonte: O autor (2023).

3.5 BIORRETORES

Para a avaliação da biodegradação do óleo Diesel pelos micro-organismos foram montados 4 biorreatores, sendo 3 biorreatores para análises por respirometria e outro biorreator para análise da biodegradação através do teor de óleos e graxas. Para quantificação das taxas de corrosão e análises das superfícies dos aços foi montado um biorreator.

O biorreator bandeja estéril foi feito em parceria com um trabalho anterior de Câmara (2023). O biorreator e respirômetro controle foram feitos em parceria com outro trabalho anterior de Silva (2023).

3.5.1 Biorreatores Bandejas

O ajuste da umidade nos biorreatores com bioaumento foi alcançado conforme Equação 11:

$$V \text{ de água total} = V \text{ de água pura} + V \text{ de inóculo} \quad \text{Equação 11}$$

Os sistemas que foram utilizados para os ensaios de biodegradação do óleo Diesel foram organizados da seguinte maneira:

- **Biorreator controle:** solo não esterilizado, com o ajuste de água, composição exposta na Tabela 1:

Tabela 1. Componentes do biorreatore controle.

Componente	Quantidade (g)
Solo	2745,00
Água	255,00

Fonte: O autor (2023).

- **Biorreatore estéril:** solo esterilizado em autoclave a 121 °C por 30 minutos, 2 dias seguidos, armazenado em recipientes previamente desinfetado com peróxido de hidrogênio a 100 ppm. O sistema montado foi composto pelas cargas expostas na Tabela 2:

Tabela 2. Componentes do biorreatore com menor concentração celular.

Componente	Quantidade (g)
Solo	4355,60
Óleo Diesel	235,67
NH ₄ NO ₃	62,04
K ₂ HPO ₄	12,36
Água	347,00

Fonte: O autor (2023).

- **Biorreatore com consórcio de micro-organismos:** solo não esterilizado, com o ajuste de água e nutrientes e o bioaumento com inóculo de micro-organismos eficazes. Composição exposta na Tabela 3.

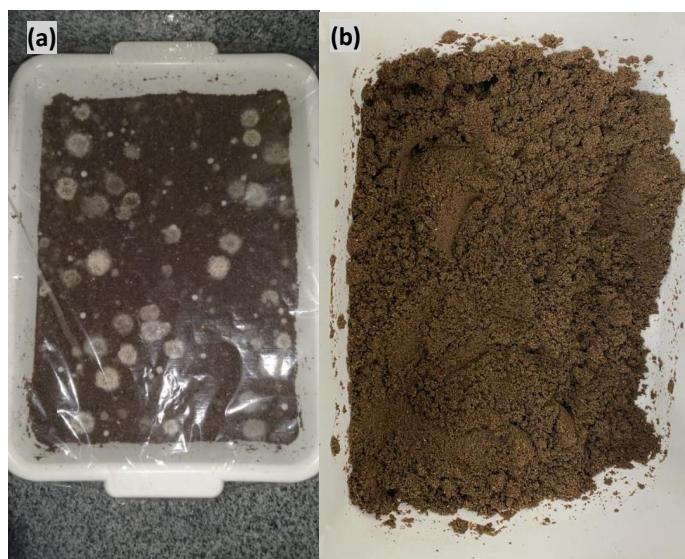
Tabela 3. Componentes do biorreatore com consórcio de microrganismos.

Componente	Quantidade (g)
Solo	2478,40
Óleo Diesel	132,64
NH ₄ NO ₃	34,91
K ₂ HPO ₄	6,96
Água	41,7
Inóculo de microrganismos eficazes	300,00

Fonte: O autor (2023).

Os biorreatores foram montados em bandejas de policloreto de vinila (PVC); a primeira bandeja, dimensões 28 cm x 20,5 cm x 6,4 cm foi utilizada para o bioaumento com o consórcio de bactérias e leveduras, Figura 8a. Na Figura 8b pode-se observar outra bandeja, com dimensões 55 cm x 42 cm x 13 cm, que foi utilizada para montar o biorreator com solo que foi esterilizado e apresentou menor concentração celular.

Figura 8. Biorreatores utilizados para o solo com consórcio e solo com menor concentração celular, respectivamente. (a) solo com bioaumento; b) solo com menor concentração celular



Fonte: O autor (2023).

Os biorreatores foram configurados utilizando-se a combinação de água, óleo Diesel, nutrientes e inóculo (em solução aquosa) equilibrada com base na relação massa/massa.

O biorreator para avaliação das taxas de corrosão dos corpos de prova foi pesado seguindo o mesmo padrão dos biorreatores utilizados para biodegradação do óleo Diesel, conforme Tabela 4.

Tabela 4. Componentes do biorreator.

Componente	Quantidade (g)
Solo	3.304,34
Óleo Diesel	176,85
NH ₄ NO ₃	46,54
K ₂ HPO ₄	9,273
Água	63,00
Inóculo de microrganismos eficazes	400,00

Fonte: O autor (2023).

Para todos os sistemas foram feitas a homogeneização de todos os componentes listados. Os nutrientes NH₄NO₃ e K₂HPO₄ foram solubilizados previamente em água destilada.

3.5.2. Respirômetros de Bartha

O teste de biodegradação em respirômetros de Bartha foi realizado por 35 dias. Foram montados o teste de biodegradação para 9 sistemas, todos em triplicata. O branco foi montado para descontar possíveis traços de CO₂ dissolvidos na solução de KOH (0,2 N).

Os 9 respirômetros foram divididos em triplicata, de acordo com classificação:

- **Branco:** solução de KOH (0,2 N);
- **Solo controle:** composto apenas por solo com umidade ajustada;
- **Solo “estéril”:** composto por solo e Diesel que passaram por processos de esterilização, com correção de água e nutrientes na proporção de C, N e P (100; 10; 1) e o contaminante, o óleo Diesel S-10. Os respirômetros foram desinfetados com peróxido de hidrogênio a 100 ppm;
- **Bioaumento com consórcio de bactérias e leveduras:** solo e Diesel não estéreis, juntamente com as correções de água e nutrientes, assim como o óleo Diesel S-10.

Para o respirômetros dos sistemas controle, foram pesados apenas solo e água, conforme Tabela 5.

Tabela 5. Componentes do respirômetro para o sistema controle.

Componente	Quantidade (g)
Solo	45,75
Água	4,25

Fonte: O autor (2023).

Para cada um dos 6 respirômetros (triplicatas do sistema “estéril” e bioaumento) foram medidos os seguintes componentes listados na Tabela 6.

Tabela 6. Componentes do respirômetro para os sistemas “estéril” e bioaumento.

Componente	Quantidade (g)
Solo	43,5947
Óleo Diesel	2,201
NH ₄ NO ₃	0,6123
K ₂ HPO ₄	0,1220
Água	1,47
Inóculo de microrganismos eficazes	2,00

Fonte: O autor (2023).

Na Figura 9, observa-se os respirômetros após introdução dos conteúdos.

Figura 9. Respirômetros de Bartha em operação.

Fonte: O autor (2023).

3.5.2.1. Leitura dos respirômetros

Nos respirômetros, o solo, óleo Diesel, nutrientes, inóculo e água foram adicionados ao frasco “Erlenmeyer” e no braço lateral foram adicionadas 10 mL de solução de KOH (0,2 N), sendo repostada essa quantidade a cada dia de análise, ao longo dos 35 dias. A cada dia foi medida a condutividade das soluções da alça lateral dos respirômetros, em condutivímetro DM-32 da Digimed. Após a purga, 10 mL de KOH foram recolocados aos respirômetros, seguindo o mesmo procedimento até o término do experimento.

Os respirômetros foram incubados em temperatura ambiente em um local arejado. Para a leitura, foram retirados 10 mL da solução de KOH (0,2 N) do braço lateral com auxílio de uma pipeta automática, transferindo esse volume para um recipiente de vidro. Em seguida, o braço lateral foi lavado com 10 mL de água destilada estéril duas vezes, utilizando outra pipeta. O volume de água destilada estéril utilizada foi transferido para o mesmo recipiente de vidro onde estava a solução de KOH e misturado. Portanto, a medição da condutividade foi feita, em seguida.

É importante destacar que pipetas diferentes foram usadas para cada triplicata das amostras em branco, controle e bioaumento, a fim de evitar qualquer contaminação cruzada.

3.5.2.1.1 Curva de calibração da condutividade e molaridade de CO₂

A curva de calibração foi feita para gerar uma relação da produção de CO₂ em função da condutividade e, a partir da equação gerada pela linearização da curva, encontrar os valores de CO₂ produzido (μmol), a partir das medições feitas da condutividade nos ensaios de respirometria.

Para realizar a coleta dos dados de condutividade foi necessário fazer a fatoração da solução de KOH (mol/mL), para encontrar a curva de calibração. Portanto, a solução de KOH foi titulada com uma solução padrão de biftalato de potássio (KC₈H₅O₄) utilizando o vermelho de metila como indicador, conforme a estequiometria.



Equação 12

Foram medidos os resultados da condutividade (mS/cm) da solução de KOH, no qual, quanto menores os valores da condutividade, maiores eram os valores de CO₂ capturado, conforme dados da Tabela 1, apêndice A. A reação entre o CO₂ e o KOH libera íons carbonato. Os íons e o KOH ficam dispersos no meio aquoso, tornando o meio condutor de corrente elétrica, sendo possível a medição da condutividade (Carmona, 2016).

Para realizar a transformação dos dados de condutividade para molaridade, foi necessário construir a curva analítica. A partir dela, obtém-se a equação de conversão em que a molaridade está em função da condutividade. Para construir a curva analítica, pegaram-se 11 volumes de cada KOH a 0,2M e K₂CO₃ a 0,1 M. Foi possível calcular o número de mol de CO₂, pela proporcionalidade de K₂CO₃ e CO₂ ser 1 mol para 1 mol, conforme a Equação 13. Portanto, utilizando a Equação 14, calculou-se o número de mols de CO₂ para cada ponto.



$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad \text{Equação 14}$$

Os pontos que foram feitos foram:

Primeiro ponto: V_{KOH (0,2M)} = 10 mL; V_{H₂O} = 20 mL → n_{CO₂} = 0

Segundo ponto: V_{KOH (0,2M)} = 9 mL; V_{K₂CO₃ (0,1M)} = 1 mL e V_{H₂O} = 20 mL

Utilizando-se $C_1V_1 = C_2V_2$, **tem-se:** 0,1 M x 1 mL = C₂ x 10 mL →

$$C_2 = 0,01 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ de K}_2\text{CO}_3 \rightarrow n_{\text{CO}_2} = 0,01 \text{ mol/L}$$

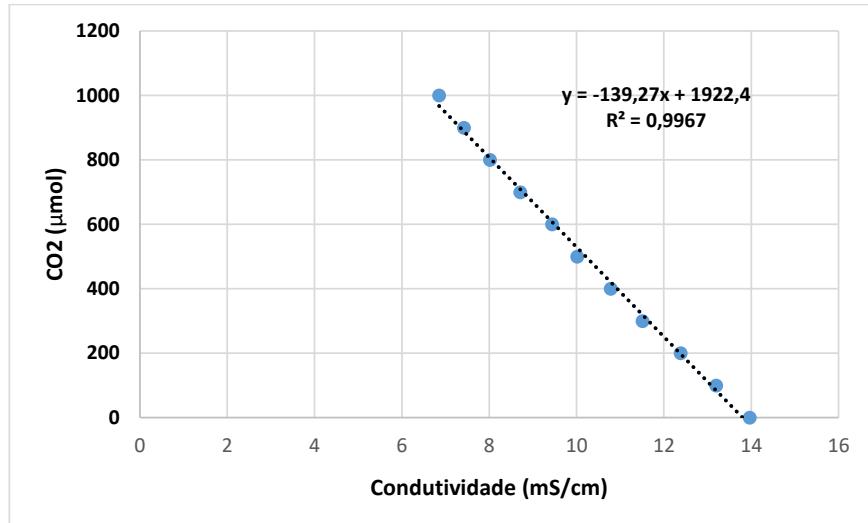
Utilizando novamente a Equação 14, fórmula da diluição de soluções, tem-se:

$$0,01 \frac{\text{mol de CO}_2}{\text{L}} \times 0,001 \text{ L} = 100 \mu\text{mol de CO}_2.$$

O procedimento foi realizado para os demais pontos, em que cada 11 dessas soluções tiveram a condutividade medida, para o desenvolvimento da curva analítica que foi utilizada posteriormente na quantificação do CO₂ produzido ao longo do experimento de biodegradação (Mazzeo, 2020.)

Os dados obtidos para construir a curva de calibração se encontram na Tabela 1, apêndice A, gerando o gráfico, conforme Figura 10.

Figura 10. Gráfico CO₂ produzido x condutividade.



Fonte: O autor (2023).

Foi tirada a média das triplicatas de todos os dados de condutividade diárias. Portanto, a quantidade de CO₂ produzido por cada sistema dos respirômetros seguiu a fórmula de conversão, conforme Equação 15:

$$y = -139,27x + 1922,4 \quad \text{Equação 15}$$

Sendo:

y – Quantidade de CO₂ produzido (μmol);

x – condutividade (mS/cm).

3.5.2.1.2 Cálculo da eficiência da biodegradação (EB)

Para o cálculo da eficiência da biodegradação foi utilizada fórmula da norma dos respirômetros (ABNT – NBR14283-1999), Equação 16:

$$EB = \frac{C_b}{C_I} * 100 \quad \text{Equação 16}$$

Em que:

EB: (%);

C_b : Valor do carbono biodegradado acumulado (mol C);

C_I : Quantidade inicial de carbono nos 50 g de solo (mol C).

Para calcular o C_b e C_I , foram utilizadas as Equações 17 e 18, respectivamente.

$$C_b = 2 * CO_{2b} \quad \text{Equação 17}$$

Em que:

C_b Carbono biodegradado acumulado (mol C);

CO_{2b} : CO_2 produzido acumulado (mol CO_2).

$$C_I = \frac{M_R COT_R}{12} \quad \text{Equação 18}$$

Em que:

C_I : Quantidade inicial de carbono (mol C);

M_R : massa de resíduo por 50 g de solo, em gramas;

COT_R : carbono orgânico total do resíduo, em grama por grama;

12: fator de conversão, em grama por mol.

3.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A quantificação microbiológica foi feita nos tempos de 0, 14, 28, 42 e 56 dias. Os grupos quantificados foram Bactérias Heterotróficas Aeróbias e Anaeróbias (BHA e BHAn, respectivamente), Hidrocarbonoclásticas, Fungos filamentosos e consórcio de bactérias e leveduras.

Toda a água utilizada nas análises microbiológicas foi colocada 90 mL em erlenmeyer de 125 mL e esterilizada em autoclave a 121 °C por 30 minutos.

Os métodos de contagem nas análises microbiológicas foram: Número Mais Provável (NMP) e Unidade Formadora de Colônia (UFC). O método NMP é um método

estatístico, com 95 % de confiança, que se baseia na distribuição dos microrganismos que estão em suspensão, sendo realizado o procedimento em 3 séries de 5 diluições ou mais, e a presença dos microrganismos determinada pela turbidez do meio de cultura (Santos et al., 2015).

Para o cálculo do NMP, utilizou-se da Equação 19.

$$NMP \text{ por grama de solo} = \frac{P}{\sqrt{NT}} \quad \text{Equação 19}$$

Em que:

P = número de tubos positivos;

N = soma da quantidade de amostra inoculada em todos os tubos negativos;

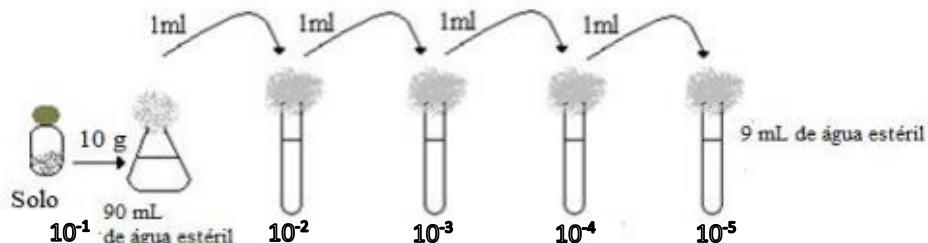
T = soma da quantidade de amostra inoculada em todos os tubos.

O método UFC, foi feito baseado no método *pour plate*, que consiste no derramamento do meio de cultura sobre a placa Petri em que se encontra o inóculo. A contagem é feita após o período de incubação em que as Unidades Formadoras de Colônias são contadas visualmente para realização do cálculo da determinação da concentração dos microrganismos (Domingues et al., 2007).

3.6.1 Quantificação das bactérias heterotróficas aeróbias (BHA)

Em um Erlenmeyer estéril de 250 mL, foram transferidos 10g de TFSA dos sistemas (bioaumento) e (solo “estéril”) em 90 mL de água destilada estéril. Com o auxílio de uma pipeta estéril foi transferido 1 mL da suspensão para o primeiro tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada estéril, tendo-se a diluição 10^{-1} , homogeneizando-se, para então 1 mL ser transferido a outro tubo de ensaio com 9 mL de água estéril, diluição 10^{-2} . Realizou-se a diluição seriada do 10^{-1} ao 10^{-9} , conforme a Figura 11.

Figura 11. Diluição seriada para isolamento de microrganismos.



Fonte: adaptado de Câmara (2023).

Após as diluições realizadas foram transferidos 1 mL de cada diluição aos tubos contendo 9 mL de meio caldo nutritivo (Tabela 7). Os tubos foram incubados em estufa a temperatura de 30 °C. Após 48 horas de incubação, foi realizada a quantificação das BHA pelo método do NMP.

Tabela 7. Componentes do meio Caldo Nutritivo para 1 L de água destilada.

Componentes	Quantidade (g)
Peptona de carne	5,0
Extrato de carne	3,0
Sacarose	20,0

Fonte: O autor (2023).

Na Figura 12 está exposto os tubos organizados na grade após incubação das BHA.

Figura 12. Tubos de ensaio com BHA após as 48 horas de incubação.



Fonte: O autor (2023).

3.6.2 Quantificação das bactérias heterotróficas anaeróbicas (BHAn)

Para o preparo da diluição de 10^{-1} , 1g de TFSA foi vertido em 9 mL de solução redutora (Tabela 8), representando o 10^{-1} . Em seguida, 1 mL foi retirado da diluição 10^{-1} e transferido para o próximo tubo de penicilina contendo solução redutora, realizando diluição seriada de 10^{-1} ao 10^{-9} . Após as diluições, foram transferidos, com o auxílio de seringas descartáveis, 1 mL de cada diluição nos tubos de penicilina contendo 9 mL de meio tioglicolato, com componentes do meio listados na Tabela 9, que foi purgado com nitrogênio por 20 minutos para expulsar o oxigênio.

Tabela 8. Componentes da solução redutora para 1 L de água destilada.

Componentes	Quantidade (g)
Tioglicolato de sódio	0,124
Resazurina (0,025 %)	4,0 mL
Ácido ascórbico	0,1

Fonte: O autor (2023).

Tabela 9. Componentes do meio tioglicolato para 1 L de água destilada.

Componentes	Quantidade (g)
Meio pronto tioglicolato	30,0
Resazurina	0,001
Ágar	0,75

Fonte: O autor (2023).

Após a inoculação, os frascos vedados com tampa de borracha e lacres de alumínio foram incubados à temperatura de 30 °C por 28 dias. Após o período de incubação, foi realizada a quantificação das bactérias anaeróbias pelo método do NMP/g. Na Figura 13 pode-se observar os frascos após incubação dessas bactérias.

Figura 13. Frascos de penicilina com crescimentos positivados (-1 ao -3) e negativados (-4 ao -6).



Fonte: O autor (2023).

3.6.3 Quantificação dos fungos filamentosos e leveduras

Para quantificar os fungos foi feita a mesma diluição de 10^{-1} a 10^{-9} realizada para as BHA, 1 mL de cada diluição foi distribuída em placas de Petri descartáveis, adicionando-se 15 mL de meio *Sabouraud* (Tabela 10) fundido, com posterior homogeneização.

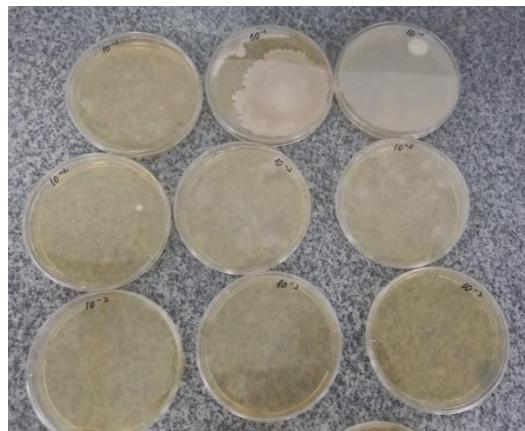
Tabela 10. Componentes do meio *Sabouraud* para 1 L de água destilada.

Componentes	Quantidade (g)
Meio pronto <i>Sabouraud</i>	65,0

Fonte: O autor (2023).

Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa à temperatura de 30 °C por 5 dias. Após incubação foi realizada a quantificação dos fungos pelo método da contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC). Na Figura 14, estão expostas as placas Petri após incubação.

Figura 14. Placas após a inoculação e incubadas por 5 dias.



Fonte: O autor (2023)

3.6.4 Quantificação das bactérias e leveduras do consórcio

Para quantificar as bactérias do consórcio foi feita a diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-9} realizada para as BHA e fungos, utilizando-se o meio de TSA (Tabela 11), com homogeneização posterior.

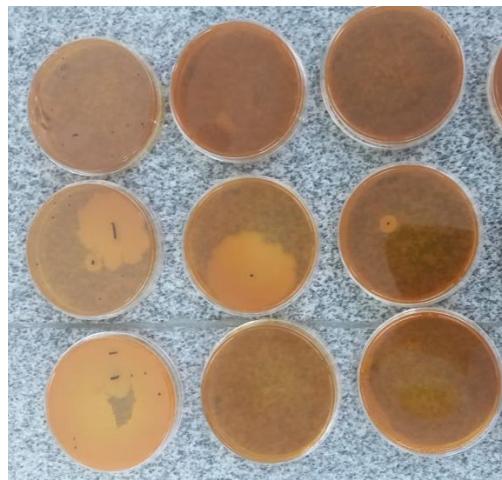
Tabela 11. Componentes do meio TSA para 1 L de água destilada.

Componentes	Quantidade (g)
Meio <i>Tryptic Soy Broth</i> (TSB)	30,0
Ágar	5,0

Fonte: O autor (2023).

Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa à temperatura de 30 °C por 48 horas. Após incubação foi realizada a quantificação do consórcio por UFC. Na Figura 15 é possível observar as placas de Petri após incubação.

Figura 15. Placas após período de incubação de 48 horas.



Fonte: O autor (2023).

3.6.5 Quantificação das hidrocarbonoclásticas

Para quantificar a bactérias hidrocarbonoclásticas foram utilizadas placas de poços para realizar a inoculação, em triplicata, onde pipetou-se 0,1 mL das diluições de 10^{-1} a 10^{-9} , adicionando-se 50 μ L de óleo Diesel filtrado (explicitado na seção 3.6.5.1) e 7 mL de meio BH líquido (Tabela 12).

Tabela 12. Componentes do meio BH líquido para 1 L de água destilada.

Componentes	Quantidade (g)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20
CaCl ₂	0,02
K ₂ HPO ₄	1,00
KH ₂ PO ₄	1,00
NH ₄ NO ₃	1,00
FeCl ₃	0,05

Fonte: O autor (2023).

Uma placa de poços controle foi realizada, sem inóculo, para fins de comparação e garantir a confiabilidade das leituras e da esterilidade do óleo Diesel filtrado. Após a inoculação, os poços foram incubados em estufa a temperatura 30 °C,

por 7 dias. Após isso, foi feita a quantificação das hidrocarbonoclásticas pelo método do NMP/g. Na Figura 16 estão expostas as placas de poços utilizadas.

Figura 16. Poços utilizados para inoculação das hidrocarbonoclásticas.



Fonte: O autor (2023).

3.6.5.1 Esterilização do óleo Diesel

O óleo Diesel foi esterilizado dentro da capela de inoculação, em ambiente desinfectado por luz ultravioleta, utilizando-se um filtro de seringa estéril com membrana 0,22 µm feita de Polietersulfona (PES) e uma seringa de 3,0 mL, conforme Figura 17.

Figura 17. Seringa e filtro estéreis utilizados na esterilização do óleo Diesel.



Fonte: O autor (2023).

3.7 TAXA DE CORROSÃO

O cálculo da taxa de corrosão, dos corpos de prova de aço-carbono ASTM A-36 foi realizado de acordo a norma ASTM G1-03 (2011).

Os corpos de prova foram previamente preparados com o lixamento, limpeza da sujidade em álcool isopropílico e acetona. Com a medida das dimensões (comprimento, largura e espessura), com média de 28 mm x 18,2 mm x 8,4 mm e, com as massas pesadas em balança analítica. Foram enterrados 15 corpos de prova, como pode ser observado na Figura 18. Os cupons foram retirados em triplicata nos tempos de 7, 14, 28, 42 e 56 dias.

Figura 18. Corpos de prova enterrados no biorreator.

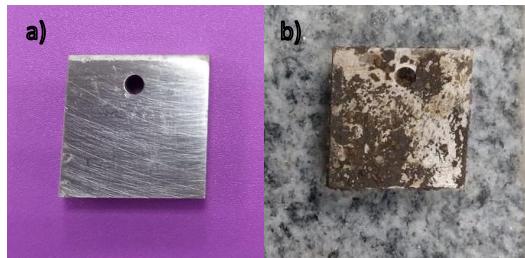


Fonte: O autor (2023).

Os cupons retirados dos biorreatores passaram por uma limpeza preliminar das partículas aderidas às superfícies com auxílio de uma escova com cerdas macias e realização de decapagem ácido em seguida. Os cupons passaram por ciclos de imersão em ácido clorídrico (15 %) de 10 segundos, seguindo-se de lavagem em água corrente, lavagem em água destilada, álcool isopropílico, acetona e secos com jato de ar. Os cupons foram pesados em balança analítica com precisão de 5 casas decimais, e o ciclo de decapagem realizado até obtenção de massa constante. Na Figura 19a, pode-se observar o corpo de prova inicial e na Figura 19b, o corpo de prova antes da decapagem.

Figura 19. Corpos de prova utilizados nas taxas de corrosão.

a) Corpo de prova inicial; (b) Corpo de prova retirado do biorreator.



Fonte: O autor (2023).

Para o cálculo da perda de massa foi utilizada a metodologia ASTM G1-03 (2011), que calcula as taxas de corrosão pela Equação 20.

$$\text{Taxa de corrosão} = \frac{K * W}{A * T * D} \quad \text{Equação 20}$$

Em que:

Taxa de corrosão (mm/ano);

K – Constante: $8,76 \times 10^4$ (adimensional);

A – Área total do material em contato com o meio corrosivo (cm^2);

T – Tempo de exposição (horas);

W – Massa perdida pelo material (gramas);

D – Densidade do material ($7,86 \text{ g/cm}^3$).

Após calcular as taxas de corrosão em cada ponto, houve a classificação da taxa de corrosão do aço de acordo com a Tabela 13.

Tabela 13. 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: NACE-RP-07-75 (2005).

3.7.1 Microscopias

Para realizar a Microscopia Óptica foi utilizado um microscópio metalúrgico Olympus BX51M, com imagens geradas em computador, conforme Figura 20a. Para realizar a Microscopia Eletrônica de Varredura foi utilizado o microscópio de mesa Hitachi TM3000, com imagens geradas no computador, conforme Figura 20b.

Figura 20. Microscópio metalúrgico Olympus BX51M e Microscópio de mesa Hitachi TM3000, respectivamente.



Fonte: O autor (2023).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO

4.1.1 Caracterização físico-química do solo

A caracterização do solo *in natura* por granulometria está apresentada na Tabela 14.

Tabela 14. Resultados da análise de granulometria do solo.

Parâmetro	Resultado (g/kg)
Areia	957,00
Silte	12,00
Argila	31,00
Classe textural	Arenoso

Fonte: O autor (2023).

O solo arenoso, tipo de solo utilizado neste trabalho possui propriedades que facilitam sua utilização: retém menos água, não são predispostos a formar agregados, aumentando sua densidade e, consequentemente, o tamanho de seus poros, diminuindo a compactação. Essas características são interessantes para a biorremediação pois, os solos argilosos possuem alta capacidade de retenção de água, podendo comprometer difusão de oxigênio, elemento fundamental para que a degradação aeróbica ocorra, além de não facilitar a incorporação de nutrientes (Andrade; Augusto; Jardim, 2010; Kim *et al.*, 2022; Motta; Barcelos, 2007).

O solo arenoso também é mais denso, com densidade do solo compreendida entre 1,7 a 1,8 g/cm³. Quanto mais matéria orgânica, menos denso é o solo, ou seja, o solo arenoso tem uma menor quantidade de matéria orgânica em comparação com um solo argiloso, que é menos denso (Melo *et al.*, 2008; Reinert *et al.*, 2008).

Na Tabela 15 é possível observar a análise físico-química completa do solo estudado, antes da contaminação com o óleo Diesel S-10 e a correção de água e nutrientes.

Tabela 15. Propriedades físico-químicas do solo estudado antes da contaminação com óleo Diesel S-10.

Parâmetro	Resultado
Retenção de água	30 %
Densidade de partícula	2,67 g/mL
Densidade aparente	1,49 g/mL
Porosidade	43,99 %
Teor de umidade	0,35 %
pH	8,02
Carbono Orgânico Total	< 0,50 %
Óleos e graxas	0,20 %
Nitrogênio total	124,60 mg/Kg de N
Fósforo	18,29 mg/dm ³ de P
Potássio	0,15 cmol/dm ³ de K
Enxofre	38 mg/dm ³ de S
Ferro	30 mg/dm ³ de Fe

Fonte: O autor (2023).

O pH do solo foi de 8,02, ou seja, um solo básico. O pH nesta faixa favorece a atividade microbiana, pois um solo ácido pode reduzir significativamente o desenvolvimento dos micro-organismos, principalmente das bactérias (Andrade; Augusto; Jardim, 2010).

Um dos parâmetros importantes é o teor de umidade do solo. A água atua na movimentação dos micro-organismos, nutrientes e do próprio contaminante, além de afetar as atividades microbianas (Baptista *et al.*, 2003), pois o solo precisa de uma quantidade adequada de água para que os micro-organismos consigam sobreviver, reproduzir e realizar suas funções, do contrário, sem umidade adequada, pode haver redução de alguns microrganismos do solo, como as fixadoras de nitrogênio (Araújo; Hungria, 1994). Portanto, o ajuste do solo para 60 % da umidade teve como objetivo aumentar a atividade microbiana, visto que as bactérias são as maiores responsáveis pela degradação do petróleo, além de manter a temperatura equilibrada (Andrade; Augusto; Jardim, 2010).

4.1.2 Caracterização físico-química do óleo Diesel

O óleo Diesel S-10 utilizado nos experimentos foi comprado em posto de combustível BR que, juntamente na compra, foram coletadas suas propriedades, conforme Tabela 16.

Tabela 16. Propriedades físico-químicas do óleo Diesel S-10.

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

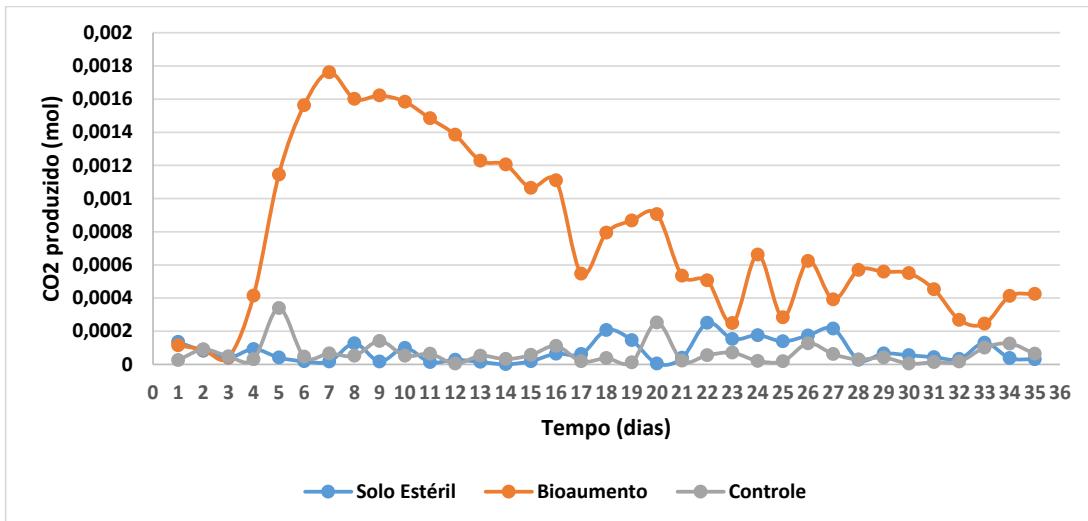
Fonte: O autor (2023).

Por ter um ponto de fulgor baixo, o óleo Diesel possui frações de hidrocarbonetos mais leves, facilmente evaporados, tornando-se altamente inflamável, porém há frações mais pesadas do óleo Diesel que o torna um óleo com densidade média (Além da superfície, 2019). Portanto, as propriedades do óleo Diesel utilizados no experimento estão dentro da normalidade esperado para o produto.

4.2 TAXA DE BIORREMEDIACÃO POR RESPIROMETRIA

A partir da Equação 15 e da condução do ensaio de degradação respirométrica, foi possível avaliar a respiração basal diária dos sistemas estudados, conforme a Figura 21.

Figura 21. Quantidade de CO₂ produzido pelos solos, controle, “estéril” e com bioaumento, no período de 35 dias.



Fonte: O autor (2023).

Conforme a Figura 21, o solo “estéril” e controle tiveram comportamentos relativamente constantes e semelhantes, não apresentando nenhum pico evidente que estivesse relacionada a uma taxa de biodegradação significativa. Isso, provavelmente ocorreu porque o solo controle não recebeu a introdução de óleo Diesel, portanto, a produção de CO₂ encontrada foi referente à respiração basal normal do solo, sendo esperado sua baixa produção de dióxido de carbono (Montagnolli, 2011). Quanto ao solo “estéril”, seu comportamento se manteve próximo do zero, pois tanto o solo, quanto o diesel foram esterilizados, assim como a água utilizada para dissolver os nutrientes.

Como os comportamentos do solo “estéril” e controle foram semelhantes, as concentrações celulares iniciais existiram, mesmo sendo baixas, indicando que havia atividade microbiana em ambos os sistemas.

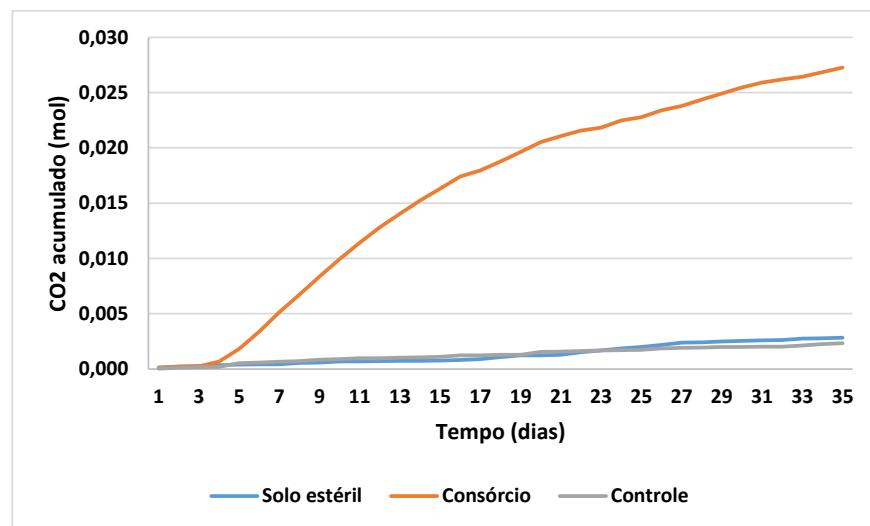
Para o bioaumento, inicialmente houve uma produção mais elevada devido à possível facilidade de biodegradação das fases mais leves, tendo seu pico máximo de produção no tempo igual a 7 dias. A produção de CO₂ posteriormente teve uma queda a partir no tempo igual a 9 dias, caracterizando uma possível diminuição dos componentes do Diesel mais facilmente biodegradados, ou desbalanceamento dos

nutrientes. Alguns outros picos foram formados nos tempos 20, 24, 26 e 28 dias, caracterizando, possivelmente, a degradação de frações mais pesadas do Diesel (Montagnolli, 2011).

Na curva do bioaumento, nota-se que a presença dos micro-organismos introduzidos aumentou significativamente a taxa de biorremediação do solo, pois sua introdução resultou em uma taxa de decomposição dos hidrocarbonetos mais acelerada (Jacques; Silva; Bento; Camargo, 2010).

O total de CO₂ produzido nos respirômetros ao longo de todo o processo de biodegradação é chamado de produção acumulada de CO₂. Esse acúmulo pode ser observado na Figura 22.

Figura 22. Produção acumulada de CO₂ nos ensaios respirométricos: solo “estéril”, bioaumento e controle.

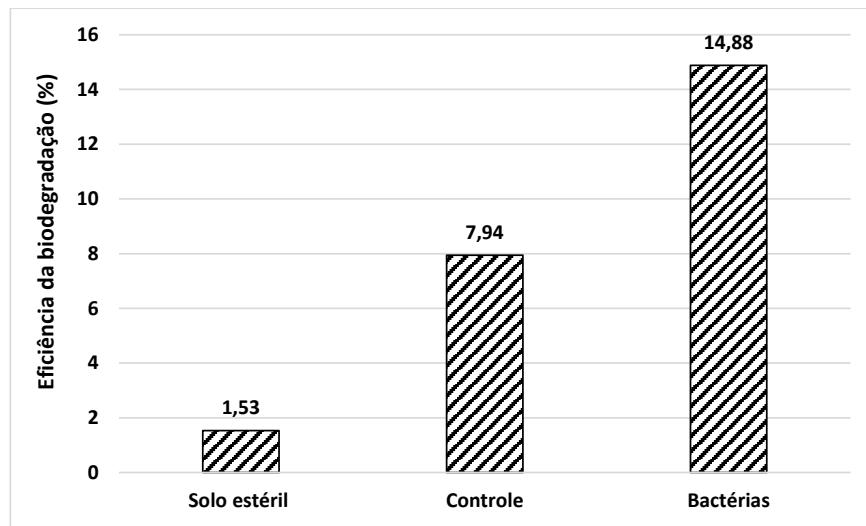


Fonte: O autor (2023).

A partir da Figura 22 foi possível notar que a produção de CO₂ do sistema bioaumento foi muito alta, sendo um aumento de mais de 1.000,00 % em relação ao sistema controle, e mais de 800,00 % em relação ao sistema “estéril”. Portanto, indicando que o consórcio se adaptou bem ao meio e conseguiu iniciar o processo de degradação do óleo Diesel de forma satisfatória.

Com os dados da produção acumulada de CO₂ e a quantidade de carbono inicial dos respirômetros, foi feita a eficiência da biodegradação (EB), conforme Figura 23.

Figura 23. Eficiência da biodegradação durante 35 dias de experimento.



Fonte: O autor (2023).

Com base nas representações apresentadas nas Figura 22 e Figura 23 foi possível observar que a eficácia do processo de bioaumento demonstrou-se satisfatória, uma vez que resultou em uma porcentagem de degradação do óleo Diesel superior em comparação com os demais tratamentos. É perceptível que nos primeiros cinco dias de biodegradação no biorreator com aplicação de bioaumento, houve uma baixa taxa de respiração basal, o que provavelmente se deve à introdução do consórcio de micro-organismos. Este período inicial pode ter sido caracterizado por uma fase latente, durante a qual os micro-organismos se adaptaram ao novo ambiente, com ajustes na regulação de fatores como umidade, aeração, porosidade e disponibilidade de nutrientes, bem como em resposta à presença do contaminante, conforme sugerido por Ferreira (2007).

Mariano et al. (2007), também utilizou bioaumento em sua pesquisa para biodegradação em óleo diesel, porém com consórcio composto por *Ochrobactrum*

anthropi, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Bacillus cereus* e proporção de nutrientes C:N:P de 100:15:1, também em solo arenoso. A eficiência resultou em 13,5 % com 55 dias de análise. Portanto, o consórcio utilizado no atual trabalho demonstrou uma eficiência condizente com tempo de incubação utilizado na biodegradação do óleo diesel.

Em uma estratégia utilizada na biorremediação do óleo diesel, Silva (2023) fez uso da bioestimulação em solo arenoso com balanceamento de nutrientes na proporção de C:N:P de 100:10:1, juntamente com adição de 0,5% de goma xantana, obtendo eficiência de 34,78 % na biodegradação do óleo diesel em 84 dias de estudo. Em contrapartida, o estudo atual demonstrou uma eficácia cerca de 20% inferior em relação à pesquisa precedente, considerando uma duração de análise reduzida em 28 dias. Essa observação conduz à consideração de que, uma extensão do período de estudo, poderia potencialmente resultar em uma melhora na eficiência de biodegradação.

De acordo com a norma ABNT NBR14283-1999, para o tratamento ser considerado viável é preciso ter eficiência acima de 30%. No período de 35 dias analisados, o bioaumento não conseguiu atingir essa porcentagem de eficiência, porém, como a produção de CO₂ se manteve crescente em todo o experimento, provavelmente o tratamento com bioaumento conseguiria chegar à eficiência desejada, caso o período de análise fosse maior.

4.3 QUANTIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

No tempo inicial (T = 0 dia), as concentrações microbiológicas iniciais para cada grupo foram listadas:

- Bactérias heterotróficas aeróbias (BHA): $1,5 \times 10^6$ NMP/g de solo;
- Bactérias heterotróficas anaeróbias (BHAn): $3,0 \times 10^7$ NMP/g de solo;
- Fungos: $1,4 \times 10^4$ UFC/g de solo;
- Hidrocarbonoclásticas: $3,5 \times 10^7$ NMP/g de solo;
- Consórcio de bactérias e leveduras: $5,3 \times 10^7$ UFC/g de solo.

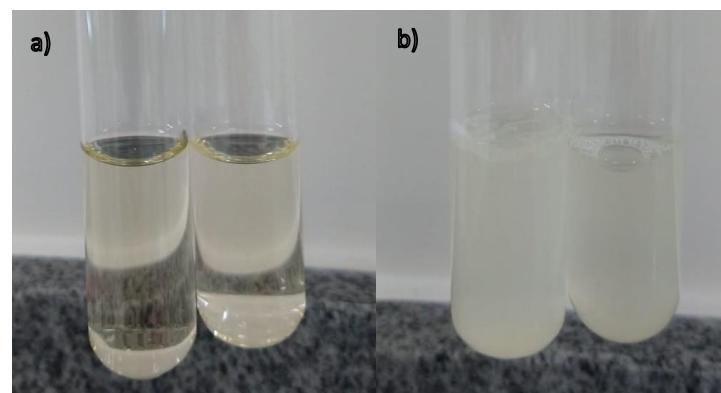
No solo que passou por esterilização foram detectadas BHA na concentração de $1,0 \times 10^2$ NMP/g de solo e fungos na concentração de 2,0 UFC/g de solo, evidenciando que a esterilização diminuiu a concentração celular das BHA em praticamente 10.000 vezes e os fungos praticamente foram eliminados ao iniciar os experimentos.

Nota-se pelas quantidades iniciais apresentadas que as BHAn estão em maiores quantidades que as BHA, isso pode ter relação com a quantidade de oxigênio disponível no solo, ou apenas um resultado pontual, pois a distribuição dos micro-organismos no solo não é uniforme, ou seja, pode haver pontos mais oxigenados que outros no solo possibilitando que nessas áreas as bactérias aeróbias cresçam com mais facilidade (Goi; Souza, 2006).

4.3.1 Bactérias heterotróficas aeróbias (BHA)

A confirmação de presença das BHA nos tubos se deu pela turbidez do meio, conforme Figura 24.

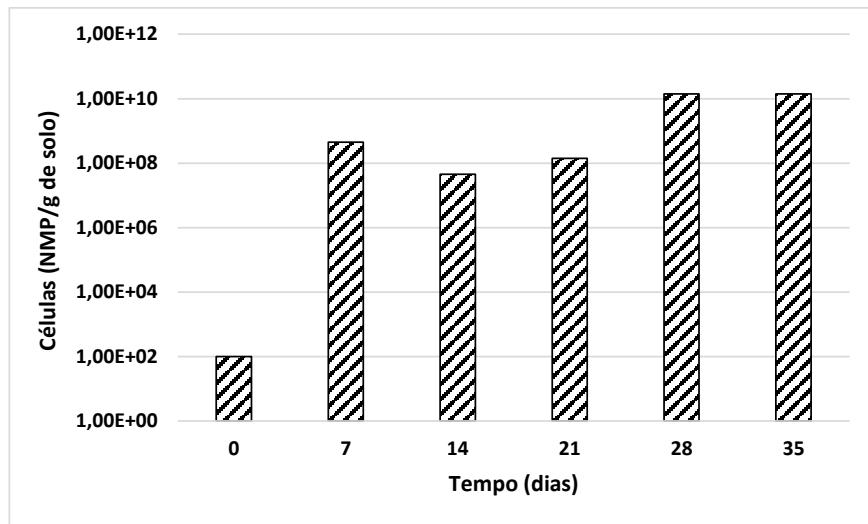
Figura 24. Tubos contendo meio aeróbio: (a) meio límpido, (b) meio turvo.



Fonte: O autor (2023).

A Figura 25 mostra o comportamento das BHA no solo “estéril”.

Figura 25. BHA no sistema esterilizado ao longo dos 35 dias estudados.

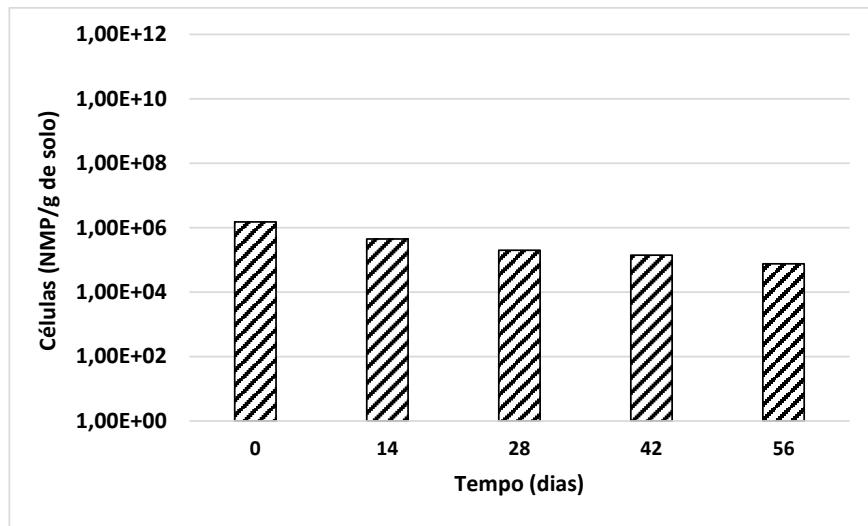


Fonte: Adaptado de Câmara (2023).

Através da Figura 25 é possível notar que o solo esterilizado ainda apresentou uma concentração celular de BHA. Essa presença de micro-organismos foi estimulada pela presença de óleo Diesel, assim como umidade e nutrientes ajustados no solo, resultando no seu crescimento elevado logo nos primeiros 7 dias. O crescimento nos tempos iguais a 28 e 35 dias, provavelmente são resultado da degradação de frações um pouco mais pesadas do óleo Diesel, pois nos primeiros dias, frações mais leves são degradadas e evaporadas com mais facilidade.

A partir da contagem feita em NMP, a Figura 26 expõe o comportamento das BHA no solo com bioaumento.

Figura 26. BHA no sistema com bioaumento ao longo dos 56 dias estudados.



Fonte: O autor (2023).

Na Figura 26, o ponto inicial, apresentou crescimento de BHA já elevado, sendo esperado esse comportamento pois o solo inicial apresentou bactérias aeróbias nativas, visto que é um ambiente oxigenado possibilitando sua sobrevivência e reprodução. As BHA são os micro-organismos em maiores quantidades no solo, de um total de seres vivos encontrados em densidade na ordem de grandeza de 10^7 a 10^9 células vivas/g de solo, as bactérias correspondem a 10^8 (Cardoso; Andreato, 2016; Rocha; Reis; Olivares, 2017).

Também é observada na Figura 26 uma redução na ordem de grandeza das BHA com o passar do tempo (de 10^6 para 10^4). Isso, provavelmente se deve à diminuição na quantidade de matéria orgânica, devido o processo de biodegradação realizado por essas bactérias, pois elas precisam de matéria orgânica para se desenvolverem (ou diminuição dos outros nutrientes, N e P). Além de que a quantidade de oxigênio ao longo do tempo provavelmente diminuiu, pois ele é utilizado durante o metabolismo, produzindo após a degradação CO_2 e água (Araújo *et al.*, 2014).

Ainda no Figura 26, o decréscimo na quantidade de BHA pode ter acontecido também pois, ao comparar os pontos em comum dos gráficos 18 e 19, no tempo igual

a 14 e 28 dias, as BHA cresceram no solo “estéril” enquanto no solo com bioaumento houve queda. Provavelmente houve uma relação ecológica negativa, chamada de competição, em que os micro-organismos introduzidos competiram por fonte de energia, comum aos micro-organismos autóctones, proveniente dos nutrientes e do óleo Diesel resultando em uma diminuição no seu crescimento (Mendes, 2011; Teixeira *et al.*, 2010).

4.3.2 Bactérias heterotróficas anaeróbias (BHAn)

A confirmação de presença das BHAn nos tubos se deu pela turbidez do meio, conforme a Figura 27.

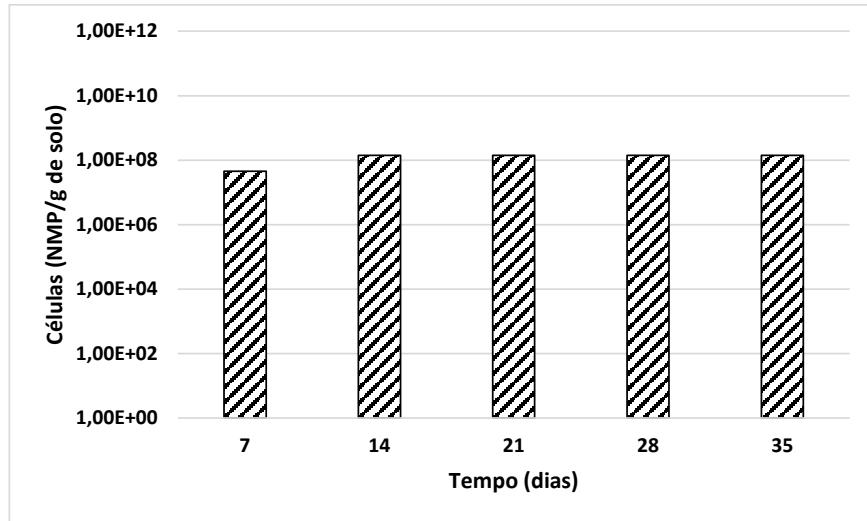
Figura 27. Tubos contendo meio anaeróbio.



Fonte: O autor (2023).

A partir da contagem feita em NMP, a Figura 21 expõe comportamento das BHAn no solo “estéril”.

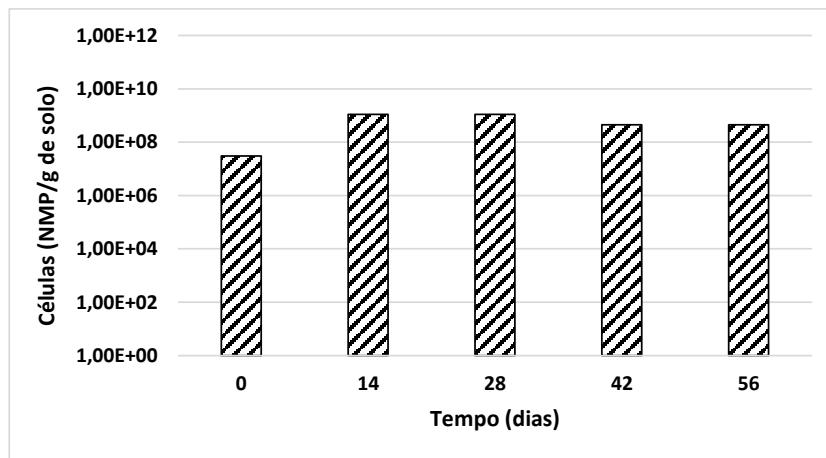
Figura 28. BHAn no sistema estéril, ao longo dos 35 dias estudados.



Fonte: Adaptado de Câmara (2023).

A partir da contagem feita em NMP, a Figura 29, mostra comportamento das BHAn no solo com bioaumento.

Figura 29. BHAn no sistema com bioaumento ao longo dos 56 dias estudados.



Fonte: O autor (2023).

No sistema que passou por esterilização (Figura 28), houve o crescimento de BHAn. A principal causa de um crescimento já elevado com 7 dias de experimento,

provavelmente ocorreu por o sistema não ficar em condições estéreis e também grupos de bactérias anaeróbias que esporulam e são mais difíceis de esterilizar.

Na Figura 29, BHAn em solo com bioaumento foi observada a existência de concentração menor no tempo inicial, depois um crescimento maior desse grupo após 14 dias, indicando que o oxigênio do sistema estava sendo consumido pelas BHA (Figura 26), tornando o ambiente propício ao crescimento das BHAn. Além de que as bactérias anaeróbias utilizam menos energia para formar massa celular, facilitando o seu desenvolvimento (Araújo *et al.*, 2014).

4.3.3 Hidrocarbonoclásticas

A confirmação de presença das bactérias hidrocarbonoclásticas nos poços se deu pela turbidez do meio, conforme a Figura 30.

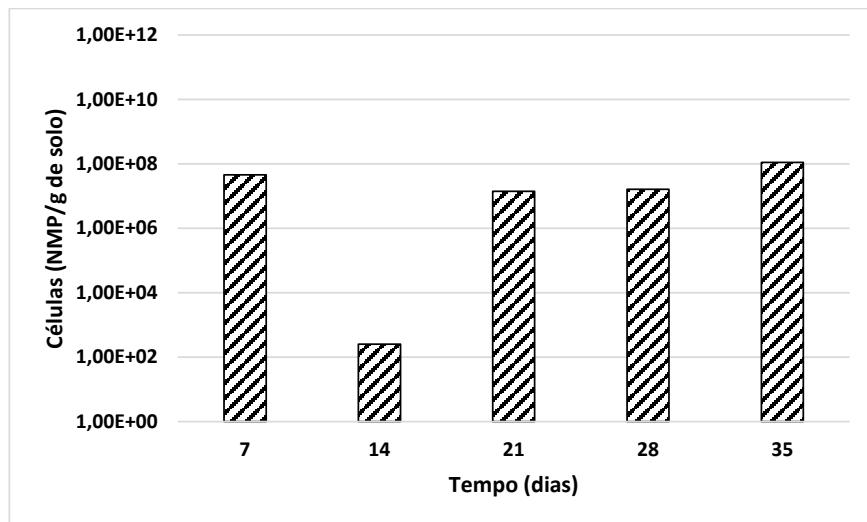
Figura 30. BHAn no sistema com bioaumento ao longo dos 56 dias estudados.



Fonte: O autor (2023).

A partir da contagem feita em NMP, na Figura 31 foi possível observar o comportamento das hidrocarbonoclásticas no solo “estéril”.

Figura 31. Hidrocarbonoclásticas no sistema estéril ao longo dos 56 dias estudados



Fonte: Adaptado de Câmara (2023).

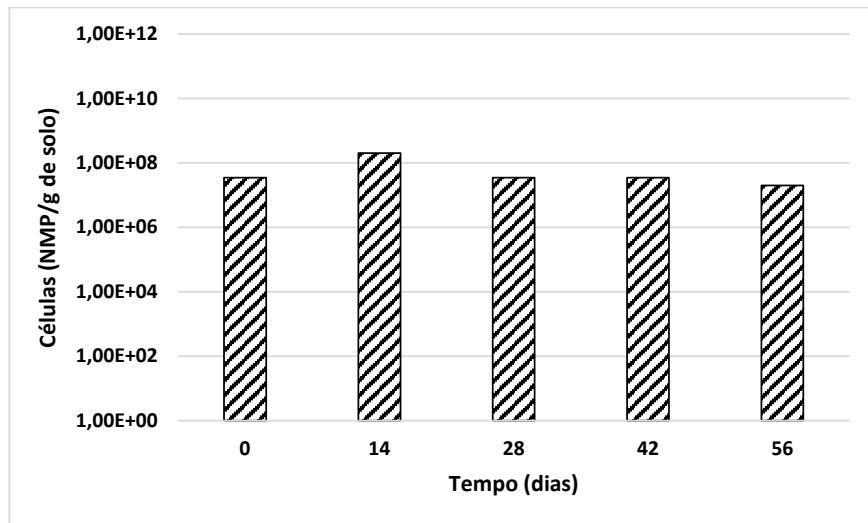
Na Figura 31 foi possível observar uma concentração já elevada das bactérias hidrocarbonoclásticas com 7 dias de experimento para o sistema que passou por esterilização, provavelmente a presença do Diesel propiciou esse crescimento rápido. O crescimento já elevado nos primeiros dias, pode ter sido consequência do local em que o solo foi retirado que, mesmo se retirando solo sem vestígios de contaminação, este ainda poderia apresentar óleos e graxas residuais (item 4.1.1), pois o local da coleta do solo ficava próximo de tanques de armazenamento e unidades de hidrotratamento de Diesel do Porto de Suape.

Com o tempo igual a 14 dias, a concentração das bactérias hidrocarbonoclásticas nesse sistema teve uma brusca queda, talvez por os compostos de degradação mais fáceis já terem sidos utilizados, fazendo com que essa concentração diminuísse.

A concentração celular das hidrocarbonoclásticas voltou a subir nos tempos posteriores, mantendo-se alta no final do experimento, provavelmente pela existência de fonte de energia em forma de carbono proveniente do óleo Diesel.

A Figura 32 mostra a contagem realizada em NMP, para as baterias hidrocarbonoclásticas no solo com bioaumento.

Figura 32. Hidrocarbonoclásticas no sistema com bioaumento ao longo dos 56 dias estudados.



Fonte: O autor (2023).

Pela Figura 32, pode-se ver que mesmo no solo inicial, sem a introdução do óleo Diesel e do consórcio, já havia bastantes micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos. Isso se deve, provavelmente, ao local em que o solo foi retirado, pois se refere a uma localidade próxima à refinaria possibilitando a adaptação de micro-organismos no solo contendo resíduos de óleo Diesel nas proximidades da área de coleta, fazendo com que as hidrocarbonoclásticas já tenham iniciado seu desenvolvimento.

No ponto tempo igual a 14 dias foi possível notar um aumento no número de micro-organismos, possivelmente devido à introdução do óleo Diesel e do consórcio, estimulando os micro-organismos já existentes no solo a degradarem os hidrocarbonetos, pois o óleo Diesel atuou como fonte de carbono, proporcionando o aumento da população de hidrocarbonoclásticas.

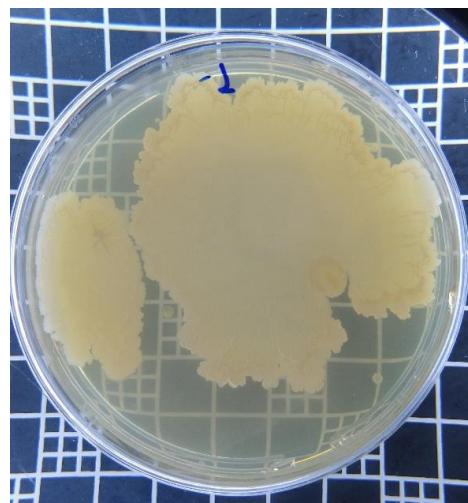
Nas quantificações posteriores ao tempo igual a 14 dias, a concentração de hidrocarbonoclásticas permaneceu a mesma, pois o consórcio contribuiu para o processo de degradação do óleo Diesel, visto que os micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos crescem de forma significativa em ecossistemas poluídos. Porém, esse tipo de micro-organismo representa menos de 0,1 % da população microbiana total, caso o ambiente não esteja contaminado (Marques; Rizzo; Barros, 2010).

No tempo 56, a concentração de hidrocarbonoclásticas permaneceu elevada e não houve grande variação em relação aos dias anteriores. Isso provavelmente aconteceu, devido a necessidade de um tempo maior do experimento para ser notada uma queda nesta quantificação celular, pois como a eficiência do bioaumento resultou em aproximadamente 15 %, item 4.3, ainda havia grande quantidade de óleo Diesel a ser biodegradado por essas bactérias e outros micro-organismos contidos no solo.

4.3.4 Fungos

A confirmação da presença de fungos nas placas se deu pela formação de colônias no meio, conforme a Figura 33.

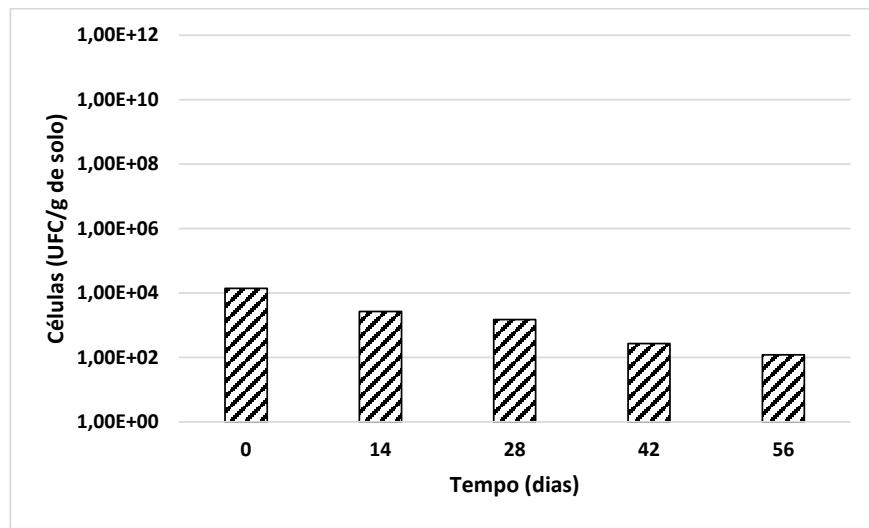
Figura 33. Colônias de fungos na placa de Petri.



Fonte: O autor (2023).

Através da contagem feita em UFC, observa-se na Figura 34 o comportamento dos fungos no solo com bioaumento.

Figura 34. Fungos no sistema com bioaumento ao longo dos 56 dias estudados.



Fonte: O autor (2023).

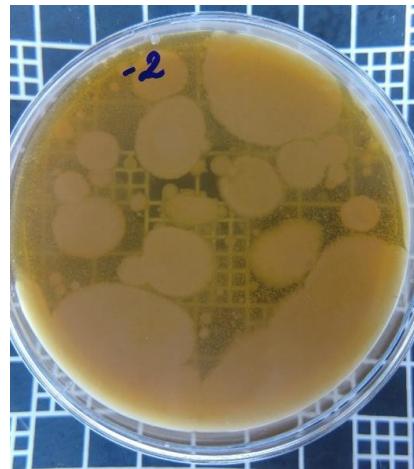
Conforme a Figura 34, a população de fungos decai bastante ao longo do tempo (10^4 a 10^2), isso pode ter acontecido pelo fato de haver fungos aeróbios, que dependem muito do oxigênio para se desenvolverem, sendo prejudicadas pelo intenso metabolismo das bactérias heterotróficas aeróbias. Porém, uma parte ainda consegue se manter, sendo provavelmente leveduras pois conseguem sobreviver na ausência de oxigênio (Parapouli *et al.*, 2020).

Segundo Flores, Mendonça e Baroni (2011), fungos conseguem quebrar compostos orgânicos de forma eficiente quando estão em uma concentração viável de 989 ± 15 mg/L, sendo possível a sua utilização na biorremediação. Apesar de sua diminuição ao longo do tempo, os fungos conseguem resistir às variações do meio e continuar degradando o óleo Diesel, pois em comparação com as bactérias possuem vantagens por serem persistentes e tolerarem diversos tipos de estresses, como mudanças de temperatura, pH e umidade (Barbosa, 2022).

4.3.5 Consórcio de bactérias e leveduras

A confirmação da presença das bactérias e leveduras do consórcio nos biorreatores se deu pela formação de colônias destas nos meios, conforme a Figura 35.

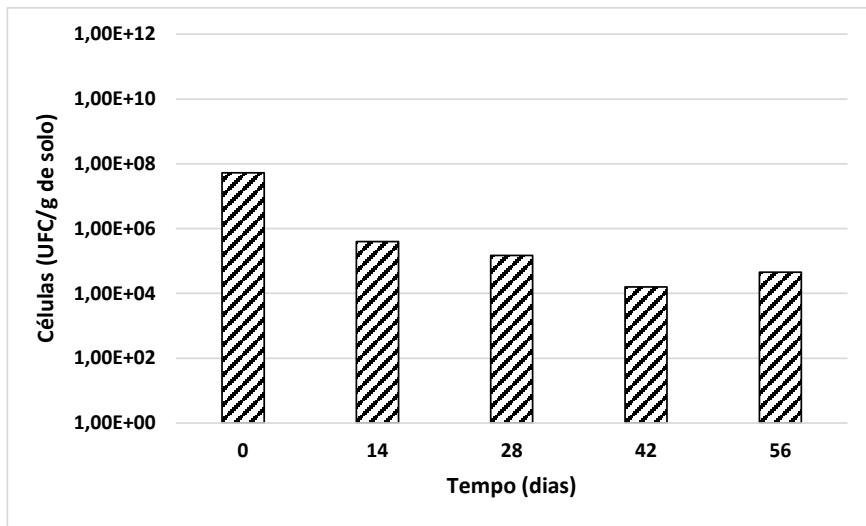
Figura 35. Colônias de bactérias e leveduras na placa de Petri.



Fonte: O autor (2023).

A partir da contagem feita em UFC, Figura 36, analisou-se o comportamento do bioaumento de bactérias e leveduras no solo.

Figura 36. Bactérias e leveduras no sistema com bioaumento ao longo dos 56 dias.



Fonte: O autor (2023).

Na Figura 36, nota-se que o solo inicial possuía uma concentração inicial alta do consórcio de bactérias e leveduras e que, após a introdução desses micro-organismos, *Lactobacillus* e *Saccharomyces*, a população diminuiu (ordem de grandeza de 10^7 para 10^4). Uma possível explicação para essa queda na concentração no tempo igual a 14 dias é a capacidade dos *Lactobacillus* competirem com outros micro-organismos por nutrientes e sítios de adesão, além de que eles alteram o metabolismo microbiológico, caso que ocorre aumentando ou diminuindo a atividade enzimática (Mendes, 2011).

A partir do tempo igual a 14 dias, a população não variou muito, apresentando uma leve queda nos últimos pontos, provavelmente ocasionada pela competição entre os micro-organismos, mas no tempo igual a 56 dias houve um pequeno aumento, podendo indicar uma alteração no metabolismo microbiológico. Com um tempo maior de experimento, seria possível analisar se realmente houve uma mudança no perfil de crescimento desses micro-organismos.

Quanto à biodegradação do óleo Diesel com o bioaumento, inicialmente havia $4,0 \times 10^5$ UFC/g solo, concordando com a alta produção de CO₂ liberada pelo metabolismo dos micro-organismos. A partir do tempo igual a 14 dias, houve uma

relativa queda de micro-organismos, relacionada com a diminuição na produção de CO₂. Esta queda pode não estar relacionada à redução de matéria orgânica, visto que, pela eficiência, ainda havia grande quantidade de óleo Diesel a ser degradado. Porém, a baixa nas quantidades de CO₂ pode ter relação com frações mais pesadas do óleo Diesel que não foram bem degradadas até o tempo igual a 42 dias, podendo ter iniciado a partir do tempo igual a 56 dias, onde se observa um leve aumento na quantidade do consórcio microbiano.

Outra hipótese levantada é que o decréscimo dos *Lactobacillus* ter ocorrido pelo fato de não terem conseguido degradar o óleo diesel, restando no biorreatore apenas as bactérias autóctones do solo para realizar a biodegradação, visto que *Lactobacillus* são tratados na literatura por preferirem substratos mais simples como cereais, bebidas fermentativas, queijos e produtos lácteos, sendo, portanto, o óleo diesel um composto complexo demais para esses micro-organismos (Silva, 2013).

4.3.6. Eficiência dos óleos e graxas residual.

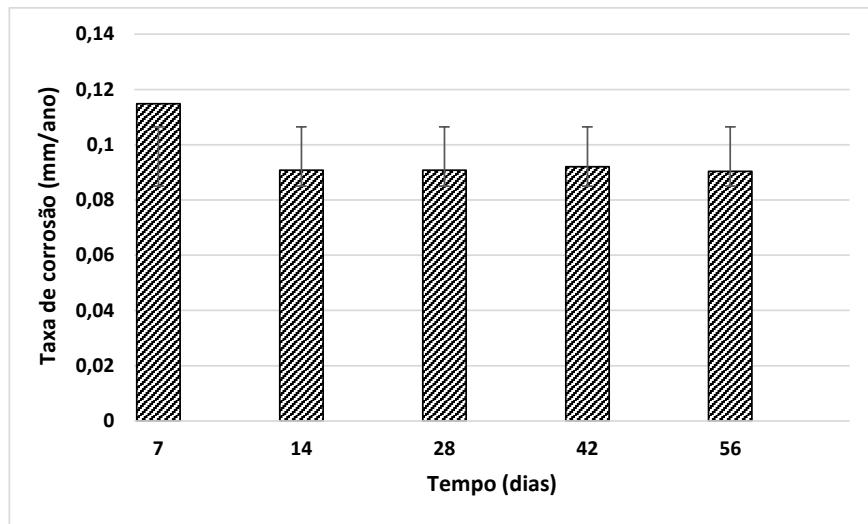
A eficiência da biodegradação, através da análise do teor de óleos e graxas, no sistema com a inserção do consórcio microbiano foi feita utilizando a mesma fórmula da seção 3.5.2.1.2. Portanto, como o percentual inicial de óleos e graxas foi de 5,0 % e o final resultou em 0,2 %, de acordo com a análise feita pelo método 5520 C, a eficiência resultou em um valor de 96,0 %. Por essa análise, o consórcio e os micro-organismos presentes no solo conseguem degradar o óleo Diesel de forma eficaz em um tempo relativamente curto.

4.4 TAXA DE CORROSÃO

As taxas de corrosão dos aços nos biorreatores, controle e bioaumento com consórcio de micro-organismos foram feitas nos tempos de 7, 14, 28, 42 e 56 dias.

A Figura 37 mostra as taxas de corrosão média dos aços no biorreatore controle.

Figura 37. Taxa de corrosão dos aços no biorreator controle – desvio padrão da triplicata.



Fonte: adaptado de Silva (2023).

De acordo com o gráfico da Figura 37 é possível notar que o solo controle, com correção apenas da umidade, as taxas de corrosão dos aços se mostraram bastante estáveis, com queda nas taxas de corrosão após 7 dias de exposição. A taxa de corrosão média para este biorreator foi de 0,0958 mm/ano. Segundo classificação da NACE (National Association of Corrosion Engineers) Internacioal (2005), é considerada uma corrosividade moderada, muito provavelmente ligada às características do solo arenoso e ao aporte de água ao sistema, favorecendo o fluido atuar como eletrólito.

No tempo igual a 7 dias, o cupom de aço ficou exposto ao solo, suscetível ao ataque dos íons e moléculas agressivos ao material como o oxigênio que pode causar a corrosão por aeração diferencial, que ocorre devido à heterogeneidade do solo, que faz com que o oxigênio e outros gases não se difundam homogeneousmente, afetando diversos equipamentos industriais, principalmente na indústria do petróleo em que há muitas tubulações subterrâneas (Gentil; Carvalho, 2022).

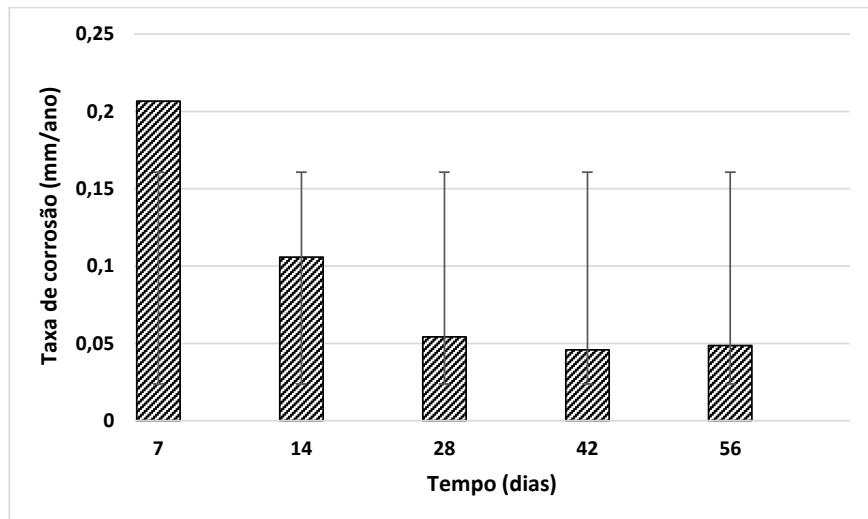
Há também a corrosão sob depósito, em que as áreas do cupom com partículas de solo e substâncias produzidas pelos micro-organismos, chamados de *biofouling*, atuam como zonas anódica, e as áreas do cupom descobertas, atuam como zonas catódicas, aumentando o potencial de corrosão dos aços por formação de *pites*

(Gentil, 2017). Os próprios micro-organismos já existentes no solo também podem atuar na corrosão do material, influenciando na velocidade das reações catódicas e anódicas, modificando a resistência dos materiais metálicos por produtos excretados pelo metabolismo microbiano e formando tubérculos, que favorecem o surgimento de pilhas por aeração diferencial (Gentil; Carvalho, 2022).

A estabilização nas taxas de corrosão após os 7 dias de experimento aconteceu, muito provavelmente, por conta da camada de óxidos de ferro e biofilme produzidos, que se tornaram mais compactos com o tempo e realizaram um efeito de barreira protetiva sobre os corpos de prova, protegendo-os da corrosão pelos agentes externos e minimizando a corrosividade (Silva, 2021; Oliveira 2016).

A partir dos cálculos da taxa de corrosão média feitos para cada triplicata, a Figura 38 expõe o comportamento da corrosão sobre os corpos de prova no solo com bioaumento.

Figura 38. Taxa de corrosão dos aços no biorreator com bioaumento – desvio padrão da triplicata.



Fonte: O autor (2023).

De acordo com a Figura 38, nota-se uma queda acentuada nas taxas de corrosão dos aços nos tempos iguais a 7 e 14 dias, atingindo certa estabilidade a partir do tempo igual a 28 dias. A taxa de corrosão média dos aços para este biorreator

resultou em 0,0922 mm/ano, sendo considerada também uma corrosividade moderada.

Nos tempos iniciais de 7 e 14 dias, a taxa de corrosão dos aços resultou em valores muito altos, em média de 0,1561 mm/ano, resultando em uma taxa de corrosão inicialmente alta, por consequência da alta agressividade do meio sobre os corpos de prova, esses ficando vulneráveis ao ataque dos íons e ácidos produzidos pelas bactérias. A oxigenação diferencial pode também ter causado a corrosão por aeração diferencial e sob depósito. A adição do consórcio microbiano e a água também potencializaram a corrosão sobre os materiais nos primeiros pontos.

A partir do ponto tempo igual a 28 dias, houve uma diminuição nas taxas de corrosão dos aços, em relação aos tempos iniciais e a estabilização dessas taxas, resultando em média de 0,0495 mm/ano, essa sendo considerada uma taxa de corrosão moderada. A diminuição nas taxas de corrosão é resultado das barreiras protetivas compostas pelos óxidos de ferro e biofilmes formado pelos micro-organismos (Videla, 2003; Oliveira 2016).

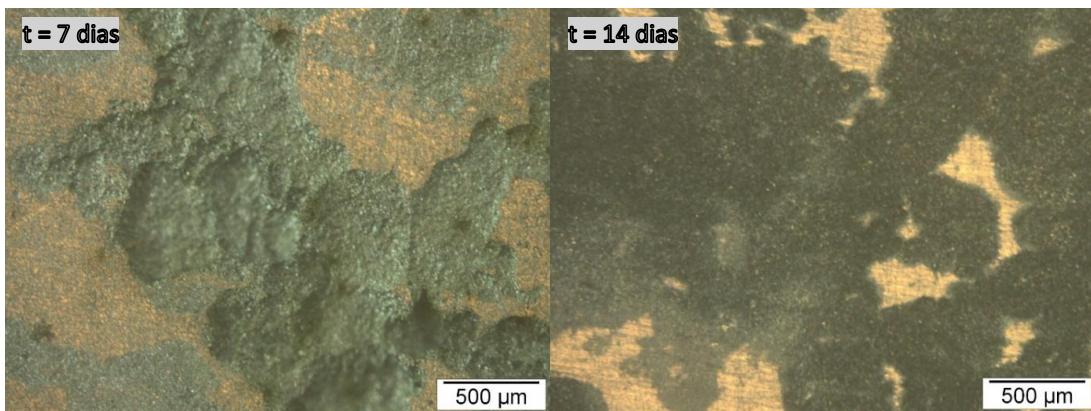
Um comparativo entre os dois biorreatores, controle e consórcio, mostrou que a inserção do tratamento praticamente não alterou a corrosividade dos meios, sendo ambos de corrosividade moderada e com seus valores médios próximos. Apesar de no contexto geral, apresentarem valores de corrosividade aproximados, seus comportamentos foram significativamente distintos entre si, pois o biorreator controle se manteve praticamente constante durante todo o experimento, muito provavelmente devido à não alteração da concentração de micro-organismos e carga de óleo Diesel. Do contrário, o biorreator com o bioaumento apresentou um declínio acentuado nos valores da taxa de corrosão, pois nos primeiros pontos, o material foi bastante corroído, e nos pontos finais as taxas de corrosão dos aços descaíram e mantiveram-se relativamente constantes, pois a barreira protetiva formada pelos óxidos de ferro, biofilmes e o óleo Diesel protegeram os corpos de prova da corrosão.

4.5 MICROSCOPIA

4.5.1 Microscopia Óptica

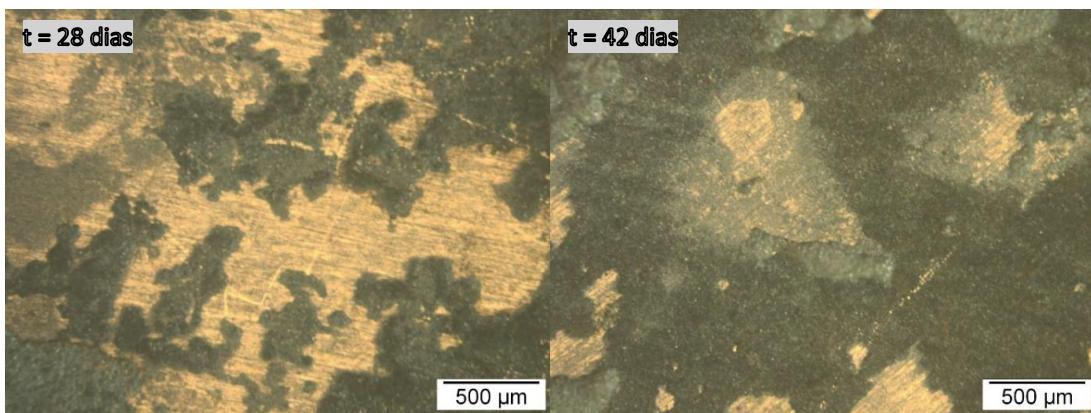
Os cupons de aço foram observados em microscópio óptico na amplitude de 500 μ m, conforme Figuras 39, 40 e 41.

Figura 39. Microscopia óptica nas superfícies dos aços nos t = 7 e 14 dias.



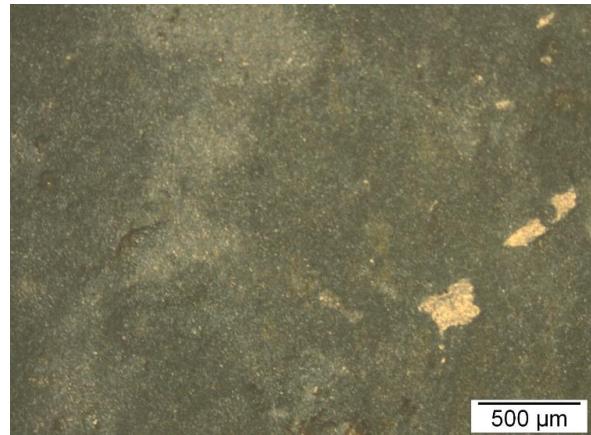
Fonte: O autor (2023).

Figura 40. Microscopia óptica nas superfícies dos aços nos t = 28 e 42 dias.



Fonte: O autor (2023).

Figura 41. Microscopia óptica nas superfícies dos aços no $t = 56$ dias.



Fonte: O autor (2023).

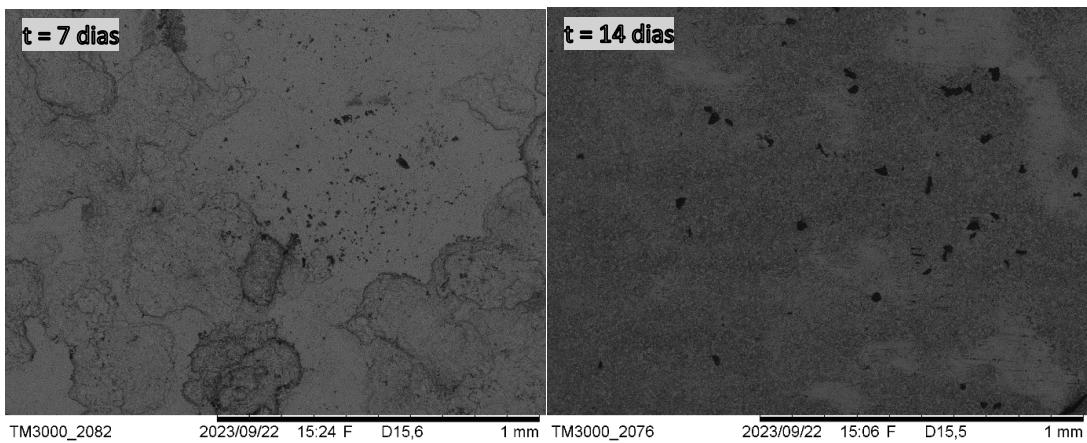
Pelas Figuras mostradas foi possível observar que com o passar dos dias, os produtos de corrosão (região escura), como óxidos de ferro, ocuparam grande parte dos corpos de prova (região clara). Esses produtos de corrosão, mesmo sendo uma degradação do aço tem ação protetiva sobre este, evitando novos ataques corrosivos do meio, como comentado na seção 4.4. Alguns pontos ficaram embaçados pois o microscópio captura imagens planas, portanto, na presença de produtos de corrosão acumulados, formando determinada altura ou profundidade, o equipamento não consegue focar a região e mostrar mais detalhes.

Nas imagens não é possível observar se houve formação de *pites*, mas é notória a formação de corrosão uniforme e generalizada à medida que o tempo passa.

4.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

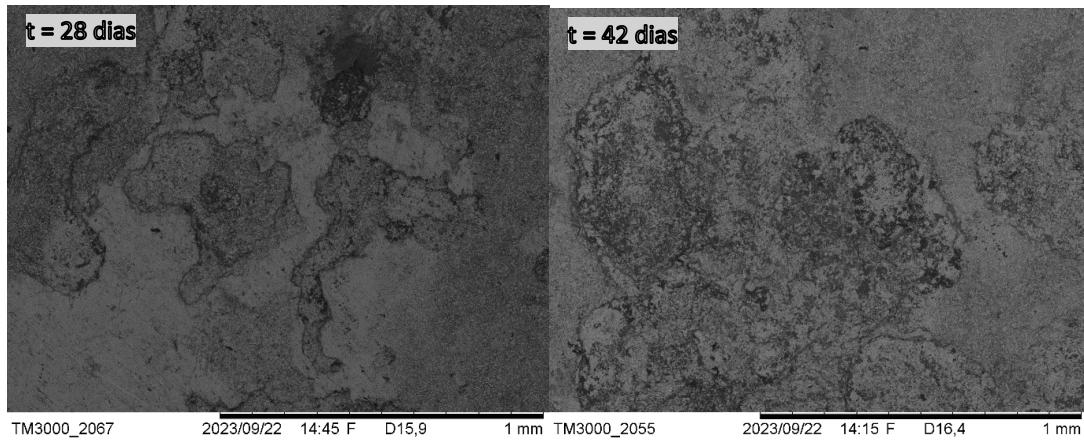
Os cupons de aço carbono foram observados em MEV na amplitude 100x, conforme Figuras 42, 43 e 44.

Figura 42. MEV nas superfícies dos aços nos $t = 7$ e 14 dias.



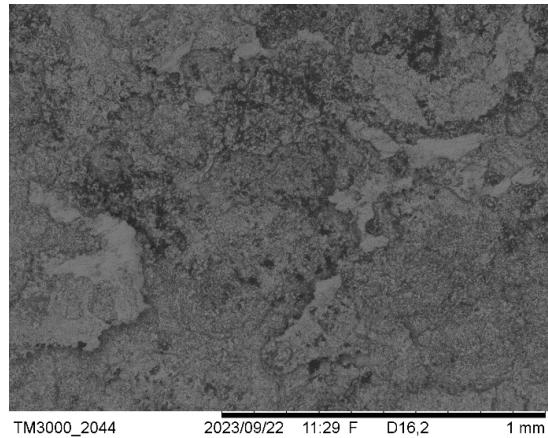
Fonte: O autor (2023).

Figura 43. MEV nas superfícies dos aços nos $t = 28$ e 42 dias.



Fonte: O autor (2023).

Figura 44. MEV nas superfícies dos aços no $t = 56$ dias.



Fonte: O autor (2023).

De acordo com as Figuras mostradas foi possível observar que nos tempos 7 e 14 dias houve a formação de vários pontos escuros, sendo uma provável corrosão por *pites* que, inicialmente foi bastante intensa. A partir do tempo 14 dias, a corrosão por *pites* diminuiu, provavelmente causada pela proteção do óleo Diesel, dos óxidos de ferro e biofilmes formados sobre as superfícies do aço-carbono. No tempo 56 dias, a corrosão foi generalizada, em que se pode ver regiões mais escuras por várias partes do metal, enquanto os pontos escuros vistos inicialmente não foram observados com clareza.

5 CONCLUSÃO

O solo coletado foi caracterizado como sendo arenoso, conveniente para a biorremediação pois a porosidade alta também facilita o escoamento da água e a dissolução do oxigênio no meio.

No solo que passou por esterilização, quantificou-se a presença de bactérias e fungos em menor concentração, sendo possível concluir que o tempo de esterilização utilizado não foi suficiente para eliminar todos os microrganismos existentes no solo.

Foram quantificados no solo da região do Porto de SUAPE, inúmeros tipos de micro-organismos capazes de realizar a biorremediação, como as bactérias heterotróficas aeróbias, anaeróbias, as hidrocarbonoclásticas, fungos e leveduras.

O consórcio de *Lactobacillus* e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que foram introduzidas ao solo do Porto de SUAPE, demonstraram adaptação ao meio e degradação do óleo Diesel pela eficiência observada que, em comparação aos demais sistemas analisados, apresentou aproximadamente o dobro da eficiência.

A biorremediação por bioaumento atingiu uma eficiência de aproximadamente 15 % através dos ensaios respirométricos, que não foi um resultado satisfatório do ponto de vista da norma, mas pelo comportamento do processo de degradação crescente, possivelmente a eficiência atingiria um valor maior, em tempo de experimento maior.

A avaliação sobre as taxas de corrosão dos aços, demonstrou que o tratamento empregado não alterou a corrosividade do material em relação ao controle, sendo as duas corrosividades dos aços classificadas como moderada, para os solos controle e com bioaumento. Sendo assim, é recomendável utilizar o consórcio de micro-organismos para a biorremediação em solos de área próxima à região da refinaria Abreu e Lima do Porto de SUAPE, atentando para o fato que nos primeiros dias os micro-organismos podem incrementar as taxas de corrosão dos equipamentos e tubulações enterradas, mas que essas taxas se estabilizam ao se aumentar o tempo de exposição.

REFERÊNCIAS

“Quais são os tipos de óleo diesel? ”. **Centenário Diesel**, 2020. Disponível em: http://centenariodiesel.com.br/tipos-de-oleo-diesel/#Tipos_de_Diesel. Acesso em: 08/09/2023.

ALLGAYER, Alexandre André. **Caracterização das propriedades mecânicas e metalúrgicas de uma junta de aço ASTM A36 soldado pelo processo de arco submerso (saw) com diferentes aportes térmicos**. 72f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Mecânica) – Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2017.

AMARAL, Isabele Campos Costa; CARVALHO, Leandro Vargas Barreto de; PIMENTEL, Joyce Neri da Silva; PEREIRA, Angélica Cardoso; VIEIRA, Jucilene Aparecida; CASTRO, Vinicio Soares de; BORGES, Renato Marçulho; ALVES, Sérgio Rabello; NOGUEIRA, Simone Mitri; TABALIPA, Marianne de Medeiros; OTERO, Ubirani Barros; OLIVEIRA, Katia Maria Pinto Guedes de; CORRÊA, Sérgio Machado; FONSECA, Antônio Sérgio Almeida; MOREIRA, Josino Costa; PERES, Frederico; TEIXEIRA, Liliane Reis; MENEZES, Marco Antônio Carneiro; MATTOS, Rita de Cássia Oliveira da Costa; SARCINELLI, Paula de Novaes; LARENTIS, Ariane Leites. Avaliação ambiental de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos) e biomarcadores de genotoxicidade em trabalhadores de postos de combustíveis. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1. Julho/2016.

American Society for Testing and Materials. **ASTM G1-03**: Standard Practice for Preparing, Cleaning and Evaluating Corrosion Test Specimens. West Conshohocken: ASTM, 2011.

ANDRADE, Deborah Cordeiro de. **Estudo da remediação de solo contaminado com diesel ou cromo (vi) aplicando eletrocinética e barreira reativa permeável de cortiça**. 141f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2022.

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

ANJOS, Ana Paula Machado dos. **Interfaces e limites de aplicabilidade entre a lei do óleo e o anexo iv da convenção MARPOL 73/78**. 101f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialista em Direito Ambiental) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

ARAÚJO, Adolf Hitler Cardoso De. O tratamento de águas através da biorremediação – uma revisão de literatura. **Realize Editora**, 2017. Disponível em: <https://www.editorarealize.com.br/index.php/artigo/visualizar/39065>. Acesso em: 23/04/2022.

ARAÚJO, Elaine Patricia. **Estudo do comportamento de bactérias aerobias e anaerobias totais na biodegradabilidade de resíduos sólidos urbanos da cidade de Campina Grande-PB**. 116f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e

Ambiental) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Tecnologias e Recursos Naturais, Campina Grande, 2011.

ARAÚJO, Elaine Patrícia; DUARTE, Kalina Lígia de Souza; SILVA, Alessandra dos Santos; RIBEIRO, Libânia da Silva; MONTEIRO, Veruschka Escarião Dessoles. Estudo sobre o comportamento de bactérias aeróbias totais em biorreatores de bancada preenchidos com resíduos orgânicos. In: **Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental**, 2014, Belo Horizonte – Minas Gerais. p. 1-6.

ARAÚJO, Lindomar Cordeiro Antunes, RIBEIRO, Paulo Roberto da Silva; REZNIK, Leila Yone; LUTTERBACH, Márcia Teresa Soares; SÉRVULO, Eliana Flávia Camporese. Comportamento da corrosão microbiológica de aço duplex com aplicação de sais de quaternário de amônio. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, jan/jun. 2018.

Armazenamento: Interferindo na qualidade. **BiodieselBR**, 2007. Disponível em: <https://www.biodieselbr.com/revista/006/armazenamento-2>. Acesso em: 08/09/2023.

ARRUDA, Flávia Virgínia Ferreira de. **Biodiversidade de fungos filamentosos em água do mar e aplicação de consórcio na degradação de óleo diesel**. 99f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área da biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

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

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 7181**. Solo – Análise Granulométrica. Rio de Janeiro: ABNT, 1984.

BARBOSA, Matheus dos Santos. **Importância dos fungos de podridão branca do gênero Ganoderma na biodegradação e biorremediação de compostos xenobióticos: uma revisão**. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, 2022.

Biodiesel: desvantagens e vantagens. **Hexag Medicina**, 2022. Disponível em: <https://cursinhoparamedicina.com.br/blog/quimica-blog/biodiesel-desvantagens-e-vantagens/>. Acesso em: 08/09/2023.

BURITI, Flávia Carolina Alonso; ISAY SAAD, Susana Marta. Bactérias do grupo Lactobacillus casei: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **ALAN**, Caracas, v.57, n.4, p. 373-380. São Paulo, 2007.

CÂMARA, Camila Santos. **Estudo da biorremediação e taxa de corrosão do aço carbono em solo do porto de suape contaminado com diesel s10, utilizando bioestímulo de nutrientes e bioaumento com fungos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira; ANDREOTE, Fernando Dini. **Microbiota do Solo**. 2^a edição. Piracicaba, São Paulo: ESALQ, 2016. 221p.

CARMONA, Nathalia Froiman. **Respirometria aplicada a solos contaminados por derivados de petróleo e fluorcarbonados em condições climáticas reais**. 70f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Ambiental) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro, 2016.

CARVALHO, José Henrique da Silva. **Conservação de água, Tratamento, Reuso e Reciclo de Efluentes em Refinaria de Petróleo**. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CIANNELLA, Roberta Carvalho. **Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado por diesel B5**. 182f. Dissertação (Mestrado em Química Ambiental) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

COLA, Geovana Poton Arcobel; SIMÃO, João Batista Pavesi. Rochagem como forma alternativa de suplementação de potássio na agricultura agroecológica. **Revista Verde**, Mossoró – RN, v. 7, n. 4, p. 15-27, outubro-dezembro, 2012.

COLLA, Tatiana S. **Avaliação da biorremediação de solo contaminado pela mistura B10 por consórcio bacteriano**. 138f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Porto Alegre, 2012.

CONCEIÇÃO, Mauro da; MANZATTO, Celso Vaine; ARAÚJO, Wilson SantAnna de; MARTIN NETO, Ladislau; SAAB, Sérgio da Costa; CUNHA, Tony Jarbas Ferreira; FREIXO, Alessandra Alexandre. **ESTUDO COMPARATIVÔ DE MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO TEOR DE MATÉRIA ORGÂNICA EM ORGANOSSOLOS**. **Embrapa Solos** – Comunicado Técnico, n.2, p. 2, dezembro, 1999.

DALLA COSTA, Karine Angélica; FERENZ, Mariane; SILVEIRA, Sheila Mello da; MILLEZI, Alessandra Farias. Formação de biofilmes bacterianos em diferentes superfícies de indústria de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 71, n. 2, p. 75-82, abr/jun. 2016.

Diesel – Ficha de Informação Toxicológica. **CETESB**, São Paulo, 2020. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2020/07/Diesel.pdf>. Acesso em: 05/09/2023.

DOMINGUES, Vanessa Oliveira; TAVARES, Gilda Dias; STÜKER, Fernanda; MICHELOT, Tiago Mozzaquattro; REETZ, Luiz Gustavo Brenner; BERTONCHELI, Claudia de Mello; HÖRNER, Rosmari. Contagem de bactérias heterotróficas na água para consumo humano: comparação entre duas metodologias. **Saúde**, Santa Maria, v. 33, n. 1: p 15-19, 2007.

Efeitos da poluição. **CETESB**, São Paulo, 2013. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/solo/efeitos-da-poluicao/>. Acesso em: 05/09/2023.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de Métodos de Análise de Solo** / Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 2^a edição. Rio de Janeiro: Revista Atual, 1997. 212p.

FELIPE, M. B. M. C.; MACIEL, M. A. M.; MEDEIROS, S. R. B.; SILVA, D. R. Aspectos Gerais Sobre Corrosão e Inibidores Vegetais. **Revista Virtual de Química**, Universidade Federal de Fluminense, v. 5, n. 4, p. 746-758. Agosto/2013.

FERNANDES, Matheus Gonzalez. **Parâmetros químicos, microbiológicos e de toxicidade otimizados para a aplicação da vinhaça em solo**. 85f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2023.

FERREIRA, Luciana Chaves. **Aspectos bioquímicos e moleculares de bactérias isoladas de Terra Preta Antropogênica (TPA) na região da Amazônia Brasileira**. 90f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

FONSECA, Letícia Rocha; PONTES, Patrícia Procópio. Efeito da proporção de nutrientes na biorremediação de solo contaminado com óleo diesel. **Águas Subterrâneas**, 2019. Disponível em: <https://aguassubterraneas.abas.org/asubterraneas/article/view/29630>. Acesso em: 28/09/2023.

FRAUCHES-SANTOS, C.; ALBUQUERQUE, M. A.; OLIVEIRA, M. C. C.; ECHEVARRIA, A. A Corrosão e os Agentes Anticorrosivos. **Revista Virtual de Química**, Seropédica – Rio de Janeiro, v. 6, n. 2, p. 293-309. Dezembro/2013.

GALDINO, Carlos Alberto Bezerra; SANTOS, Esmeraldo Macêdo dos; PINHEIRO, José Ivam; MARQUES JÚNIOR, Sérgio; RAMOS, Rubens Eugênio Barreto. Passivo ambiental: revisão teórica de custos na indústria do petróleo. **Revista Produção**, Rio Grande do Norte, v. 14, n. 1, p. 54-63, 2004.

GALLETI, Silvia Regina. Introdução a microscopia eletrônica. **Biológico**, São Paulo, v.65, n.1/2, p.33-35, janeiro/dezembro, 2003.

GENTIL, V.; CARVALHO, L. J. **Corrosão**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2022.

GOI, Silvia Regina; SOUZA, Francisco A. de. Diversidade de microrganismos do solo. **Floresta e Ambiente**, Seropédica – Rio de Janeiro, v.13, n.2, p. 46 - 65, 2006.

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.

GONÇALVES, Leandra R.; WEBSTER, DG; YOUNG, Oran; POLETTE, Marcus; TURRA, Alexander. The Brazilian Blue Amazon under threat: Why has the oil spill

continued for so long?. **Revista Ambiente e Sociedade**, São Paulo, v. 23, p. 1-11, mai/jun. 2020.

HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**, London: Springer-Science+Business Media, B. V., 1995, p. 19-54.

HÖRNKE, Frank. Top 5 - Piores vazamentos de petróleo da história. **DW – Made for Minds**, 2013. Disponível em: <https://www.dw.com/pt-br/top-5-piores-vazamentos-de-petroleo-da-historia/a-16620021>. Acesso em: 05/10/2023.

HPAs – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos – Ficha de Informação Toxicológica. **CETESB**, São Paulo, 2018. Disponível: <https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2018/07/HPAs-Hidrocarbonetos-Policíclicos-Aromáticos.pdf>.

JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti; BENTO, Fátima Menezes; ANTONIOLLI, Zaida Inês; CAMARGO, Flávio Anastácio de Oliveira. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, p.1192-1201. Julho-agosto, 2007.

JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti; BENTO, Fátima Menezes; CAMARGO, Flávio Anastácio de Oliveira. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência e Natura**, UFSM, v. 29, n. 1, p. 7-24, 2007.

JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti; SILVA, Kelly Justin da; BENTO, Fátima Menezes; CAMARGO, Flávio Anastácio de Oliveira. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.2, p.310-317, fev. 2010.

LIMA JÚNIOR, Diniz Ramos de; SILVA, Bruna Nayara Pereira da; VIEIRA, Magda Rosângela Santos; FILHO, Oscar Olimpo de Araújo; FILHO, Severino Leopoldino Urtiga. Estudo comparativo da zona termicamente afetada de juntas soldadas obtidas pelos processos de soldagem fcaw e smaw*. **69º Congresso Anual da ABM – Encontro Nacional de Estudantes de Engenharia Metalúrgica, de Materiais e de Minas**, São Paulo, 2014.

GUEDES JÚNIOR, Gentil de Souza. **Avaliação de reações simultâneas de HDS e HDN empregando leitos de catalisadores em série**. 2021. 99f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

KIM, Sang Hyun; WOO, Heesoo; AN, Seongnam; CHUNG, Jaeshik; LEE, Seunghak; LEE, seungwoo. What determines the efficacy of landfarming for petroleum-contaminated soils: Significance of contaminant characteristics. **Chemosphere**, Coreia do Sul, v. 290, p. 1-8, 2022.

ŁEBKOWSKA, Maria; ZBOROWSKA, Ewa; KARWOWSKA, Ewa; MIASKIEWICZ-PESKA, Ewa; MUSZYNSKI, Adam; TABERNACKA, Agnieszka; NAUMCZYK, Jeremi; JECZALIK, Meciej. Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple

injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland. **Ecological Engineering**, Polônia, v. 37, p. 1895–1900, 2011.

LEITE, Cibele M. B.; BERNARDES, Ricardo S.; OLIVEIRA, Sebastião A. de. Método Walkley-Black y-Black na determinação da matéria orgânica na determinação da matéria orgânica em solos contaminados por chorume em solos contaminados por chorume. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.8, n.1, p.111-115, 2004

LEITE, Maria Beatriz Ayello. Principais Acidentes com Petróleo e Derivados no Brasil. **Ambiente Brasil**, Paraná, 2022. Disponível em: https://ambientes.ambientebrasil.com.br/energia/acidentes_ambientais/principais_acidentes_com_petroleo_e_derivados_no_brasil.html. Acesso em: 05/09/2023.

LEONEL, Lillian Vieira; NASCIMENTO, Eliana Guidetti do; BERTOZZI, Janksyn; VILAS BÔAS, Laurival Antônio; VILAS BÔAS, Gislayne Trindade. Biorremediação do Solo. **Terra e Cultura**, Londrina, n. 51, n. 26. Julho-Dezembro, 2010.

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

LINDE, Thiago de Nuno Mendes Pery de; PINTO, Fernando Neves; MENDES, Hugo Vidaurre; CRAPEZ, Mirian Araujo Carlos. Microorganismos para a sustentabilidade ambiental. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.8, n.3, p.17890-17904. Março, 2022.

LUCHESE, Eduardo Bernardi; FAVERO, Luzia O. B.; ERWIM, Lenzi. **Fundamentos da química do solo: teoria e prática**. Freitas Bastos, 2001.

MANNHEIMER, Walter A.; SCHMIDT, P. F.; VANDER VOORT, G. F.; WILLIAMS, D. B. **Microscopia dos Materiais**: Uma introdução. 1ª edição. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2002, 221p.

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 06/10/2023.

MARIANO, Jacqueline Barboza. **Impactos ambientais do refine de petróleo**. 2001. 289f. Tese (Mestrado em Ciências em Planejamento Energético) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

MARQUES, Ricardo Terra de Melo. **Monitoramento do processo de atenuação natural de um solo contaminado com diesel commercial**. Rio de Janeiro. Disponível em: http://mineralis.cetem.gov.br/bitstream/cetem/534/1/Ricardo_Marques.pdf. Acesso em: 06/09/2023.

MARTINS, S. S. S.; SILVA, M. P.; AZEVEDO, M. O.; SILVA, V. P. Produção de petróleo e impactos ambientais: algumas considerações. **HOLOS**, Rio Grande do Norte, v. 6, p. 54-76, 2015.

MAZZEO, Dânia Elisa Christofoletti *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; MORITA, Dione Mari; MANFREDINI, Sidneide; RIVERA, Irma Nelly Gutierrez. Viabilidade da aplicação do método respirométrico de bartha para determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 71-78. Janeiro-Março/2007.

MELO, Rogério Oliveira; PACHECO, Edson Patto; MENEZES, José de Castro; CANTALICE, José Ramon Barros. Susceptibilidade à compactação e correlação entre as propriedades físicas de um neossolo sob vegetação de caatinga. **Caatinga**, Mossoró, v.21, n.5, p.12-17, dezembro/2008.

MENDES, Debora Pinheiro Guimarães. **Características físico-químicas e microbiológicas e aceitação sensorial de leites fermentados por bactérias produtoras de ácido láctico isoladas de queijo coalho de Pernambuco**. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

MONTAGNOLI, Renato Nallin. **Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis***. 245f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – São Paulo, Março/2011.

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.

MORAES FILHO, M. C.; CORIOLANO, A. C. F. Biorremediação, uma alternativa na utilização em áreas degradadas pela indústria petrolífera. **HOLOS**, Natal, v. 7, p. 133-150, mar/set. 2016.

MORAES, Eduardo Beraldo de. **Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilhas**. 64f. Dissertação de mestrado em Microbiologia Aplicada – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

MOREIRA, Gicelia. Causas e consequências do efeito da corrosão em estruturas offshore de petróleo: estudo de revisão. **Conapesc digital**, 2021. Disponível em:

https://www.editorarealize.com.br/editora/ebooks/conapesc/2021/TRABALHO_EV16_1_MD7_SA100_ID1635_12072021150042.pdf. Acesso em: 23/04/2022.

MOTA, Vanessa Vólaro Caminha; PRANTERA, Monica Teresa. A microbiologia na indústria do petróleo: os problemas com a biocorrosão. **Revista acadêmica saúde & ambiente**, v. 4, n. 1, 2009.

MOURA, Jéssica Souza; SILVA, Mickael David Farias da; MIRANDA, Pedro Paulo Omena Pontes de; FERRO, Thainara Péricles Soares; SILVA, Jaceguai Soares da; SILVA, Givanildo Santos da. Corrosão: colunas de perfuração de poços de petróleo. **Cadernos de Graduação – ciências exatas e tecnológicas**, Maceió, v. 3, n.1, p. 65-74, novembro. 2015.

NACE International. **NACE Standard RP0775-2005** – item n. 21017. Preparation, installation, analysis, and interpretation of corrosion coupons in oilfield operations. Houston: NACE, 2005.

NICOLAU, Paula Bacelar. Microrganismo e ambiente: ar e água, solo e extremos. **Universidade Aberta**, 2016. Disponível em: https://repositorioaberto.uab.pt/bitstream/10400.2/6135/1/UT4_Microrganismos%20e%20Ambiente.pdf. Acesso em: 06/09/2023.

NICOLAU, Paula Bacelar. Microrganismos e crescimento microbiano. **Universidade Aberta**, 2014. Disponível em: https://repositorioaberto.uab.pt/bitstream/10400.2/6137/1/UT2_Microrganismos%20e%20crescimento%20microbiano_PBN.pdf. Acesso em: 28/09/2023.

Nitrogênio: sua fixação biológica está mais perto de você do que imagina. **CropLife**, 2021. Disponível em: [https://croplifebrasil.org/noticias/fixacao-biologica-nitrogenio/#:~:text=O%20nitrogênio%20\(N\)%20é%20um,o%20Nitrogênio%20existente%20no%20ar](https://croplifebrasil.org/noticias/fixacao-biologica-nitrogenio/#:~:text=O%20nitrogênio%20(N)%20é%20um,o%20Nitrogênio%20existente%20no%20ar). Acesso em: 28/09/2023.

NORONHA, Victor Teixeira; SOUZA, Francisco de Assis; ALVES, Ana Cecília; AQUINO, Yasmine Maria Lima de Oliveira; MACHADO, Terezinha Feitosa; PAULA, Amauri Jardim. Análise de adesão e crescimento bacteriano em superfícies-modelo de diferentes topografias. **JOIN - encontro internacional de jovens investigadores - edição Brasil**, 2017. Disponível em: https://editorarealize.com.br/editora/anais/join/2017/TRABALHO_EV081_MD4_SA148_ID1252_11092017225800.pdf. Acesso em: 21/04/2022.

Óleo que atingiu praias do Nordeste em 2019 veio de petroleiro grego, diz PF. **ANDES – Sindicato Nacional dos Docentes das Instituições de Ensino Superior**, Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.andes.org.br/conteudos/noticia/oleo-que-atingiu-praias-do-nordeste-em-2019-veio-de-petroleiro-grego-diz-pf1>. Acesso em: 05/09/2023.

OLIVEIRA, Sabrina Dias de. **Avaliação das técnicas de bioaumento fúngico e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo**. 158f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

OLIVEIRA, Sara H.; LIMA, Maria Alice G. A.; FRANÇA, Francisca P.; VIEIRA, Magda R. S.; SILVA, Pulkra; URTIGA FILHO, Severino L. Control of microbiological corrosion on carbon steel with sodium hypochlorite and biopolymer. **International Journal of Biological Macromolecules**, Recife/PE, v. 88, p. 27–35, 2016.

OSTROSKI, Vanessa Cunha. Avaliação da velocidade de corrosão nos equipamentos portuários. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental – RG&AS**, Florianópolis, v. 8, n.1, p. 848-880, jan/mar. 2019.

PANNONI, Fabio Domingos. **Aços estruturais**. Artigo técnico, 2001. Disponível em: <http://www.acominas.com.br/upload/produtos/perfis/caracteristicatecnica.pdf>. Acesso em: 06/09/2023.

PARAÍBA, Lourival Costa; SAITO, Maria Lúcia. Distribuição ambiental de poluentes orgânicos encontrados em lodos de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.9, p.853-860. Setembro, 2005.

PARAPOULI, Maria; VASILEIADIS, Anastasios; AFENDRA, Amalia-Sofia; HATZILOUKAS, Efstatios. Saccharomyces cerevisiae and its industrials applications. **AIMS Microbiology**, Grécia, v. 6, n. 1, p. 1-31. Fevereiro, 2020.

Principais acidentes internacionais. **CETESB**, São Paulo, 2013. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/emergencias-quimicas/wp-content/uploads/sites/22/2013/12/Principais-acidentes-internacionais.pdf>. Acesso em 05/09/2023.

Qualidade do solo. **CETESB**, São Paulo, 2013. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/solo/propriedades/#:~:text=O%20solo%20é%20constituído%20por,da%20decomposição%20vegetal%20e%20animal>. Acesso em: 05/09/2023.

Refinaria Abreu e Lima é multada por vazamento de óleo. **CBN Recife**. 2019. Disponível em: <https://www.cbnrecife.com/artigo/refinaria-abreu-e-lima-e-multada-por-vazamento-de-oleo>. Acesso em: 28/09/2023.

Refinaria de Abreu e Lima. **Petrobrás**. Disponível em: <https://petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/principais-operacoes/refinarias/refinaria-abreu-e-lima.htm>. Acesso em: 23/09/2023.

REGINATTO, Cleomar; THOMÉ, Antônio; COLLA, Luciane Maria; MENEGHETTI, Liliane Ribeiro R.; CECCHIN, Iziquiel. 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.

REGINATTO, Cleomar; COLLA, Luciane Maria; THOMÉ, Antonio. Biorremediação de resíduos oleosos em solos. **Revista CIATEC**, Passo Fundo, v. 3, n. 2, p. 19-31, 2011.

REINERT, Dalvan José; ALBUQUERQUE, Jackson Adriano; REICHERT, José Miguel; AITA, Celso; ANDRADA, Martín María Cubilla. Limites críticos de densidade do solo para o crescimento de raízes de plantas de cobertura em argissolo vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1805-1816, 2008.

ROCHA, Rafael Luiz Frinhani; REIS, Régis Josué de Andrade; OLIVARES, Fábio Lopes. Densidade populacional de microrganismos associados ao solo e a palha de cana-de-açúcar. **IX Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica**. Campo dos Goytacazes, 2017.

SANCHEZ MOORE, Claudia Cristina; MATSUURA, Marília I. S. F.; KULAY, Luiz. Avaliação do desempenho ambiental do processamento de óleo diesel que atende ao mercado brasileiro de combustíveis. **Embrapa**, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1064131/avaliacao-do-desempenho-ambiental-doprocessamento-de-oleo-diesel-que-atende-ao-mercado-brasileiro-de-combustiveis>. Acesso em: 21/04/2022.

SANTANA, Jeferson Santos; CAMPOS, Henrique Torres de; OLIVEIRA, Expedito José de Queiroz; CARDOSO, Elisangela Silvana. Avaliação da viabilidade de aplicação da técnica de atenuação natural monitorada em solos contaminados por óleo diesel. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, Florianópolis, v. 9, n. 3, p. 150-172, jul/set. 2020.

SANTOS, Lilian Andriwa dos; MION, Ligiani; MAROTZKI, Marcieli; PARIZOTTO, Luana; RODRIGUES, Laura Beatriz; NASCIMENTO, Vladimir Pinheiro do; SANTOS, Luciana Ruschel dos. Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouros de frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 223-229, março 2015.

SERAFIM, Josela Guisoni. **Biodegradação dos óleos da região de Anhembi e sua relação com as fácies sedimentares**. 82f. Dissertação (Mestrado em Geologia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SILVA, Douglas felipe de lima. **Análise genômica de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos do petróleo e seu potencial de atuação em hidrocarbonetos prioritários**. 106f. Dissertação (Mestrado em Bioinformática) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2022.

SILVA, Larissa Oliveira da. **Biorremediação em solo contaminado com óleo Diesel S-10 e avaliação da corrosividade do solo por meio das taxas de corrosão do aço-carbono A36**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

SILVA, Maicon Gonçalves. **Biorremediação de solo contaminado por petróleo por diferentes técnicas de bioestimulação**. 2007. 115f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2007.

SILVA, Marcos V. F.; PEREIRA, Marinalda C.; CODARO, Eduardo N.; ACCIARI, Heloisa A. Corrosão do aço carbono: uma abordagem do cotidiano no ensino de química. **Química Nova**, Guaratinguetá, v. 38, n. 2, p. 293-296, ago/set. 2014.

SILVA, Nicholas Vinicius. **Estudo da fermentação lática de proteínas do pescado visando a obtenção de surimi anchovado**. 187f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados/MS, 2013

SILVA, Pulkra; OLIVEIRA, Sara H.; VINHAS, Glória M.; CARVALHO, Ladimir J.; BARAÚNA, Osmar S.; URTIGA FILHO, Severino L.; LIMA, Maria Alice G. A. 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**, Recife/PE, v. 160, 2021.

SILVA, Suzyane Porfírio da. **Aplicação de bioestímulo e bioaumento na biodegradação de paclobutrazol em solo não saturado e sem histórico**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

SILVA, Wender Messiatto da. **Utilização de microrganismos na biorremediação de solo contaminado por derivados de petróleo**. 128f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil – Recursos Hídricos e Tecnologias Ambientais) – Faculdade de Engenharia – UNESP - Campus de Ilha Solteira, Ilha Solteira, 2018.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; Mendonça, m. m.; barcelos, r. p.; baroni, s. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.2, p.341-350, abr./jun., 2011.

SOUZA, Cristiane Daliassi Ramos de; CHAAR, Jamal da Silva; SOUZA, Rubem Cesar Rodrigues; JEFFREYS, Manoel Feitosa; SOUZA, Katiúscia dos Santos de; COSTA, Everton José Cardoso; SANTOS, Josana Cória dos. Caracterização físico-química das misturas binárias de biodiesel e diesel comercializados no Amazonas. **Acta Amazonica**, Amazonas, v. 39, n. 2, p. 383-388, 2009.

SOUZA, Kamilla Costa; SANTOS JÚNIOR, José Edilson dos; SANTOS, Vivianni Marques Leite dos. Estudo prospectivo sobre o uso da técnica de biorremediação para a recuperação de solos contaminados por derivados do petróleo. **Cadernos de Prospecção** – Salvador, v. 13, n. 3, p. 795-804, junho, 2020.

KIST STEFFEN, Gerusa Pauli; BEMFICA STEFFEN, Ricardo; ANTONIOLLI, Zaida Inês. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **TECNO-LÓGICA**, Santa Cruz do Sul, v. 15, n. 1, p. 15-21, janeiro/junho, 2011.

TEIXEIRA, Pedro de Sá. **Controle e monitoramento de corrosão microbiológica na indústria do petróleo: uma revisão da literatura**. 63f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia do Petróleo) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Santos, 2021.

TEIXEIRA, Rafael Marques; BARBOSA, Juliana da Silva Pires; LÓPEZ, Maria Soledad; FERREIRA-SILVA, Maria Augusta Gonçalves; COUTINHO, Ricardo; VILLAÇA, Roberto Campos. Bioinvasão marinha: os bivalves exóticos de substrato consolidado e suas interações com a comunidade receptora. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 2, p. 381-402, Junho/2010.

Todo petróleo é igual? entenda as principais diferenças. **Além da superfície – Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás**, 2019. Disponível em: <https://www.alemdasuperficie.org/setor/petroleo/todo-petroleo-e-igual-entenda-as-principais-diferencias/#:~:text=Quanto%20maior%20o%20grau%20de,grau%20API%20inferior%20a%2022>. Acesso em: 06/09/2023.

TRENTIN, Adan William da Silva; THOMÉ, Antônio; BRAUN, Adeli Beatriz; BALESTRIN, Deisi. Biorremediação in situ de biodiesel através da atenuação natural e bioventilação. **Congresso de Engenharia Ambiental do Sul do Brasil**, Lages – Santa Catarina, 2017.

Vazamento de óleo da Refinaria Abreu e Lima atinge córrego. **G1**, Recife, 27/08/2019. Disponível em: <https://g1.globo.com/pe/pernambuco/noticia/2019/08/27/vazamento-e-registrado-na-refinaria-abreu-e-lima.ghtml>. Acesso em: 23/04/2022.

Vazamento também na refinaria Abreu e Lima. **Epbr**. 2019. Disponível em: <https://epbr.com.br/vazamento-tambem-na-refinaria-abreu-e-lima/>. Acesso em: 28/09/2023.

VIANNA, Anderson Martins. Poluição ambiental, um problema de urbanização e crescimento desordenado das cidades. **Revista SUSTINERE**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 22-42, jan-jun, 2015.

VIEIRA, Magda Rosângela Santos. **Estudo dos processos de corrosão e biocorrosão causados por fluidos da indústria de petróleo**. 152f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

WARDLE, David A.; HUNGRIA, Mariangela. A Biomassa microbiana do solo e sua importância nos ecossistemas terrestres. In: ARAÚJO, Ricardo S.; HUNGRIA, Mariangela. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília, EMBRAPA-SPI, 1994. Cap. 6, p. 195-216.

WETLER-TONINI, Rita Maria Costa; REZENDE, Carlos Eduardo de; GRATIVOL, Adriana Daudt. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p. 1010-1020, 2010.

APÊNDICE A – RESULTADOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO**Figura 1.** Resultados da curva de calibração.

Ponto	Condutividade	CO₂ (μmol)
1	13,971	0
2	13,204	100
3	12,388	200
4	11,511	300
5	10,784	400
6	10,021	500
7	9,444	600
8	8,717	700
9	8,023	800
10	7,426	900
11	6,854	1000

Fonte: O autor (2023)