



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL**

**FERNANDA COSTA DA SILVA MACIEL**

**ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE  
PETRÓLEO POR MICROORGANISMOS NATIVOS DE UMA ÁREA DE  
EXPLORAÇÃO “ONSHORE”, POR INTERMÉDIO DE ENSAIOS DE  
COLUNA**

Salvador

2020

**FERNANDA COSTA DA SILVA MACIEL**

**ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE  
PETRÓLEO POR MICRORGANISMOS NATIVOS DE UMA ÁREA DE  
EXPLORAÇÃO “ONSHORE”, POR INTERMÉDIO DE ENSAIOS DE  
COLUNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Fernando de Souza Queiroz

Coorientador: Prof. Dr. Sandro Lemos Machado

Agência Financiadora: CAPES

Salvador

2020

Maciel, Fernanda Costa da Silva.

Análise da degradação de hidrocarbonetos de petróleo por microrganismos nativos de uma área de exploração “onshore”, por intermédio de ensaios de coluna / Fernanda Costa da Silva. – Salvador, 2020.  
129 f. : il. color.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando de Souza Queiroz;

Coorientador: Prof. Dr. Sandro Lemos Machado.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Escola Politécnica, 2020.

1. Biorremediação. 2. Solo - Contaminação. 3. Petróleo. 4. Hidrocarbonetos. I. Queiroz, Antonio Fernando de Souza. II. Machado, Sandro Lemos. III. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDD.: 628.5

**FERNANDA COSTA DA SILVA MACIEL**

**ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO POR  
MICRORGANISMOS NATIVOS DE UMA ÁREA DE EXPLORAÇÃO “ONSHORE”,  
POR INTERMÉDIO DE ENSAIOS DE COLUNA**


Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil, Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 8 de maio de 2020.

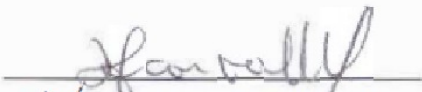
**BANCA EXAMINADORA:**



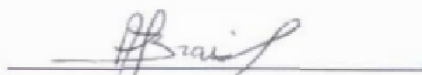
Prof. Dr. Antônio Fernando de Souza Queiroz - Orientador  
Doutor em Geologia/Geoquímica do Meio Ambiente pela Universidade  
Louis Pasteur de Estrasburgo  
PPEC - UFBA



Prof. Dr. Sandro Lemos Machado - Coorientador  
Doutor em Geotecnia pela USP  
PPEC - UFBA



Prof. Dr. Miriam de Fátima Carvalho  
Doutora em Geotecnia pela USP  
PPEC-UFBA



Prof. Dr. André Luís Brasil Cavalcante  
Doutor em Geotecnia pela UnB  
PPG - UnB

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho não poderia ser realizado sem a contribuição de uma equipe especial. Gostaria de agradecer a todos que me apoiaram, estimularam e acreditaram na minha capacidade.

Ao meu orientador Antônio Fernando pela paciência e confiança na realização deste trabalho. Ao professor Sandro Machado pela motivação e todo conhecimento passado, além das histórias engraçadas compartilhadas.

A toda equipe do GEOAMB, em especial aos técnicos que se tornaram amigos, Mano e Ricardo, pelo companheirismo e apoio. Aos amigos Camilla, Murilo, Larissa, Bruno, Maiana, Nicole, por fazerem dessa etapa harmoniosa e mais fácil.

A toda equipe do LEPETRO, por me receber como um membro dos programas do laboratório, em especial às técnicas: Gisele, Carol, Lili, Regina e Juci, pela atenção concebida. À Gisele por todo apoio, carinho e dedicação que tornaram possível a realização dos ensaios no laboratório de microbiologia. À Lili por todos os ensinamentos no laboratório de orgânicos. À coordenadora Sara pela atenção e cuidado. À professora Danúzia pelo apoio e ensinamentos nos ensaios microbiológicos. Aos amigos que ganhei, Camila, Jana, Milena, Milton, João, pelas dicas e ajuda nas realizações dos ensaios.

À minha mãe, Ana, por me apoiar em todas as etapas da minha vida. Ao meu namorado, Ícaro, pelo companheirismo, amizade e compreensão.

A todos vocês um muito obrigada!

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado”

Roberto Shinyashiki

## RESUMO

A complexidade envolvida na análise de fluxo de substâncias em substratos granulares é atribuída, além da complexidade inerente a cada fase envolvida, aos diversos fenômenos desenvolvidos pela interação do fluido percolante com as partículas do solo. A obtenção de parâmetros de transporte é essencial para prever o avanço da contaminação e auxiliar nas medidas de gerenciamento das áreas contaminadas. Na presente pesquisa, resultados de ensaios de coluna são utilizados para análise do transporte da fase dissolvida de um fluido, água de produção (AP), com alto teor de hidrocarbonetos de petróleo em um solo areno-argiloso, denominado solo várzea, proveniente das imediações de uma área de exploração de petróleo *onshore*. Dentre os processos estabelecidos durante a percolação do fluido em estudo, detectou-se reduções na permeabilidade, como consequência da ocorrência do fenômeno de dispersão das argilas. Os resultados dos ensaios de coluna evidenciaram decaimentos nas concentrações de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) dos fluidos coletados, o que exigiu na modelagem das curvas de chegada a utilização de um termo de decaimento não linear ( $\mu$ ), o qual foi associado a ocorrência de atividade degradadora de hidrocarbonetos por microrganismos nativos do solo. Para a certificação da existência de microbiota degradadora de HTP, um conjunto de ensaios microbiológicos, com aplicação de técnicas laboratoriais tradicionais e análises genéticas, foram empregados em amostras de solo retiradas das colunas em diferentes tempos. Os microrganismos cultivados através de técnicas tradicionais (cultivo em placas com meio de cultura) foram isolados e submetidos a testes de oxidação com indicador DCPIP para seleção de fungos e bactérias com potencial de degradar hidrocarbonetos. Os espécimes selecionados tiveram seus genomas sequenciados (Sequenciamento Sanger) podendo ser identificados. Detectaram-se espécies de bactérias (pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus*) e fungos (gêneros *Malassezia* e *Talaromyces*) ainda não associados na literatura a atividade degradadora de HTP. Análises metagenômicas realizadas em amostras de solo revelaram que as maiores porcentagens da comunidade bacteriana do solo estavam associadas ao consumo de HTP, conforme dados da literatura. Todos os ensaios microbiológicos, realizados após os ensaios de coluna, apontaram a predominância de bactérias com relação aos fungos. A confirmação da existência de microrganismos nativos com potencial de degradação de hidrocarbonetos nas amostras do solo várzeas analisadas, abre a possibilidade de desenvolvimento de técnicas de remediação biológicas *in situ* mais adequadas e seguras para a área. Além disso, a incorporação destes organismos a solos de baixa permeabilidade pode possibilitar o sistema de barreiras de contenção mineral/biológica, possibilitando além da retenção do contaminante, a sua degradação.

Palavras-chave: Biorremediação 1. Ensaio de coluna 2. Hidrocarbonetos 3. Decaimento microbiológico 4.

## ABSTRACT

The complexity involved in the analysis of the flow of substances in granular substrates is attributed, in addition to the complexity inherent to each phase involved, to the various phenomena developed by the interaction of the percolating fluid with the soil particles. Obtaining transport parameters is essential to predict the progress of contamination and to assist in the management of contaminated areas. In this research, results of column tests are used to analyze the transport of the dissolved phase of a fluid, production water (AP), with a high content of petroleum hydrocarbons in a sandy-clay soil, called *várzea* soil, coming from the surroundings, of an onshore oil exploration area. Among the processes established during the percolation of the fluid under study, reductions in permeability were detected, as a consequence of the occurrence of the clay dispersion phenomenon. The results of the column tests showed decays in the concentrations of total petroleum hydrocarbons (TPH) of the collected fluids, which required in the modeling of the arrival curves the use of a non-linear decay term ( $\mu$ ), which was associated with the occurrence degrading activity of hydrocarbons by microorganisms native to the soil. To certify the existence of TPH degrading microbiota, a set of microbiological tests, with the application of traditional laboratory techniques and genetic analyzes, were used in soil samples taken from the columns at different times. Microorganisms cultured using traditional techniques (plate culture with culture medium) were isolated and subjected to oxidation tests with the DCPIP indicator for the selection of fungi and bacteria with the potential to degrade hydrocarbons. The selected specimens had their genomes sequenced (Sanger Sequencing) and could be identified. Species of bacteria (belonging to the genera *Bacillus* and *Lysinibacillus*) and fungi (genera *Malassezia* and *Talaromyces*) were detected, not yet associated in the literature with the degrading activity of TPH. Metagenomic analyzes performed on soil samples revealed that the highest percentages of the soil bacterial community were associated with HTP consumption, according to literature data. All microbiological tests, performed after column tests, pointed out the predominance of bacteria in relation to fungi. The confirmation of the existence of native microorganisms with potential for hydrocarbon degradation in the analyzed *várzea* soil samples, opens the possibility of developing more appropriate and safer in situ biological remediation techniques for the area. In addition, the incorporation of these organisms to low permeability soils can enable the system of mineral / biological containment barriers, in addition to the retention of the contaminant, its degradation.

Keywords: Bioremediation 1. Column tests 2. Hydrocarbons 3. Microbiological decay 4.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Curva de variação do coeficiente de decaimento.....	27
Figura 2. Etapas da Metodologia.....	28
Figura 3. Área de coleta do solo no município de Macau-RN.....	29
Figura 4. Local de coleta do solo recolhido para a presente pesquisa.....	30
Figura 5. Realização de ensaio de FRX em amostra de solo várzea.....	33
Figura 6. Foto exemplificando fase de agitação da amostra de solo para análise de fósforo.....	34
Figura 7. Medição de pH do solo de várzea, realizada no LEPETRO/IGEO/UFBA...36	
Figura 8. Visualização de parte das etapas para determinação da concentração de HTP do solo de várzea coletado para este trabalho.....	37
Figura 9. Parte do processo de cultivo e contagem de bactérias do solo várzea utilizado neste trabalho.....	39
Figura 10. Placas com cultivo de fungos obtidos na etapa de caracterização do solo várzea.....	41
Figura 11. Visualização de parte do processo de armazenamento da água de produção sintética utilizada neste trabalho.....	42
Figura 12. Equipamento viscosímetro utilizado para análises de viscosidade das amostras de água de produção obtidas no GEOAMB/UFBA.....	44
Figura 13. Equipamento utilizado para aferição da tensão superficial da água de produção analisada no presente trabalho.....	45
Figura 14. Etapas da extração de HTP da água de produção utilizada na presente pesquisa.....	46
Figura 15. Visualização de parte do processo de medição de pH da água de produção analisada neste trabalho, com utilização de equipamento empregado com essa finalidade.....	47
Figura 16. Foto exemplificando parte dos procedimentos adotados para o cultivo de bactérias da água de produção ensaiada.....	48
Figura 17. Visualização de parte do processo de contagem de bactérias da água de produção ensaiada.....	49

Figura 18. Fungos cultivados em placas, obtidos da água de produção, durante a etapa de caracterização.....	50
Figura 19. Estrutura da montagem do ensaio de coluna utilizado neste trabalho para percolação de fluidos em colunas de solo.....	51
Figura 20. Visualização da torre do equipamento do ensaio de coluna utilizado neste trabalho.....	52
Figura 21. Fotos apresentando os reservatórios dos ensaios de coluna empregados na fase inicial deste trabalho.....	53
Figura 22. Visualização das colunas metálicas para montagem do ensaio de coluna realizado neste trabalho.....	54
Figura 23. Visualização dos cabeçotes, superior e inferior, para acoplamento na coluna metálica utilizada nos ensaios de coluna realizados neste trabalho.....	55
Figura 24. Visualização de parte das etapas de compactação dos corpos de prova realizados para os ensaios de coluna.....	57
Figura 25. Visualização do processo de aplicação de bentonita para vedação do espaço entre topo do CP e cabeçote superior das colunas.....	58
Figura 26. Visualização do encaixe do cabeçote superior e do anel biselado com entrada para a mangueira dos reservatórios.....	58
Figura 27. Visualização da montagem inicial dos ensaios de coluna dos experimentos deste trabalho.....	59
Figura 28. Visualização da tampa metálica encaixada na coluna de percolação de fluido utilizada neste trabalho.....	60
Figura 29. Visualização de detalhes do reservatório dos fluidos utilizados nos ensaios de coluna deste trabalho.....	61
Figura 30. Visualização da montagem final do experimento dos ensaios de coluna.....	62
Figura 31. Visualização de parte da coleta do fluido percolado das colunas, armazenados em vasos de 250mL.....	64
Figura 32. Visualização de parte do processo de obtenção de emulsão formada durante extração de fase oleosa de fluido percolado nas colunas de solo várzea....	65
Figura 33. Visualização de emulsões formadas para diferentes corpos de prova durante extração líquido/líquido dos fluidos de percolação.....	66

Figura 34. Visualização de frascos com fluido percolado que evidenciam a mudança de coloração no fluido percolado em coluna de solo várzea.....	67
Figura 35. Visualização de fluido percolado pelo CP3, onde nota-se a presença de partículas depositadas no fundo do frasco de armazenamento.....	68
Figura 36. Visualização de parte do procedimento de coleta de amostras das colunas de solo, para análises microbiológicas.....	71
Figura 37. Visualização dos métodos de armazenamento das amostras de solo para análises microbiológicas.....	72
Figura 38. Exemplificação de bactérias isoladas de amostra do CP2 no tempo T0. .	74
Figura 39. Exemplificação de fungos isolados de amostra retirada do CP2 no tempo T0.....	74
Figura 40. Visualização de soluções microbianas colocadas em mesa agitadora.....	75
Figura 41. Visualização das diferentes colorações das amostras na primeira etapa do teste de oxidação.....	77
Figura 42. Visualização das diferentes colorações das amostras na segunda fase do teste de oxidação.....	77
Figura 43. Visualização de parte do processo de preservação dos microrganismos	79
Figura 44. Curva granulométrica obtida para o solo em estudo.....	82
Figura 45. Representação gráfica da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de bactérias do solo várzea.....	89
Figura 46. Gráfico correspondente à contagem de UFC de bactérias da água de produção ensaiada neste trabalho.....	95
Figura 47. Gráfico correspondente à contagem de UFC de fungos da água de produção ensaiada neste trabalho.....	95
Figura 48. Gráfico dos coeficientes de permeabilidade obtidos nos ensaios de coluna.....	98
Figura 49. Gráfico das curvas de chegada $C/C_0$ x Tempo de ensaio, obtidas neste trabalho.....	100
Figura 50. Gráfico das curvas de chegada $C/C_0$ x Volume de poros percolados, obtidas neste trabalho.....	100

Figura 51. Gráfico das Curvas de chegada $C/C_0$ x Tempo, dos ensaios realizados por Lima (2018).....	101
Figura 52. Representação gráfica da contagem de UFC de bactérias e fungos obtidas para o CP1.....	104
Figura 53. Representação gráfica da contagem de UFC de bactérias e fungos obtidas para o CP2.....	105
Figura 54. Representação gráfica da contagem de UFC de bactérias e fungos obtidas para o CP3.....	105
Figura 55. Representação gráfica da contagem de UFC de bactérias e fungos obtidas para o CP4.....	106

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições ambientais que afetam o desenvolvimento de microrganismos no solo.....	17
Tabela 2. Dados de compactação dos corpos de prova de solo várzea.....	56
Tabela 3. Análises microbiológicas para cada tipo de amostra de solo.....	70
Tabela 4. Resumo dos resultados dos ensaios de caracterização geotécnica do solo várzea.....	83
Tabela 5. Resultados do ensaio de compactação do solo várzea.....	84
Tabela 6. Parâmetros de controle de compactação.....	85
Tabela 7. Concentração de elementos químicos do solo várzea, obtidos por ensaio de FRX.....	86
Tabela 8. Composição mineralógica do solo várzea obtida por DRX.....	87
Tabela 9. Resultados dos ensaios de caracterização física e química do solo várzea estudado neste trabalho.....	87
Tabela 10. Concentração de HTPs do solo várzea utilizado neste trabalho.....	88
Tabela 11. Viscosidade da água de produção obtida para diferentes temperaturas.	91
Tabela 12. Massa específica da água de produção ensaiada neste trabalho.....	91
Tabela 13. Tensão superficial do fluido ensaiado neste trabalho para diferentes temperaturas.....	92
Tabela 14. Parâmetros das águas de produção.....	92
Tabela 15. Concentração de HTP dos fluidos ensaiados neste trabalho.....	94
Tabela 16. Parâmetros hidráulicos medidos durante a aplicação dos ensaios de coluna.....	96
Tabela 17. Parâmetros utilizados na modelagem das curvas de chegada.....	99
Tabela 18. Fungos identificados através de análises metagenômicas nas amostras de solo.....	109
Tabela 19. Bactérias identificadas através de análises metagenômicas de amostras de solo.....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS
ACBR	AÇÕES CORRETIVAS COM BASE NO RISCO
AP	ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO
ASTDR	AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY
ASTM	AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS STANDARDS
BTEX	BENZENO, TOLUENO, ETIL-BENZENO E OS XILENOS
CE	CONDUTIVIDADE ELÉTRICA
CETESB	COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO
CP	CORPO DE PROVA
DCPIP	2,6-DICHLOROPHENOLINDOPHENOL
DRX	DIFRATOMETRIA DE RAIOS X
EMBRAPA	EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
EPA	ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY
FRX	FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X
GEOAMB	LABORATÓRIO DE GEOTECNIA AMBIENTAL (UFBA)
LEDMA	LABORATÓRIO DE ENSAIOS EM DURABILIDADE DOS MATERIAIS (UFBA)
LEPETRO	EXCELÊNCIA EM GEOQUÍMICA: PETRÓLEO, ENERGIA E MEIO AMBIENTE (UFBA)
HPA	HIDROCARBONETO POLIAROMÁTICO
HTP	HIDROCARBONETOS TOTAIS DE PETRÓLEO
TOG	TEOR DE ÓLEOS E GRAXAS
SUCS	SISTEMA UNIFICADO DE CLASSIFICAÇÃO DOS SOLOS
QIIMI	QUANTITATIVE INSIGHTS INTO MICROBIAL ECOLOGY
UFC	UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

## LISTA DE SÍMBOLOS

A	ÁREA TRANSVERSAL DO CORPO DE PROVA
$\alpha$	COEFICIENTE DE DISPERSIVIDADE LONGITUDINAL
$\beta$	FATOR DE INCLINAÇÃO
C	CONCENTRAÇÃO FINAL
$C_0$	CONCENTRAÇÃO INICIAL
$D_h$	COEFICIENTE DE DISPERSÃO HIDRODINÂMICA
$G_c$	GRAU DE COMPACTAÇÃO
i	GRADIENTE HIDRÁULICO
$I_a$	ÍNDICE DE ATIVIDADE
IP	ÍNDICE DE PLASTICIDADE
H	CARGA HIDRÁULICA
k	COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE
$k_i$	COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE INICIAL
$k_{méd}$	COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE MÉDIA
$k_f$	COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE FINAL
L	COMPRIMENTO DA COLUNA DE SOLO
$\mu$	TERMO DE DECAIMENTO MICROBIOLÓGICO
$\mu_{máx}$	TERMO DE DECAIMENTO MICROBIOLÓGICO MÁXIMO
n	POROSIDADE
$P_L$	NÚMERO DE PECLET
$\rho$	MASSA ESPECÍFICA DO SOLO
$\rho_{dmáx}$	MASSA ESPECÍFICA SECA MÁXIMA DO SOLO
Q	VAZÃO
$V_s$	VELOCIDADE DE FLUXO
$V_{sméd}$	VELOCIDADE MÉDIA DE FLUXO
$V_d$	VELOCIDADE DE DESCARGA

$V_p$	VOLUME DE POROS PERCOLADOS
$R_d$	FATOR DE RETARDO
$R^2$	FATOR DE AJUSTE
$T$	TEMPO DE COLETA DE AMOSTRAS DE SOLO
$t$	TEMPO TOTAL DE ENSAIO DE COLUNA
$t_1$	TEMPO O QUAL O MÓDULO DE $\mu$ É IGUAL A 0,5 DE $\mu_{m\acute{a}x}$
$W$	UMIDADE
$W_L$	LIMITE DE LIQUIDEZ
$W_{otm}$	UMIDADE ÓTIMA
$W_P$	LIMITE DE PLASTICIDADE
$\gamma$	PESO ESPECÍFICO
$\gamma_{dmax}$	PESO ESPECÍFICO SECO MÁXIMO



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 JUSTIFICATIVA.....	3
1.2 OBJETIVOS.....	5
1.2.1 Objetivo Geral.....	5
1.2.2 Objetivos Específicos.....	6
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>7</b>
2.1 SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO.....	7
2.2 ÁGUA DE PRODUÇÃO.....	9
2.3 BIORREMEDIAÇÃO EM SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO.....	11
2.3.1 Fatores que influenciam na Biodegradação.....	15
2.4 DISPERSÃO DE ARGILA NO SOLO.....	19
2.5 ENSAIOS DE COLUNA.....	21
2.5.1 Modelagem da curva de chegada.....	23
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
3.1 SOLO.....	29
3.1.1 Caracterização Geotécnica do Solo.....	31
3.1.2 Ensaio de compactação.....	31
3.1.3 Caracterização química e mineralógica dos solos.....	31
3.1.4 Caracterização Físico-Química do Solo.....	34
3.1.5 Análise Microbiológica.....	38

3.2 FLUIDO UTILIZADO.....	41
3.2.1 Caracterização da Água Produzida.....	42
3.3 ENSAIOS DE COLUNA.....	50
3.3.1 Constituintes do Equipamento.....	50
3.3.2 Compactação dos Corpos de Prova.....	55
3.3.3 Montagem do experimento.....	57
3.3.4 Execução das análises dos ensaios de coluna.....	62
3.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS RETIRADAS DAS COLUNAS DE SOLO.....	72
3.4.1 Cultivo, contagem e isolamento dos microrganismos.....	72
3.4.2 Testes de oxidação.....	76
3.4.3 Preservação dos Microrganismos.....	78
3.4.4 Análises genéticas.....	79
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>82</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO.....	82
4.1.1 Caracterização Geotécnica.....	82
4.1.2 Ensaio de Compactação.....	84
4.1.3 Caracterização Mineralógica.....	86
4.1.4 Caracterização Físico-Química do Solo.....	87
4.1.5 Concentração de HTPs.....	88
4.1.6 Cultivo e Contagem de Microrganismos.....	88
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO FLUIDO.....	90
4.2.1 Viscosidade.....	90

4.2.2 Massa Específica.....	91
4.2.3 Tensão Superficial.....	91
4.2.4 Condutividade Elétrica, pH e Salinidade.....	92
4.2.5 Concentração de HTPs.....	93
4.2.6 Cultivo e Contagem de Microrganismos.....	94
4.3 ENSAIOS DE COLUNA.....	96
4.3.1 Curvas de chegada.....	98
4.3.2 Contagem microbiológica.....	104
4.3.3 Análises genéticas.....	108
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>115</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>117</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>118</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A possibilidade de esgotamento dos recursos naturais, diante da intensificação das atividades industriais, tornou necessárias reformulações nas legislações ambientais existentes, como a Lei da Política Nacional do Meio Ambiente, além da criação de resoluções mais rigorosas por órgãos de monitoramento ambiental, como o CONAMA. Essas modificações intensificaram o controle dos impactos gerados, por cada atividade industrial, ao meio ambiente e à saúde humana (MACHADO et al, 2013).

Dentre a diversidade de ramos industriais existentes, o petrolífero se destaca em decorrência da importância de seus produtos, petróleo e derivados, para o desenvolvimento de cadeias produtivas industriais e de seu reconhecimento como fonte de energia fundamental para a sustentação de diversas atividades consideradas essenciais pelo ser humano. Além dos destaques atribuídos aos seus benefícios, a indústria petrolífera, durante as variadas etapas estabelecidas desde a exploração até a comercialização de seus produtos, ocasiona vazamentos de fluidos, o que, aliado à complexa constituição dos mesmos, expõe esse ramo industrial como um dos grandes vilões da contaminação de compartimentos, como o solo e a água (CORSEUIL e MARINS, 1997).

O comportamento desenvolvido por uma substância contaminante, ao entrar em contato com o solo, é influenciado por diversos fatores, como a constituição do solo e do poluente e as interações estabelecidas pelos mesmos, aspectos que dificultam a análise dos impactos da contaminação de um substrato poroso. A migração de substâncias ricas em hidrocarbonetos, os quais são os principais constituintes do petróleo e seus derivados, pelo solo e a possibilidade de alcance das águas subterrâneas é agravada pela complexidade desses compostos orgânicos, envolvendo propriedades como a volatilidade e solubilidade em água, as quais dependem da estrutura molecular de cada constituinte (AZAMBUJA et al., 2000; ZHANG et al., 2006; EKINS et al., 2007).

Para uma melhor interpretação do transporte de contaminantes em solos, desenvolveram-se os ensaios de coluna, os quais permitem, sob condições controladas de laboratório, a análise do avanço de fluidos em corpos de prova de solo, proporcionando a obtenção de parâmetros que descrevem os fenômenos desenvolvidos durante a migração da substância em meios porosos (SHACKELFORD, 1995).

Ao ser constatado o potencial de contaminação de outros meios, como as águas subterrâneas, e estando o contaminante presente no solo em concentrações consideradas nocivas à saúde humana, torna-se necessário a aplicação de métodos de restauração da área contaminada (AZAMBUJA et al., 2000). Dentre as técnicas existentes, destaca-se a biorremediação, na qual a degradação do contaminante é propiciada pelo aproveitamento, ou intensificação, das atividades microbiológicas do sítio de contaminação. Esse método de tratamento apresenta-se como tema relevante e alvo de pesquisas que buscam analisar as características das áreas impactadas e detectar os microrganismos envolvidos nas atividades degradadoras de determinado contaminante, contribuindo com o aperfeiçoamento da eficácia das técnicas de biorremediação existentes ou com a criação de novas tecnologias (VIDALI, 2001; VARJANI e UPASANI, 2017).

O êxito na aplicação da biorremediação depende de diversos fatores, os quais estão associados à composição química do contaminante, assim como às condições físico-químicas e microbiológicas do sítio de contaminação. O emprego dessa técnica exige uma diversidade de ensaios que devem ser realizados para a verificação da existência, na área contaminada, de condições ambientais propícias ao desenvolvimento microbiológico, além da necessidade de avaliar as modificações ambientais cabíveis que permitam a intensificação da atividade biodegradadora. Assim, cada caso de contaminação possui diferentes configurações possíveis de aplicação de diferentes técnicas de remediação (BALBA et al., 1998; VIDALI, 2001).

Na presente pesquisa foram obtidos parâmetros de transporte para a fase dissolvida de uma água de produção sintética, em um solo proveniente de uma área de exploração de petróleo *onshore* (solo várzea), através da aplicação de ensaios de

coluna. As curvas de chegadas geradas para cada coluna de solo ensaiada apresentaram decaimentos nas concentrações de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), comportamento também evidenciado em ensaios realizadas no solo várzea por Lima (2018). A análise dos parâmetros obtidos na modelagem de cada curva permitiram a verificação de atenuação na migração do contaminante por organismos degradadores de hidrocarbonetos. Os resultados provenientes dos ensaios de coluna, aliados a técnicas de análises microbiológicas, evidenciam que a microbiota detectada nas amostras de solo várzea, retiradas das colunas, são responsáveis pelo consumo de hidrocarbonetos presentes na água de produção, estando associadas aos decaimentos exibidos nas curvas de chegada.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

A investigação de uma área contaminada envolve análises da concentração e da extensão do contaminante no subsolo, além do estudo das interações estabelecidas pela substância ao entrar em contato com o material granular, dinâmicas que são governadas pelas características dos materiais envolvidos.

A complexidade inerente às análises de solos contaminados por substâncias ricas em hidrocarbonetos se dá pela diversificada formação molecular desses compostos químicos, além da heterogeneidade própria dos substratos granulares. O transporte de contaminantes orgânicos envolve interações químicas e biológicas que podem exigir a aplicação de conhecimentos multidisciplinares na investigação e resolução da contaminação analisada (AZAMBUJA et al., 2000).

Durante o transporte do poluente no solo, além de processos físicos, existem fenômenos químicos e biológicos que modificam a concentração do contaminante na solução. Esses processos interferem na velocidade de propagação do soluto e são capazes de proporcionar a redução da concentração desse na solução aquosa (BERGMANN, 2016). Os ensaios de coluna são comumente empregados em estudos geotécnicos para a análise da migração de uma substância contaminante no solo, através de condições controladas de laboratório que permitem a simulação

da percolação em condições próximas às de campo. Através desses ensaios obtêm-se parâmetros de transporte que são essenciais para a interpretação do movimento de contaminantes em meio porosos (SHACKELFORD, 1995; LEITE, 2000).

A aplicação dos ensaios, aliada ao emprego de soluções matemáticas e recursos computacionais, possibilita a previsão do avanço do poluente no solo, favorecendo, caso seja necessário, a escolha de métodos eficientes de contenção da contaminação e de remediação da área afetada (MIRANDA e DUARTE, 2002).

Altas concentrações de hidrocarbonetos de petróleo em meios como água e solos, representam uma ameaça à saúde humana, devido às características tóxicas de alguns compostos, como os BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e os xilenos) e os HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), e a persistência desses contaminantes no meio ambiente. Por outro lado, a degradação dos mesmos pode ser propiciada por microrganismos, ocorrendo de forma natural em campo ou estimulada com o uso de técnicas de biorremediação, as quais têm se destacado em comparação a outros métodos, principalmente pelos desafios econômicos do emprego de técnicas físico-químicas (VARJANI e UPASANI, 2017).

Devido à dificuldade de aplicação e custo elevado das práticas tradicionais de remediação de solos contaminados, o tratamento desses costuma limitar-se à retirada da camada afetada através de escavações, na perspectiva de eliminar o foco da contaminação e evitar o espalhamento da pluma contaminante. Essa prática acarreta a perda de grandes profundidades de camada natural do terreno. Dentro desse contexto, a redução da concentração de compostos orgânicos por atividade degradadora microbiológica, no próprio local da contaminação, apresenta-se como uma prática com viabilidade técnica e econômica (COSTA et al., 2015).

Apesar dos avanços em estudos biotecnológicos pode-se considerar a técnica de biorremediação como em fase de desenvolvimento. O tema, presente em numerosas pesquisas científicas, ainda exige esclarecimentos, principalmente com relação as taxas de deterioração de fluidos petrolíferos e a listagem de espécies microbianas com potencial de degradação de hidrocarbonetos. Além do mais, há a

necessidade de associação dos dados obtidos em laboratório para emprego da técnica em campo e para a criação de inovações nas tecnologias de tratamento (WU et al., 2017).

Dentre as tecnologias existentes, em solos compactados de baixa permeabilidade, a existência ou manipulação da população microbiana degradadora de hidrocarbonetos propicia a obtenção de sistemas de contenção eficazes de contaminantes que possibilitam a degradação de compostos orgânicos (DANIEL e BENSON, 1990; KANMANI, GANDHIMATHI e MUTHUKKUMARAN, 2014).

Lima (2018) aplicou ensaios de coluna em diferentes solos, coletados em uma área de exploração de petróleo *onshore*. O autor avaliou a possibilidade de aplicação dos mesmos como material constituinte de bacias de contenção para contaminantes ricos em hidrocarbonetos. Contatou-se, para um dos solos analisados, denominado solo várzea, decaimentos nas curvas de chegada geradas, o que poderia ter sido propiciado por atividades degradadoras de microrganismos nativos do solo.

Neste contexto, no presente trabalho, buscou-se certificar a existência das atividades degradadoras realizadas por microrganismos presentes no solo várzea, adotando-se análises microbiológicas tradicionais nas matrizes estudadas (solo e água de produção sintética), além de ensaios biológicos em amostras de solo provenientes das colunas ensaiadas. Para uma melhor caracterização do potencial degradador de HTP desses microrganismos, testes de oxidação foram realizados com isolados de fungos e bactérias cultivados das amostras de solo. Posteriormente, os microrganismos detectados com potencial de degradação de HTP foram identificados através de análises de sequenciamento genético.



## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a migração da fase dissolvida de uma água de produção de petróleo sintética, em um solo areno-argiloso proveniente de uma área de exploração de petróleo *onshore*, com a finalidade de verificar a ocorrência de processos de biodegradação do fluido por microrganismos presentes no solo.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as matrizes estudadas, solo e água de produção sintética, determinando propriedades físicas e químicas, e a numeração de unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos e bactérias;
- Identificar os fenômenos envolvidos na migração da fase dissolvida da água de produção, no solo em estudo, e o comportamento das interações solo/fluido;
- Verificar a ocorrência de decaimentos nas curvas de chegada geradas através do emprego de ensaios de coluna;
- Analisar a presença de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos no solo percolado por água de produção;
- Estudar o comportamento da microbiota das amostras retiradas das colunas de solo, em diferentes tempos;
- Identificar os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, para obtenção de parâmetros para aplicação de técnica de biorremediação *in situ* no tratamento de áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

O petróleo é constituído majoritariamente por hidrocarbonetos, compostos químicos formados por átomos de carbono e hidrogênio, os quais podem se dividir em diferentes grupos, dependendo do arranjo estrutural de sua molécula (QUANN e JAFFE, 1992).

A indústria petrolífera durante o processamento do petróleo, desde as etapas de exploração até a comercialização, acidentalmente, ocasiona impactos ambientais, principalmente aqueles associados à possibilidade de vazamento de substâncias oleosas, abrangendo o óleo cru e seus derivados. Esses vazamentos são, predominantemente, os responsáveis pela contaminação de solos e recursos hídricos por produtos petrolíferos (CORSEUIL E MARINS, 1997).

O desenvolvimento de tecnologias para o tratamento de águas contaminadas por substâncias oleosas encontra-se mais avançado do que os métodos existentes para tratamento de solos sob a mesma contaminação, o que justifica a existência de pesquisas, no presente cenário acadêmico, que avaliam os impactos gerados pela contaminação de solos por hidrocarbonetos de petróleo (RIZZO et al., 2006).

O termo HTP (hidrocarbonetos totais de petróleo) é utilizado para designar uma totalidade de hidrocarbonetos presentes no óleo bruto e em seus derivados, formado por diferentes frações que individualmente são constituídas por diferentes compostos químicos, como o hexano, óleos minerais, benzeno, tolueno, xileno, naftaleno e fluoreno (ASTDR, 1999).

A análise da concentração de HTP em uma área contaminada permite uma avaliação genérica do nível de contaminação. Os contaminantes derivados de petróleo são geralmente compostos por muitas substâncias diferentes, as quais são agrupadas no parâmetro HTP, o que proporciona uma melhor eficiência de avaliação da contaminação (PINEDO et al., 2012). Neste caso, são comumente empregados,

como base comparativa, os valores de concentração de HTP especificados na lista holandesa de valores de qualidade do solo e da água subterrânea (CETESB, 1999).

O uso de parâmetros genéricos de estudo em problemas de contaminação em áreas de produção pode ser justificado pelo fato de o óleo cru não possuir em sua constituição boa parte dos compostos derivados do petróleo que são especificados pelas legislações nacionais e internacionais. Como esses parâmetros de avaliação incluem o agrupamento de diversas substâncias com diferentes propriedades toxicológicas, um estudo detalhado da contaminação exige uma avaliação de risco mais minuciosa, a qual deve considerar as diferentes frações constituintes da parcela total de hidrocarbonetos, de acordo com suas propriedades físico-químicas (PINEDO et al., 2012).

Ao se tratar da contaminação de solos, alguns hidrocarbonetos destacam-se com relação aos demais, por representarem maiores risco de contaminação ambiental. Podem-se verificar facilmente na literatura pesquisas que evidenciam a necessidade de tratamento de solos contaminados, principalmente, por hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX - grupo de compostos orgânicos voláteis formados por benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), cujas estruturas moleculares possuem como característica principal a presença do anel benzênico. Também são incluídos nesse grupo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), caracterizados por possuírem múltiplos anéis aromáticos condensados (ANDRADE et al., 2010; PEREIRA NETTO et al., 2000).

Com relação aos HPAs, Pereira Netto et al. (2000) destacam a seriedade dos efeitos que podem ser proporcionados ao organismo humano sujeito à exposição a esses compostos, sobretudo devido ao caráter lipofílico dos HPAs e de seus derivados, o que possibilita uma absorção dos mesmos pela pele, por ingestão ou por inalação, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo. As propriedades físico-químicas e a grande distribuição ambiental desse elemento torna de grande importância a análise do risco de contaminação humana pelo mesmo e justifica a intensificação de avaliações de métodos de remediação de áreas contaminadas por produtos que contenham HPA.

Na literatura é possível encontrar pesquisas que testam métodos de descontaminação de solos com níveis consideráveis de BTEX, incluindo técnicas físicas, químicas e biológicas. Considera-se que a elevada concentração desses compostos no ambiente representa potenciais riscos ecológicos e à saúde humana (PENG et al., 2015). Além da elevada toxicidade dos BTEX, o seu alto potencial de poluição está aliado à capacidade de migração desse composto, o qual possui alta volatilidade e solubilidade em água (VARONA-TORRES et al., 2018).

A análise de risco de contaminação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo pode ser feita pela metodologia proposta pela CETESB (2006), através do procedimento de Ações Corretivas com Base no Risco (ACBR), o qual se baseia em tomadas de decisões de acordo com níveis de contaminação. Conforme essa metodologia a definição da concentração máxima aceitável de uma substância fundamenta-se na aplicação de equações que utilizam parâmetros do meio físico e suas particularidades (REZENDE e FERNANDES, 2013). No ACBR o gerenciamento das áreas contaminadas por hidrocarbonetos considera as características do contaminante, do meio contaminado, dos meios de transporte, das vias de ingresso e da população potencialmente exposta à contaminação (CETESB, 2006).

## 2.2 ÁGUA DE PRODUÇÃO

Em poços de produção maduros, a maior parte do fluido extraído é composta de água (percentuais normalmente acima de 80%), sendo esse fluido de produção formado pela fase livre do óleo bruto, óleo bruto disperso, água de formação, fluidos injetados, sólidos suspensos e componentes inorgânicos e orgânicos dissolvidos (FAKHRU'L-RAZI et al., 2009). É usual se denominar de água de produção, AP, a parcela aquosa desse fluido, a qual contém normalmente todas as fases citadas anteriormente, à exceção da fase livre de óleo, que é separada para beneficiamento. Devido à complexidade de seus compostos, os impactos gerados pela

disponibilização seja da água produzida ou do próprio fluido extraído, tornam-se uma questão de preocupação ambiental.

A AP é considerada como um subproduto da exploração de petróleo e gás, extraída durante os processos de separação utilizados nesses fluidos para que os mesmos se tornem produtos comercializáveis. O seu destino envolve alternativas como o descarte e o reúso. Em todos os casos é necessária a aplicação de tratamentos específicos que proporcionem o atendimento de critérios ambientais, operacionais ou da atividade produtiva onde será reutilizada (MOTTA et al., 2013). A AP pode ser tratada como uma emulsão óleo/água, com a fase oleosa dispersa. Sua composição varia a depender do campo de petróleo explorado, podendo conter compostos como os BTEX e HPAs, álcool e ácidos orgânicos, além de alguns metais, os quais estão dissolvidos na água e são provenientes da fase livre de óleo (DICKHOUT et al., 2017).

Como o petróleo é composto por diferentes frações de hidrocarbonetos, esses se comportam de forma diferente na água produzida. A maior parte dos hidrocarbonetos são pouco solúveis em água, o que faz com que a parte dispersa seja a porção de óleo predominante na água de produção. Outros hidrocarbonetos, como os BTEX e os fénois, possuem maior solubilidade em água, representando a parte dissolvida predominante na AP. Hidrocarbonetos de alto peso molecular, como os HPAs são consideravelmente de menor solubilidade, sendo um dos principais constituintes da parte de óleo dispersa (EKINS et al., 2007).

Conforme Vieira et al. (2003), o tempo de exploração dos poços de petróleo influencia no volume de água de produção, de forma que à medida que a vida econômica dos poços vai se esgotando, o volume de água de produção pode exceder em até dez vezes o volume de óleo produzido.

Os sólidos dissolvidos presentes na AP são constituintes inorgânicos compostos principalmente por cátions e ânions, dentre esses principalmente o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$ . A salinidade da AP varia de acordo com o tipo de formação da mesma, podendo-se obter desde valores abaixo dos requisitados para a água potável (250

mg.L<sup>-1</sup> para cloretos) até valores maiores do que o da água do mar (19.000 mg.L<sup>-1</sup>) (MOTTA et al., 2013).

Fakhru'l-Razi et al. (2009) destacam que a concentração de cátions e ânions alteram quimicamente a água de produção, influenciando no efeito de tamponamento e na salinidade. A salinidade pode afetar os processos de tratamento biológico da AP, de forma que a viabilidade de degradação por microrganismos deve levar em consideração os mecanismos de crescimento e adaptação dos mesmos em meios de alta salinidade (LAY et al., 2010).

Díaz et al. (2000) analisaram a biodegradação de hidrocarbonetos por consórcios bacterianos, constatando a redução nas taxas de biodegradação para altas salinidades de resíduos oleosos, valores a partir do dobro da água do mar, porém ainda com alcance de taxas de degradação significativas. Apesar da conhecida capacidade de alteração das condições microbiológicas do solo pela salinidade, existem microrganismos que se adaptam a essa condição, o que não inviabiliza o tratamento desse tipo de fluido contaminante por técnicas de biorremediação (AHAMED et al., 2014).

### 2.3 BIORREMEDIAÇÃO EM SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

A biorremediação tem se destacado dentre as técnicas existentes para remediar áreas contaminadas, principalmente por ser uma opção de baixo custo, associada ao seu potencial de eliminar ou reduzir níveis significativos de substâncias químicas em determinado meio (VIDALI, 2001).

Alguns autores consideram biorremediação como a aplicação de qualquer técnica que envolva a atividade do meio biológico, incluindo a atividade de sistemas vegetais (PIRES et al. 2003; JACQUES et al., 2007). Outros, assim como neste trabalho, associam o termo somente à atividade degradadora de microrganismos, principalmente fungos e bactérias.

A eficiência nos processos de degradação de contaminantes por microrganismos enfrenta diversas limitações, pois é necessário que haja condições ambientais propícias para o desenvolvimento das atividades microbiológicas, o que está relacionado com as características do poluente e da área contaminada. Dessa forma, as pesquisas existentes sobre biorremediação no cenário atual buscam entender os fatores envolvidos nos processos de biodegradação desencadeados em determinadas áreas contaminadas (VARJANI e UPASANI, 2017).

No tratamento de solos contaminados, a biorremediação pode ser empregada em processos *ex situ* ou *in situ*. A possibilidade de aplicação da técnica no próprio local da contaminação é também uma das grandes vantagens dessa biotecnologia, pois não envolve escavações e transporte de material para outros locais de tratamento, o que torna o processo menos agressivo ao meio (MEGHARAJ e NAIDU, 2017).

Os procedimentos *in situ* podem envolver diferentes métodos de aplicação da biorremediação, os quais se diferenciam em biorremediação intrínseca, bioaumentação e bioestimulação. A biorremediação intrínseca pode ser entendida como o processo de atenuação natural da contaminação, com o aproveitamento da atividade microbiológica local sem modificações nas características do ambiente, necessitando de monitoramento regular para análise do avanço do contaminante (BORDEN et al., 1997).

Quando a população de microrganismos local não tem capacidade suficiente para degradar o composto poluente, pode-se recorrer a modificações que possibilitem a melhor biodegradação, através do uso isolado, ou combinado, das técnicas de bioaumentação e bioestimulação (MUTECA, 2012).

A bioestimulação fundamenta-se em modificações nas condições ambientais que propiciem o melhor crescimento dos microrganismos e desenvolvimento das atividades de biodegradação, por meio do adicionamento de nutrientes ao solo. Já a bioaumentação consiste na inserção no solo de consórcios de microrganismos, pré-

selecionados, com capacidade de degradar a substância contaminante (BENTO et al., 2005).

A bioaumentação, por propiciar mudanças na microbiota local, possui algumas limitações. A nova população inserida no solo pode causar efeitos negativos para a manutenção de vida da população de microrganismos nativos, além do fato de que para que os níveis desejados de biodegradação sejam alcançados, os microrganismos inseridos também necessitam desenvolver suas atividades sem interferências da atividade microbiológica nativa do solo. Dessa forma, o emprego dessa técnica depende da aprovação de órgãos de fiscalização ambiental, a exemplo da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). A aprovação da estratégia de bioaumentação está relacionada à área de aplicação da técnica e aos tipos de microrganismos que serão utilizados (ANDRADE et al., 2010).

Muitos microrganismos, os quais podem ser amplamente encontrados na natureza, possuem a capacidade de utilizar hidrocarbonetos como fonte de energia e carbono (GOGOI et al., 2003). Na literatura é possível encontrar trabalhos que atribuem a capacidade de degradação de HTP a grupos diversos de bactérias e fungos (ATLAS, 1981). A taxa de degradação desse composto por microrganismos está diretamente ligada a estrutura molecular do mesmo, sendo que estruturas menos complexas (de peso molecular), possibilitam uma melhor degradação do composto (CERNIGLIA, 1992).

Esses microrganismos se apresentam de forma difundida no meio ambiente. As populações com capacidade degradadora de hidrocarbonetos, normalmente, são representadas por menos de 1% do total de comunidades microbianas existentes no meio. Entretanto, em contato com poluentes de petróleo, essas populações aumentam significadamente, alcançando uma representação de até 10% da comunidade do meio (ATLAS, 1995).

O potencial de degradação de hidrocarbonetos por microrganismos impulsiona o surgimento de novas tecnologias no tratamento de contaminações, como exemplo as bio-barreiras. Esse sistema, consiste na utilização de camadas de solos



enriquecidas com microrganismos e nutrientes que proporcionem a melhor degradação do composto desejado, além de propiciar a redução de condutividade hidráulica do contaminante pela formação de produtos provenientes do crescimento microbiano, os quais promovem a redução de poros disponíveis ao fluxo (RIJNAARTS, HESSELINK e DODDEMA, 1995; KIM e KIM, 2004).

Os trabalhos já realizados, que analisaram a degradação de hidrocarbonetos em solos, produziram informações valiosas sobre a interação microbiana com esses derivados do petróleo no ambiente, documentando uma coleção diversificada de bactérias e fungos capazes de degradar hidrocarbonetos (VAN HAMME et al., 2003). Dentre os microrganismos do ambiente dos solos já catalogados, Leahy e Colwell (1990) destacam os gêneros de bactérias *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* e *Pseudomonas* spp. e os coryneforms, além dos fungos *Trichoderma* e *Mortierella* spp.

Chaîneau et al. (1999) realizaram o isolamento e identificação de microrganismos em um solo agrícola após contaminação do mesmo com óleo combustível, onde foram enumeradas variadas espécies de fungos e bactérias com capacidade de assimilar hidrocarbonetos em seus processos metabólicos. Dentre os microrganismos listados os autores identificaram as espécies de bactérias , *Sphingomonas spiritivorum*, *Acinetobacter baumannii*, *Beauveria alba* e *Penicillium simplicissimum*, além dos fungos *Penicillium pinophilum*, *Penicillium simplicissimum*, *Penicillium restrictum*, *Beauveria alba*, *Trichoderma polysporum* e *Gongronella butleri*, os quais, na época, ainda não haviam sido citados como capazes de degradar hidrocarbonetos.

Roy et al. (2014) verificaram o potencial de biorremediação de solos contaminados com diferentes percentagens de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), nas faixas de 15,2 a 56,2% de concentração, através do isolamento de bactérias nativas com capacidade de degradar hidrocarbonetos. Com a aplicação da técnica de sequenciamento genético confirmou-se a capacidade de degradação de HTP por bactérias isoladas pertencentes aos gêneros *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Delftia*, *Achromobacter* e

*Pseudomonas*. Dentre os parâmetros analisados pelos autores como confirmação da capacidade de degradação, constatou-se o efeito do tratamento de bactérias na degradação do petróleo bruto nas mudanças de viscosidade do óleo cru ensaiado, com redução dessa viscosidade ao aumentar-se o potencial de degradação.

Lima (2018) analisou os fenômenos envolvidos na percolação de fluidos ricos em hidrocarbonetos de petróleo em diferentes solos pertencentes a uma área de exploração de petróleo *onshore*. O autor verificou que para um dos solos analisados, solo várzea, as concentrações de hidrocarbonetos do fluido percolado tenderam a reduzir com o passar do tempo de ensaio, o que pode ter sido ocasionado por atividades degradadoras de microrganismos nativos desse solo. Isso motivou, neste trabalho, a aplicação de ensaios de coluna, em conjunto com análises microbiológicas, para a avaliação do potencial de degradação de hidrocarbonetos por microrganismos nativos do solo várzea, além da especificação dos gêneros identificados.

Os trabalhos já realizados, presentes na literatura, evidenciam a importância da aplicação das técnicas microbiológicas genéticas na definição dos genomas com potencial de degradação de hidrocarbonetos, o que permite a obtenção de dados de grande contribuição para o desenvolvimento das técnicas de biorremediação. Van Hamme et al. (2003) ressaltam que a reportagem de microrganismos com capacidade degradadora de hidrocarbonetos deve ser feita com a associação dos controles apropriados para o desenvolvimento dessa atividade, as quais são fortemente influenciadas por fatores ambientais.

### 2.3.1 Fatores que influenciam na Biodegradação

A biorremediação pode ser classificada como um procedimento específico de um determinado local e a sua aplicação eficiente no tratamento de solos contaminados representa um desafio para pesquisadores e profissionais envolvidos na área ambiental (BALBA et al., 1998).

A biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo no ambiente é considerado um processo de alta complexidade, já que os aspectos quantitativos e qualitativos da degradação desses compostos estão relacionados com a natureza e proporção de hidrocarbonetos presentes, as condições ambientais e a composição da comunidade microbiológica local (LEAHY e COLWELL, 1990).

As dificuldades na aplicação dessa técnica são ocasionadas por diversos aspectos, como heterogeneidade e concentração dos compostos envolvidos. Altas concentrações podem inibir as atividades dos microrganismos. Com relação ao solo e às condições ambientais, as variáveis do local, como a profundidade e a presença de microrganismos, associado a condições físicas do meio, interferem fundamentalmente no crescimento microbiano e nas taxas de biodegradação (BALBA et al., 1998).

A peça fundamental para a avaliação da possibilidade de aplicação da técnica intrínseca de biorremediação está na composição microbiana do local da contaminação. A caracterização da comunidade de microrganismos locais, com a identificação e quantificação de espécies com capacidade de degradação de específicos compostos, associada a posterior avaliação das condições ambientais e das interferências ocasionadas pelas propriedades físico-químicas do contaminante no meio, permitem o planejamento de ações viáveis de remediação (GOGOI et al., 2003).

Dentre os fatores ambientais favoráveis ao desenvolvimento das atividades microbiológicas, Vidali (2001) destaca os adequados valores de temperatura, a presença de oxigênio e outros receptores de elétrons, valores ideais de pH e altos teores de nutrientes. As concentrações de nitrogênio, fósforo e carbono são essenciais para o desenvolvimento de vida microbiana, permitindo a criação de enzimas para a quebra de contaminantes.

Quanto as características físicas do solo, os principais fatores que influenciam o metabolismo microbiológico são a porosidade, a massa específica e a permeabilidade. Baixas permeabilidades limitam as taxas de transferência de

aceptores de elétrons e dificultam o transporte de nutrientes para as células microbianas (GOGOI et al., 2003). Logo, fenômenos que afetem a permeabilidade do meio, como a dispersão de argilas e a criação dos biofilmes bacterianos, podem afetar a eficiência de remediação da área contaminada pela atividade microbiológica. Este aspecto torna mais desafiador o desenvolvimento de barreiras minerais/biológicas para a contenção/degradação de contaminantes orgânicos.

Vidali (2001) relaciona algumas faixas de valores de parâmetros físico-químicos do solo, que são necessárias para que haja atividade microbiológica e que proporcionem condições propícias para a degradação de hidrocarbonetos. Esses valores são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Condições ambientais que afetam o desenvolvimento de microrganismos no solo

Parâmetros	Condições requeridas para atividade microbiológica	Condições propícias à degradação de óleo
Umidade do solo (%)	25 - 28	30 - 90
pH do solo	5,5 - 8,8	6.5 - 8.0
Concentração de Oxigênio para atividades aeróbias (%)	No mínimo 10	10 - 40
Concentração de Nitrogênio (%)	Presença de N e P	C:N:P = 100:10:1
Temperatura (C°)	15 - 45	20 - 30
Contaminantes	Não podem ter elevada toxicidade	Hidrocarbonetos: 5 -10% do peso seco do solo
Metais pesados	Conteúdo total 2000 ppm	700 ppm

Fonte: Adaptado de Vidali (2001)

A temperatura tem um papel influenciador no estado físico do contaminante e nas taxas de biodegradação. Baixas temperaturas afetam o espalhamento do óleo, devido a obtenção de maior viscosidade (ATLAS, 1981). Quanto ao metabolismo microbiológico, o mesmo é modificado pelas variações de reações bioquímicas

proporcionadas pelas alterações de temperatura. Para muitos microrganismos, as taxas de biodegradação duplicam para cada aumento de 10°C na temperatura. No entanto, temperaturas muito elevadas destroem as células microbianas (VIDALI, 2001).

As propriedades do fluido percolante também possuem influencia nas atividades de biodegradação. A salinidade é um fator crucial para o metabolismo microbiológico. Contaminantes com elevadas concentrações de cloreto de sódio podem ocasionar estresse ambiental, produzir efeito de destruição das células microbianas e, conseqüentemente a redução de biomassa (TELLEZ e NIRMALAKHANDAN, 1992). Propriedades como solubilidade e volatilidade, também possuem significância no transporte e biodisponibilidade do contaminante, interferindo na eficácia do processo de biorremediação (MEGHARAJ et al., 2011).

Outro fator determinante para a eficiência nos processos de degradação de contaminantes é a interação desse com o meio. Tratando-se de solos, o contaminante ao entrar em contato com o substrato granular, liga-se rapidamente aos minerais e à matéria orgânica presente no solo, através da combinação de processos químicos, como a sorção, a precipitação e a complexação. A capacidade do solo para liberar o poluente de suas partículas influencia diretamente na suscetibilidade de degradação microbiana do contaminante. (MEGHARAJ et al., 2011). Solos com predominância de processo químico de sorção, como aqueles com altos teores de siltes e argilas, não são recomendados em tratamentos de biorremediação. Além de baixa permeabilidade, esse material possui alta capacidade de adsorção, com formação da camada dupla, o que pode alterar, para condições não saturadas, a biodisponibilidade do contaminante no meio.

A análise da possibilidade de aplicação da técnica de biorremediação em solos contaminados deve considerar, além das características físico-químicas do solo e do contaminante, as interações desenvolvidas entre eles, o que envolve os processos físicos, químicos e biológicos relacionados com o transporte de contaminantes em meios porosos. Dessa forma, a aplicação da biorremediação pressupõe uma

pesquisa multidisciplinar, envolvendo conhecimentos provenientes de áreas como a geotecnia, a geologia e a biotecnologia.

## 2.4 DISPERSÃO DE ARGILA NO SOLO

O estado coloidal pode ser entendido como um sistema formado por duas fases, em que materiais mais refinados se encontram dispersos em outras substâncias, como por exemplo, as partículas finas em contato com a água no solo. São consideradas como partículas coloidais aquelas de diâmetro menor do que 1 micrômetro ( $\mu\text{m}$ ). Dessa forma, como as frações de argila atingem tamanho máximo de 2  $\mu\text{m}$ , boa parte de suas partículas possuem características coloidais. No solo, a matéria coloidal inorgânica é representada pelos argilominerais, sendo a parcela mais ativa do material poroso.

A movimentação de partículas coloidais no solo é propiciada quando as forças físico-químicas e hidrodinâmicas superam a capacidade de adesão dessas finas partículas ao meio poroso. A compreensão dos fenômenos envolvidos na mobilização dessas partículas é de grande importância para o entendimento do transporte de substâncias no solo (LUCAS, 2006).

A desagregação e movimentação das partículas coloidais podem ser ocasionadas por fatores físicos e químicos. Como fatores físicos citam-se as adições de forças hidrodinâmicas cisalhantes no sistema do solo promovidas por acréscimos na velocidade do fluido de percolação. Os fatores químicos geram alterações nas forças eletrostáticas das partículas, propiciando o aumento das forças repulsivas entre as mesmas. Essas modificações são normalmente ocasionadas por aumento do pH e a adsorção de íons (RYAN e ELIMELECH, 1996).

Como o transporte de substâncias em solo normalmente é desenvolvido a baixas velocidades, pode-se considerar que na percolação de fluidos em substratos granulares, as perturbações químicas são as principais responsáveis pela mobilização das partículas de argila.

Os fenômenos químicos que promovem a dispersão coloidal estão relacionados com as características do solo e as propriedades do fluido percolante. Conforme Ayers e WestCot (1991), os fatores relacionados à qualidade do fluido, que interferem diretamente na ocorrência de dispersão, são a quantidade de sais e a proporção de sódio com relação ao percentual de cálcio e magnésio. Teores relativamente altos de sódio na água ou outro fluido percolante, propiciam a dispersividade das partículas de argila.

Além das características do fluido percolante, o conhecimento da composição mineralógica do solo também é essencial para a previsão de propensão à dispersão de material, visto que a mineralogia afeta o tamanho das partículas e a superfície específica do solo. Solos com maior porcentagem de partículas finas estão mais sujeitos aos efeitos da dispersão, devido à sensibilidade das partículas menores aos íons de sódio trocáveis (DAOUD e ROBERT, 1992). Esses íons monovalentes, intensamente hidratados, além de não serem fortemente retidos pela superfície micelar, não são capazes de reduzir a eletronegatividade da camada dupla, contribuindo com a repulsividade entre as partículas (SENGIK e ALBUQUERQUE, 2003).

Os efeitos da dispersão das argilas são amplamente conhecidos em estudos na área das Ciências do Solo. Essas pesquisas, normalmente, são voltadas a análise da interferência da qualidade da água de irrigação na condutividade hidráulica, onde é conhecido que a redução da infiltração está associada à taxa de adsorção de sódio (RAS) e à mineralogia dos solos. O acréscimo da RAS ocasiona o aumento da dispersão de argilas e, conseqüentemente, a obstrução dos poros disponíveis para o fluxo. Os solos mais finos, devido a porcentagem de partículas de argila, são mais susceptíveis a quedas nas taxas de infiltração (YOUSAF et al., 1987; AYERS e WESTCOT, 1991; FREIRE et al., 2003).

A redução de porosidade também é influenciada pelas características das partículas mais grossas. Os grãos de areia possuem microlocais favoráveis a deposição das argilas, condição proporcionada pelo formato e textura das partículas arenosas, com a presença de muitas arestas. Todas essas características

concorrem para a formação de sítios de deposição de argila e matéria orgânica (ALMEIDA NETO, 2007).

Andrade e Cruciani (1996) ressaltam que a presença de argilo-minerais de alta atividade, que resultem em expansões, também influenciam na redução das taxas de infiltração em solos. A expansão causa o fechamento dos poros, reduzindo a condutividade hidráulica. Além do mais, as pressões de expansão, empurram as partículas de argila de encontro umas às outras, proporcionando a repulsão das mesmas.

Além do impacto da dispersão das argilas nas taxas de infiltração, essa ainda impacta nas atividades microbiológicas do meio. Partículas minerais primárias tendem a formar microaglomerados e esses, por sua vez, formam aglomerados maiores, de forma a manter uma estrutura hierárquica, a qual desempenha um papel fundamental nos transportes de gases e fluidos no solo, desenvolvendo um importante papel no desenvolvimento de microrganismos. Os microagregados são formados por domínio de partículas argilosas, as quais podem se aglutinar em torno de células ou colônias microbianas. A camada formada pelos microagregados serve de proteção aos microrganismos, favorecendo suas atividades no solo (SNYDER e VÁZQUEZ, 2005).

A formação de microagregados do solo e a disposição dos poros refletem na forma como os microrganismos reagem com o ambiente, sendo fundamental para a dinâmica das comunidades microbianas (MORRIS e BLACKWOOD, 2015). Dessa forma, grande parte da biomassa microbiana dos solos pode ser encontrada associada a microagregados (SNYDER e VÁZQUEZ, 2005).

A interpretação dos fenômenos envolvidos durante a percolação de uma determinada substância em um solo, o que inclui o fenômeno de dispersão e seus efeitos, pode ser realizada através da aplicação de ensaios de coluna associado a ensaios de caracterização do solo e do fluido.



## 2.5 ENSAIOS DE COLUNA

Os parâmetros de transporte que descrevem a migração de uma determinada substância em um meio poroso podem ser obtidos através de ensaios de coluna realizados em laboratório, os quais permitem a simulação de fluxo de contaminantes em condições próximas às condições de campo. São ensaios de simples execução, porém demandam longos períodos e requerem medições periódicas durante sua realização (AZEVEDO et al., 2005; NAKA et al., 2016).

O ensaio de coluna pode ser considerado como uma adaptação do ensaio de permeabilidade, possibilitando, além da medição da vazão do efluente no solo, a determinação da concentração da espécie química com o tempo, o que permite a construção da curva de chegada do contaminante. Originalmente, esse ensaio foi idealizado para análises em amostras de solo saturadas, onde, em condições estacionárias, o tempo pode ser convertido no número de volumes de vazios percolados. Existem variadas formas de montagem do ensaio de coluna, porém todas consistem em um reservatório de entrada que contém a substância percolante desejada, uma coluna de solo, compactada ou constituída de amostra indeformada, na qual a substância será percolada, e um reservatório de coleta. (BARBOSA et al., 2015).

Durante a percolação do fluido estudado na coluna de solo, análises devem ser realizadas para a quantificação de determinada substância contida na solução em estudo, o que permite a comparação das concentrações da substância analisada, na entrada do reservatório e após a percolação no solo, na saída da coluna. Essas análises possibilitam a obtenção de dados para a plotagem da curva de chegada do contaminante e a interpretação da capacidade do material em retardar, ou mesmo reter, determinada substância (LEITE, 2000).

O objetivo principal do ensaio de coluna é a determinação dos parâmetros  $R_d$  (fator de retardamento) e  $D_h$  (coeficiente de dispersão hidrodinâmica), os quais são obtidos por ajuste da curva de concentração baseado em adequadas soluções analíticas ou numéricas para o caso em estudo (SHACKELFORD, 1994).

A obtenção do  $R_d$  é comumente obtida através da correlação do valor de concentração ( $C/C_0$ ) na curva de chegada correspondente a um volume de poros de 0,5. Shackelford (1995) evidencia contudo que, no caso de fluxos a baixas velocidades, característica predominante em solos finos, a estimativa do valor de  $R_d$  não pode ser realizada conforme essa consideração. Em baixas taxas de fluxo, a dispersão hidrodinâmica é mais influente que os processos de advecção. Essa relação pode ser avaliada através do número de Peclet ( $P_L$ ), Equação 1.

$$P_L = \frac{v_s L}{D_h} \quad (1)$$

Onde:

$v_s$  = Velocidade média de fluxo (L/T);

$L$  = Comprimento da coluna (L);

$D_h$  = Coeficiente de dispersão hidrodinâmica ( $L^2/T$ ).

Para os casos em que  $P_L < 1$ , o  $R_d$  pode ser obtido pelo cálculo da área sobre a curva de chegada do contaminante em condições de obtenção da estabilização das concentrações ( $C/C_0=1$ ) (SHACKELFORD, 1995).

### 2.5.1 Modelagem da curva de chegada

Diversas soluções analíticas foram desenvolvidas para modelar o transporte de substâncias, através de equações diferenciais que levam em conta os diversos fenômenos que ocorrem no meio poroso além dos conceitos de conservação da massa, energia e momento. As soluções destas equações dependem da aplicação

de condições de contorno as quais devem ser apropriadas ao caso prático de estudo (VAN GENUCHTEN e PARKER, 1984).

Van Genuchten (1981) apresenta soluções analíticas para a equação unidimensional de advecção/dispersão, considerando diferentes condições iniciais e de contorno para o solo, além de apresentar soluções que incluem termos que estimam os efeitos de adsorção, produção de ordem zero e decaimento de primeira ordem. Devido a principal hipótese dessa pesquisa basear-se na ocorrência de atividades biodegradadoras no solo estudado, a modelagem da curva de chegada foi realizada considerando-se a Equação 2 (VAN GENUCHTEN, 1981; BEAR, 1972), a qual é acoplada de um termo de decaimento:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{2} \left\{ \exp\left(\frac{v_s - u \cdot z}{2D_h}\right) \cdot \operatorname{erfc}\left[\left(\frac{R_d z - ut}{2\sqrt{D_h R_d t}}\right)\right] + \frac{1}{2} \exp\left\{\frac{(v_s + u) \cdot z}{2D_h}\right\} \operatorname{erfc}\left(\frac{R_d z + ut}{2\sqrt{D_h R_d t}}\right) \right\} \quad (2)$$

Onde:

$C_0$  = concentração de soluto no reservatório (M/L<sup>3</sup>);

$C$  = massa de soluto por unidade de volume de fluido passando por uma dada seção transversal durante um intervalo de tempo (M/L<sup>3</sup>);

$v_s$  = velocidade média de água nos poros (L/T);

$z$  = distância (L);

$t$  = tempo (T).

O termo  $u$ , expresso pela da Equação 3, está vinculado de uma constante de decaimento de primeira ordem ( $\mu$ ):

$$u = v_s \left\{ 1 + \frac{4 \mu D_h}{v^2} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

A Equação 2 é adotada na forma incremental, conforme a Equação 4:

$$\frac{\partial C}{C_0} = \frac{1}{2} \left\{ e^{x_1} \frac{-2}{\sqrt{\pi}} \cdot e^{-x_2^2} \cdot \partial x_2 + \operatorname{erfc}(x_2) e^{x_1} \cdot \partial x_1 + e^{-x_3} \frac{-2}{\sqrt{\pi}} e^{-x_4^2} \cdot \partial x_4 + \operatorname{erfc}(x_4) e^{x_3} \cdot \partial x_3 \right\} \quad (4)$$

Onde:

$$x_1 = \frac{(v-u) \cdot z}{2D_h} \quad (5)$$

$$x_2 = \frac{R_d \cdot z - u \cdot t}{2(D_h \cdot R_d \cdot t)^{1/2}} \quad (6)$$

$$x_3 = \frac{(v+u) \cdot z}{2D_h} \quad (7)$$

$$x_4 = \frac{R_d \cdot z + u \cdot t}{2(D_h \cdot R_d \cdot t)^{1/2}} \quad (8)$$

O efeito do decaimento nas concentrações de substâncias orgânicas pela ocorrência de atividade biodegradadora não é bem representado pelo emprego de termos de primeira ordem. Os resultados dessa atividade podem ser reproduzidos pela aplicação de modelagens cinéticas não lineares, sendo comumente adotadas as formulações cinéticas de Monod (1949) (COUTO e MALTA, 2006). Essa formulação considera que a taxa de biotransformação aumenta com o acréscimo de concentração do substrato, sendo limitada por uma taxa máxima de degradação (BEKINS, WARREN e GODSY, 1998).

Os parâmetros envolvidos na simulação dos efeitos da biorremediação intrínseca, além da formulação hiperbólica de Monod, dificultam a modelagem de uma solução genérica considerando a cinética de degradação através da aplicação da equação de advecção/dispersão (ALVAREZ e ILLMAN, 2005).

Dessa forma, neste trabalho adotam-se as considerações para o termo de decaimento propostas por Lima (2018), em que o coeficiente de decaimento ( $\mu$ ) assume uma função logística, podendo ser interpretado como um indicativo da cinética de biodegradação. Além dessas modificações, para a melhor adequação da modelagem aos dados experimentais obtidos, considerou-se a variação da velocidade e do coeficiente de dispersão hidrodinâmica com relação ao tempo de ensaio.

A formulação adotada para  $\mu$  é apresentada pela Equação 9.

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}}}{1 + e^{-\beta(t-t_1)}} \quad (9)$$

Onde:

$\mu_{\text{máx}}$  = Valor para o qual o coeficiente de decaimento torna-se constante ( $T^{-1}$ );

$\beta$  = constante relacionada à velocidade do crescimento de  $\mu$  ( $T^{-1}$ );

$t$  = tempo total de ensaio (T);

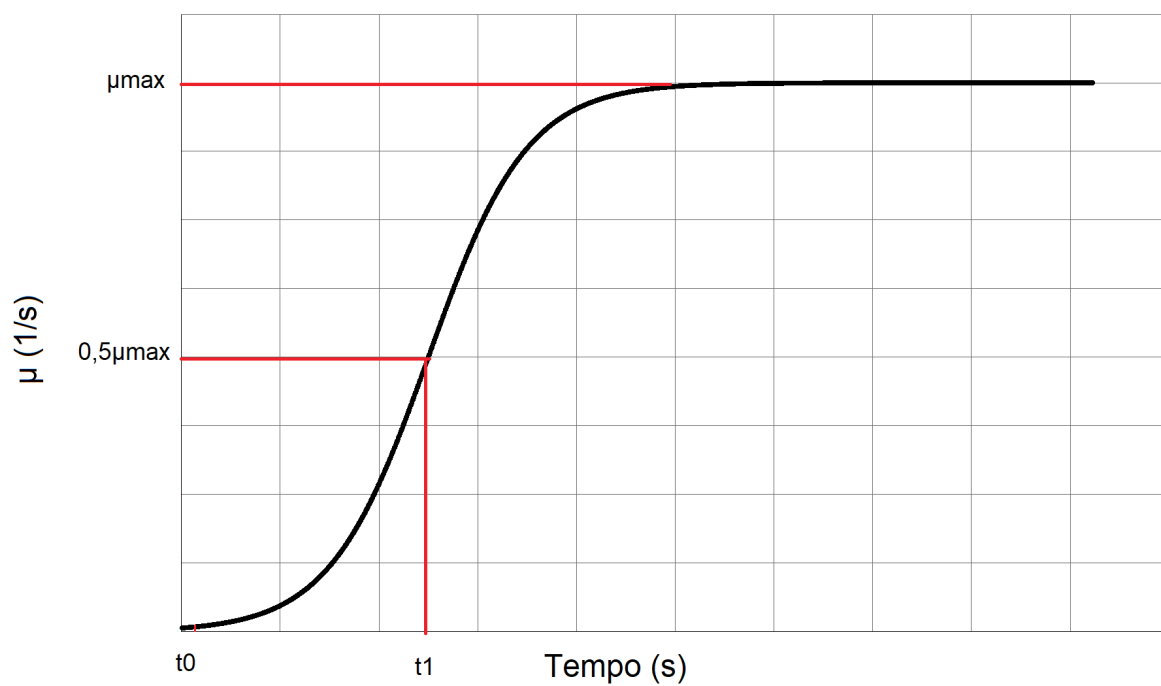
$t_1$  = tempo o qual o módulo de  $\mu$  é igual a 0,5 de  $\mu_{\text{máx}}$  (T).

A Figura 1 apresenta a variação do coeficiente de decaimento proposto por Lima (2018), com relação ao tempo. É considerado que a degradação ocorre até um valor de  $\mu_{\text{máx}}$ , a partir do qual o decaimento torna-se constante. Considerando a possível ocorrência de atividade degradadora microbiológica, o valor de  $\mu_{\text{máx}}$  está relacionado com a estabilização da taxa de crescimento dos microrganismos.

Vale ressaltar que a consideração do tempo de biodegradação na modelagem do transporte de contaminantes é fundamental para a previsão da eficácia da técnica de biorremediação intrínseca, estando esse tempo relacionado com a cinética de biodegradação, a qual depende da concentração e distribuição da substância orgânica no meio, dos tipos de microrganismos presentes no solo, e, para as

condições de degradação aeróbias, a difusão de oxigênio nos agregados (DHAWAN, ERICKSON e FAN, 1993; CUTRIGHT, 1995).

Figura 1. Curva de variação do coeficiente de decaimento

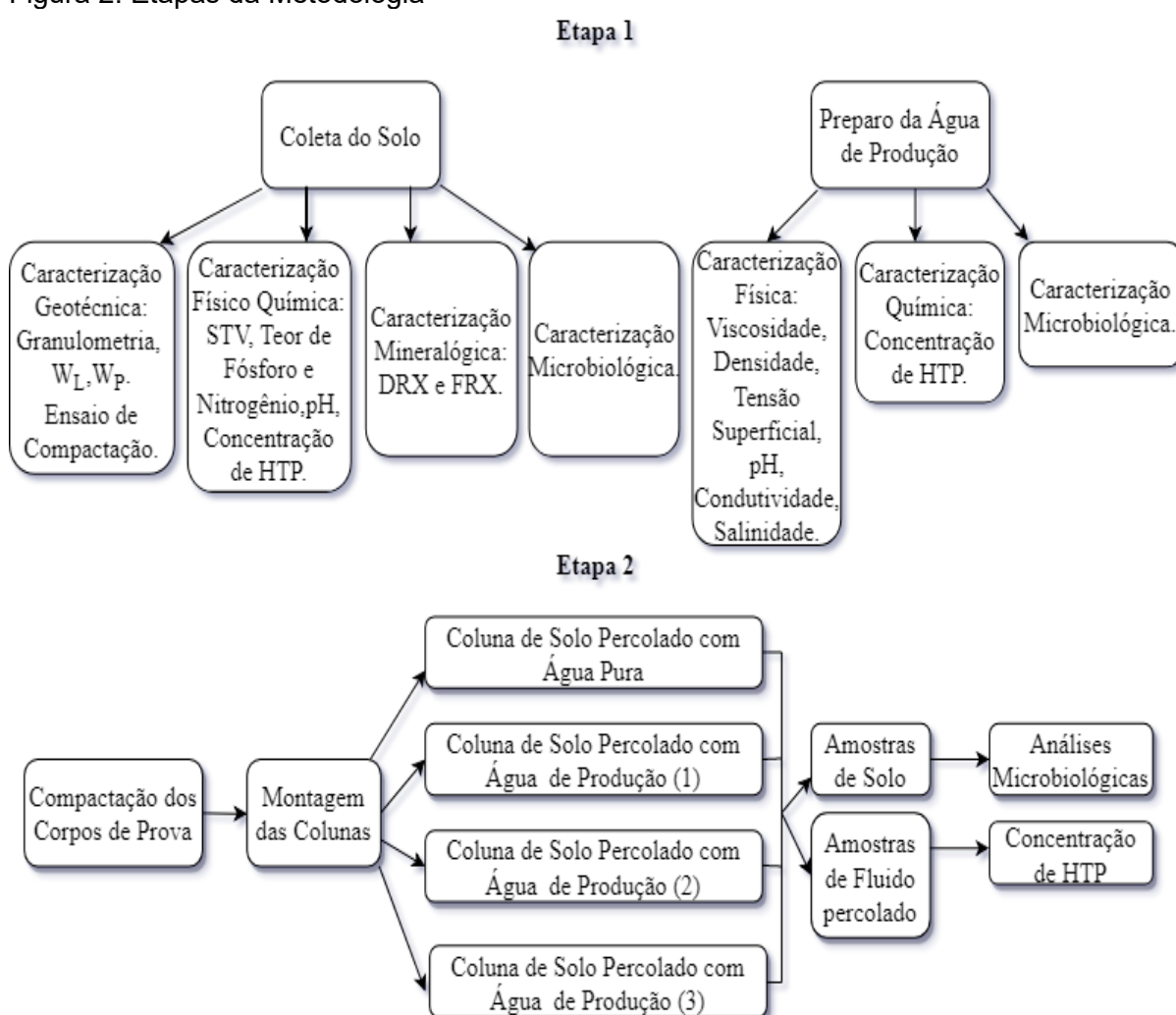


Fonte: Lima (2018)

### 3 METODOLOGIA

Os procedimentos metodológicos aplicados nesta pesquisa estão detalhados no fluxograma constante da Figura 2.

Figura 2. Etapas da Metodologia



Fonte: Autora (2018)

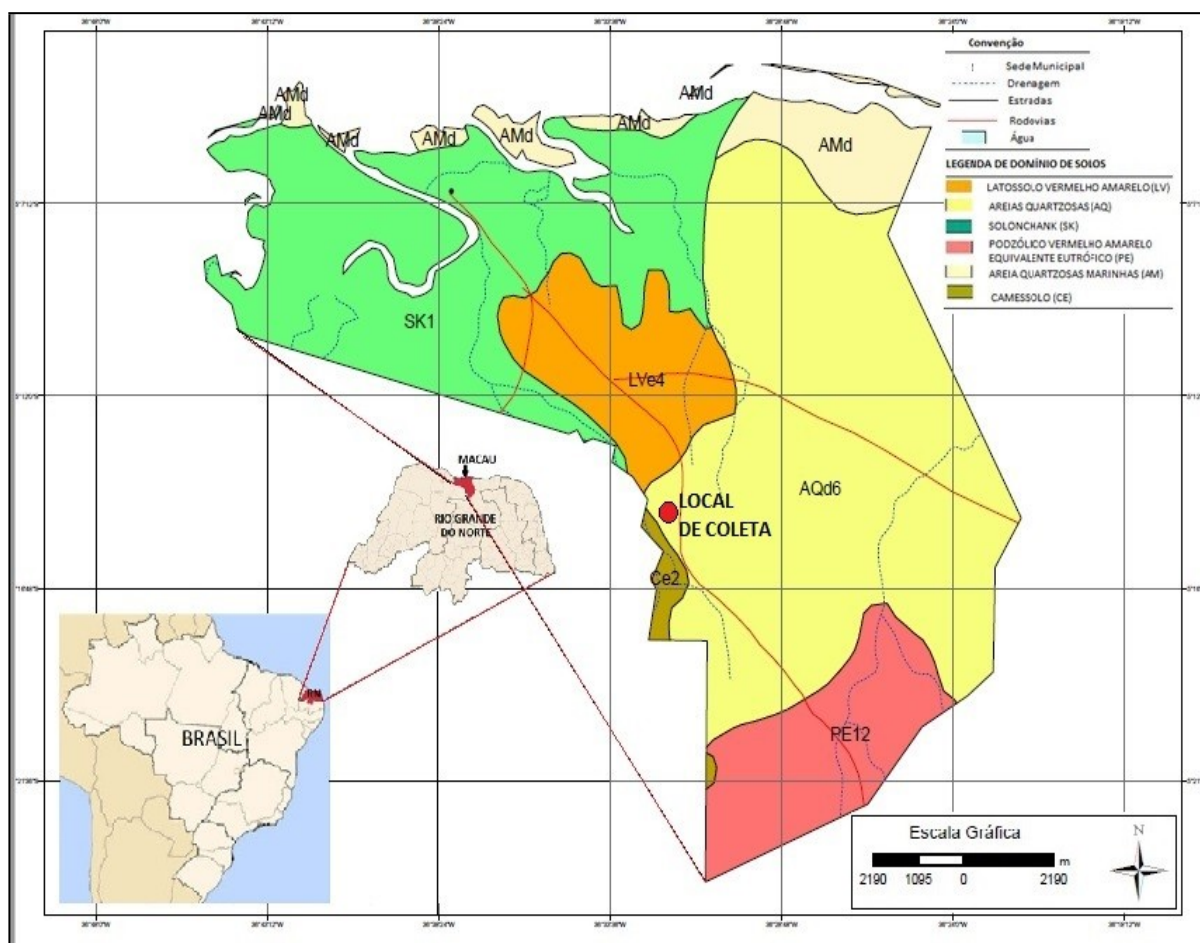
Como apresentado, a parte experimental desta pesquisa pode ser dividida em duas etapas: uma etapa inicial de caracterização dos materiais e uma segunda etapa, que consiste no emprego dos ensaios de colunas e posterior análises das

amostras coletadas. Os itens a seguir detalham os ensaios, materiais e equipamentos empregados nas diferentes fases deste trabalho.

### 3.1 SOLO

O solo utilizado nessa pesquisa foi coletado no campo terrestre de exploração de petróleo (*onshore*) pertencente à Bacia Potiguar, numa área de coleta localizada no município de Macau-RN. A Figura 3 é uma adaptação do mapa de reconhecimento dos solos do município de Macau/RN, elaborado pela EMBRAPA (1971).

Figura 3. Área de coleta do solo no município de Macau-RN



Fonte: Adaptado de Embrapa (1971)



Foram extraídas amostras nas imediações de faixas de dutos de transporte de produção de petróleo (Figura 4), às margens de rio intermitente que cruza o oleoduto. O material coletado foi acondicionado em sacos plásticos e transportado para o laboratório de Geotecnia Ambiental (GEOAMB) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Figura 4. Local de coleta do solo recolhido para a presente pesquisa



Fonte: GEOAMB (2016)

A escolha desse solo, denominado solo várzea, baseou-se em um estudo realizado anteriormente a essa pesquisa, por Lima (2018). O autor constatou para o mesmo solo, com o uso de ensaios de coluna, decaimentos nas concentrações de HTP gerados nas curvas de chegada. Esse resultado fez surgir a hipótese de que a migração do fluido no solo estudado sofria influência de fatores que não podiam ser explicados através, somente, de fenômenos físicos, observando-se a possibilidade de influência no transporte do contaminante no solo de processos biológicos que

propiciassem o seu decaimento. A seguir são descritos os procedimentos empregados na caracterização das amostras de solo coletadas.

### 3.1.1 Caracterização geotécnica do solo

Os ensaios de caracterização geotécnica do solo foram realizados no Laboratório de Solos da Universidade Católica de Salvador (UCSal), para determinar a distribuição granulométrica (NBR 7181:2016), o limite de liquidez (NBR 6459:2016) e o limite de plasticidade (NBR 7180:2016). Os resultados obtidos foram suficientes para a classificação do solo de acordo com o Sistema Unificado de Classificação dos Solos (SUCS) e a NBR 6502 (1995).

### 3.1.2 Ensaio de compactação

Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Solos da Universidade Católica de Salvador (UCSal), para a obtenção de parâmetros ótimos de compactação:  $W_{ótima}$  (Umidade ótima) e  $\rho_{dmáx}$  (massa específica seca máxima). A compactação foi realizada na energia do Proctor Normal, conforme os procedimentos descritos na NBR 7182 (2016).

### 3.1.3 Caracterização química e mineralógica dos solos

As técnicas utilizadas para a caracterização mineralógica das amostras de solo empregadas neste estudo foram a Fluorescência de Raios-X (FRX) e a Difractometria de Raios-X (DRX), esses métodos são apresentados nos subitens abaixo:

### 3.1.3.1 Fluorescência de Raios-X (FRX)

A análise por fluorescência de raios-X (FRX) é um método qualitativo e quantitativo, baseado na medida das intensidades e do número de raios-X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra e detectados por unidade de tempo, quando a amostra é excitada por partículas como elétrons, prótons ou íons produzidos em aceleradores de partículas ou ondas eletromagnéticas, além do processo mais utilizado que é através de tubos de raios-X (MELO JÚNIOR, 2007).

Esse ensaio foi realizado no GEOAMB/UFBA, conforme a ASTM E1621 (2013), com o uso de um espectrômetro portátil de fluorescência de Raios-X, modelo X-MET 7500, da *Oxford Instruments*®, permitindo a análise da constituição do solo pela detecção dos elementos leves e com números atômicos superiores a 10.

Amostras de solo com massa aproximada de 100 gramas foram acondicionadas em pequenos sacos plásticos de espessura fina, os quais foram apoiados em uma bancada. Em seguida posicionou-se o espectrômetro, deixando-o em contato com o saco durante aproximadamente 15 segundos (Figura 5). Para melhores resultados optou-se por ensaiar 3 amostras do solo para determinação da composição atômica por FRX. Para cada amostra de solo o procedimento foi repetido dez vezes e os valores médios das concentrações dos principais elementos identificados.

Figura 5. Realização de ensaio de FRX em amostra de solo várzea



Fonte: Autora (2018)

### 3.1.3.2 Difractometria de Raios-X (DRX)

A técnica de difração de raio-X consiste na incidência de uma radiação sobre um conjunto de planos cristalinos, possibilitando a detecção de suas fases. Os feixes refletidos por dois planos subsequentes apresentam o fenômeno da difração. Quando a diferença entre seus caminhos óticos for um número inteiro de comprimentos de onda, haverá superposição construtiva (um feixe de raios-X difratado é observado); caso contrário, haverá superposição destrutiva e não se observará qualquer sinal de raios-X (PICCOLI et al., 2015).

Esse ensaio foi realizado pelo Laboratório de Ensaio em Durabilidade dos Materiais (LEDMA), da Universidade Federal da Bahia (UFBA), possibilitando a caracterização mineralógica do solo estudado.

### 3.1.4 Caracterização Físico-Química do Solo

As análises de caracterização físico-química do solo foram realizadas em unidades laboratoriais do LEPETRO – Excelência em Geoquímica: Petróleo, Energia e Meio Ambiente, complexo laboratorial localizado no Instituto de Geociências (IGEO) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Os procedimentos metodológicos utilizados são detalhados nos itens 3.1.4.1 a 3.1.4.5.

#### 3.1.4.1 Determinação de Fósforo no Solo

A determinação do teor de fósforo do solo, importante para os estudos biológicos, foi realizada através do método de espectrofotometria, conforme o procedimento descrito no Manual de Métodos de Análise de Solos da EMBRAPA (TEIXEIRA et al., 2017). Conforme essa metodologia, uma amostra de 0,4g de solo foi misturada em um tubo com 10mL de HCl. O tubo foi agitado por 16h em mesa agitadora (Figura 6), sendo posteriormente centrifugado por 15 min a 3000 RPM.

Figura 6. Foto exemplificando fase de agitação da amostra de solo para análise de fósforo



Fonte: Autora (2018)

Uma alíquota de 1,0mL foi retirada e misturada com 0,8mL de solução ácida (molibdato e tartarato), 10mL de água deionizada e 0,2mL de ácido ascórbico, em um tubo de ensaio. A mistura foi agitada e depois posta em repouso por 10 min. A determinação do teor de fósforo foi realizada em um espectrofotômetro em 880nm.

#### *3.1.4.2 Determinação de Nitrogênio Total*

O teor de nitrogênio total do solo foi determinado através do método de determinação Dumas, com o emprego do equipamento analisador de nitrogênio da LECO Corporation (modelo FP628). Uma amostra de 250mg de solo foi destorroada e embrulhada em uma folha de estanho. Após calibração do equipamento a amostra foi inserida no carrossel amostrador do aparelho, sendo realizada a leitura da porcentagem de nitrogênio do solo.

#### *3.1.4.3 Determinação do pH*

O pH do solo foi aferido através de um medidor multiparamétrico de bancada da HANNA Instruments (modelo HI5521). Inicialmente as amostras de solo foram preparadas para a realização da leitura de pH no instrumento, através da diluição de 10g do solo coletado em 25mL de água ultra pura. A amostra ficou em repouso durante 1h, proporcionando o decantamento das partículas do solo. Após a devida calibração do instrumento, agitou-se a mistura do solo com a água e, em seguida, o eletrodo de medição de pH foi inserido no becker contendo o material. Aguardou-se a estabilização do aparelho e a medição do valor de pH, o qual foi aferido na tela do instrumento. Parte das etapas realizadas nesse ensaio podem ser visualizadas na Figura 7.

Figura 7. Medição de pH do solo de várzea, realizada no LEPETRO/IGEO/UFBA



Fonte: Autora (2018)

#### 3.1.4.4 Teor de Matéria Orgânica por identificação dos Sólidos Totais Voláteis (STV)

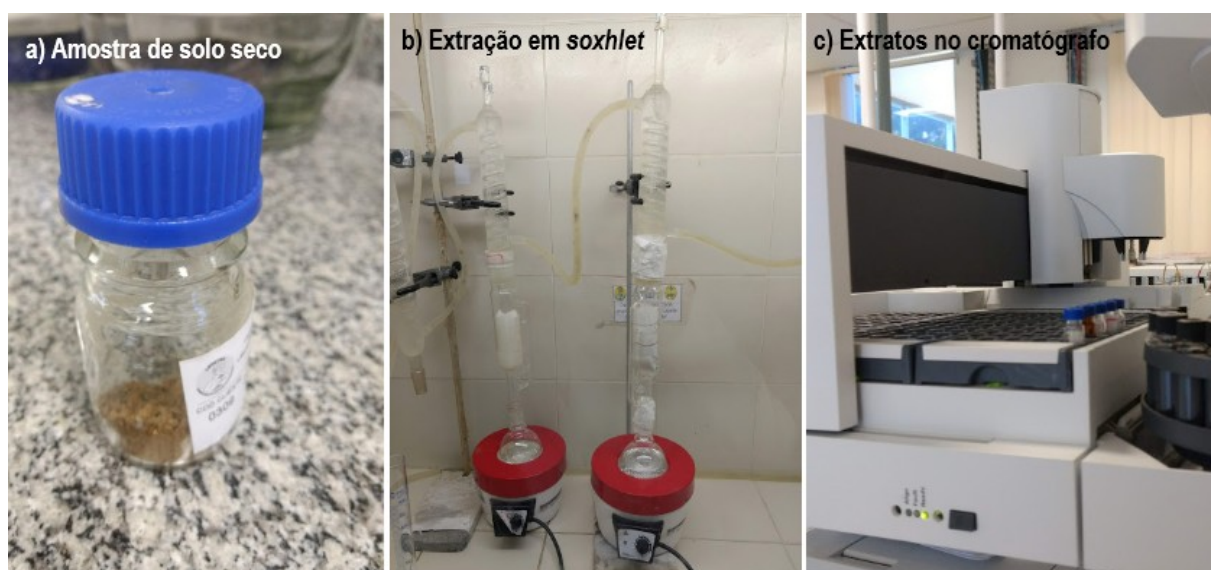
A determinação do teor matéria orgânica foi realizada através do Método dos Sólidos Totais Voláteis (STV), ou método da mufla. Retirou-se três amostras de solo, com aproximadamente 70g de massa, sendo essas amostras colocadas em cadinhos de porcelana e levadas à estufa a 70°C por dois dias. Em seguida calcinou-se as amostras em mufla a 600°C, por duas horas. Os STV são obtidos pela diferença de massa entre a amostra após secagem em mufla e a massa após secagem em estufa, a 70°C.

### 3.1.4.5 Concentração de HTPs das amostras de solo

Esse parâmetro foi determinado no laboratório LEPETRO/IGEO/UFBA, pela aplicação da técnica de extração em *soxhlet*, através do método EPA 3540-C, o qual possibilita a extração de compostos orgânicos de sólidos, como o solo.

O ensaio foi realizado em triplicata, com aplicação da extração em amostras de 10g de solo, previamente secas em liofilizador, seguido da mistura das mesmas com 300mL do solvente hexano, em tubos extratores, os quais foram interligados a sistemas de *soxhlet*. Após o tempo necessário para a extração, o fluido recolhido nos balões foi concentrado em um rotaevaporador, sendo posteriormente os extratos avolumados em *vials* de 2mL, os quais foram inseridos em um cromatógrafo a gás com detector de ionização por chama (CG/DIC), possibilitando a determinação das concentrações de HTP das amostras. A Figura 8 apresenta algumas etapas desse ensaio:

Figura 8. Visualização de parte das etapas para determinação da concentração de HTP do solo de várzea coletado para este trabalho



Fonte: Autora (2018)



### 3.1.5 Análise Microbiológica

Os ensaios microbiológicos adotados nessa etapa foram também realizados em unidades laboratoriais do LEPETRO/IGEO/UFBA. A caracterização microbiológica do solo consistiu no cultivo de fungos e bactérias em placas contendo o meio de cultura necessário para o desenvolvimento desses microrganismos, seguido da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Os ensaios microbiológicos adotados nessa etapa são detalhados nos itens 3.1.5.1 e 3.1.5.2.

#### 3.1.5.1 *Cultivo e contagem de bactérias*

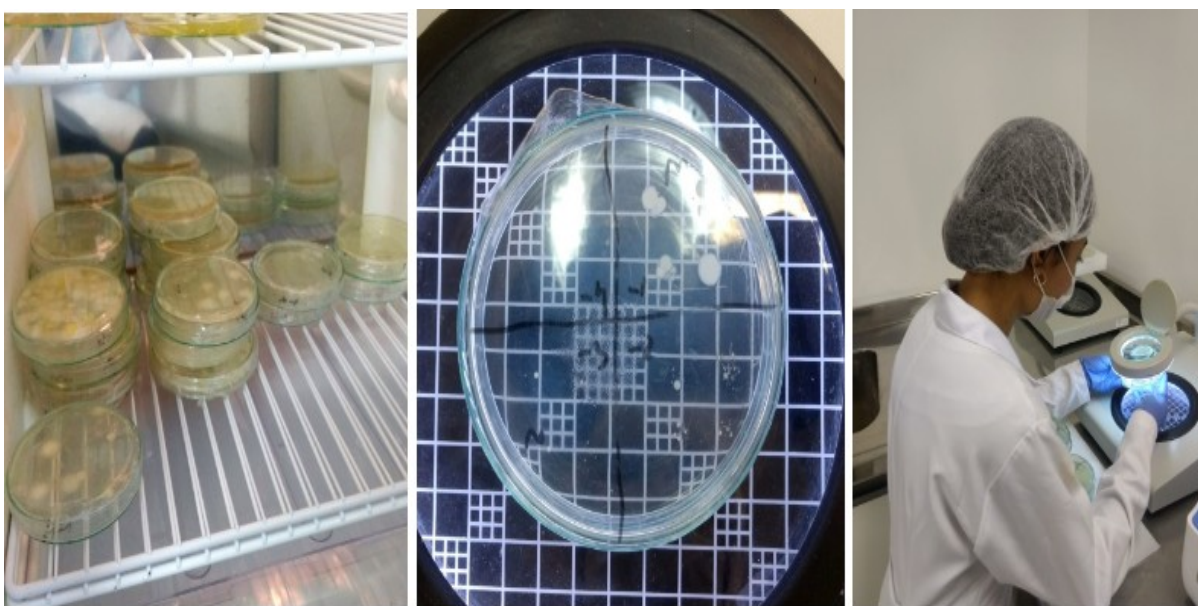
As análises foram realizadas em triplicata, seguindo-se a metodologia de diluição seriada por microgotas (ROMEIRO, 2011). Inicialmente todas as soluções, meios e vidrarias, foram devidamente autoclavados. Utilizou-se para cada análise 25g de amostra de solo, a qual foi diluída em um Erlenmeyer contendo 250mL de solução salina (2,25g de NaCl, 0,750mL de Tween 80 e 250mL de água destilada). Posteriormente foi transferido 0,1mL dessa mistura para o primeiro tubo de Eppendorf contendo 0,9mL de solução salina, o qual foi seguidamente agitado em agitador tipo vortex para homogenização da solução. Outra alíquota de mesmo volume foi retirada desse tubo de Eppendorf e transferida para um de nível de diluição superior. Esse procedimento foi repetido sucessivamente até a diluição de  $10^{-8}$ . A partir de cada tubo de Eppendorf foi retirada uma alíquota de 10 $\mu$ L, utilizada para produzir quatro gotas, dispostas espaçadamente em uma placa de Petri contendo meio de cultivo Agar Nutriente.

Para facilitar o procedimento de contagem, cada placa de Petri foi dividida em quatro quadrantes, onde cada um representa uma diluição, o que resultou na utilização de duas placas de Petri para cada amostra do solo. As placas foram incubadas por 48 h à 30°C. A contagem foi realizada após 24 h e 48 h de incubação. A Figura 9 apresenta as placas com cultivo de bactérias, realizado na caracterização do solo, e o procedimento adotado na contagem. O número de colônias de bactérias

foi obtido em termos de unidades formadoras de colônias, detectadas através da contagem, por grama de solo, através da aplicação da Equação 11.

$$UFC = \text{média} \times \frac{1}{\text{nível de diluição}} \times \frac{1}{\text{volume da alíquota}} \quad (11)$$

Figura 9. Parte do processo de cultivo e contagem de bactérias do solo várzea utilizado neste trabalho



Fonte: Autora (2019)

### 3.1.5.2 Cultivo e Contagem de Fungos

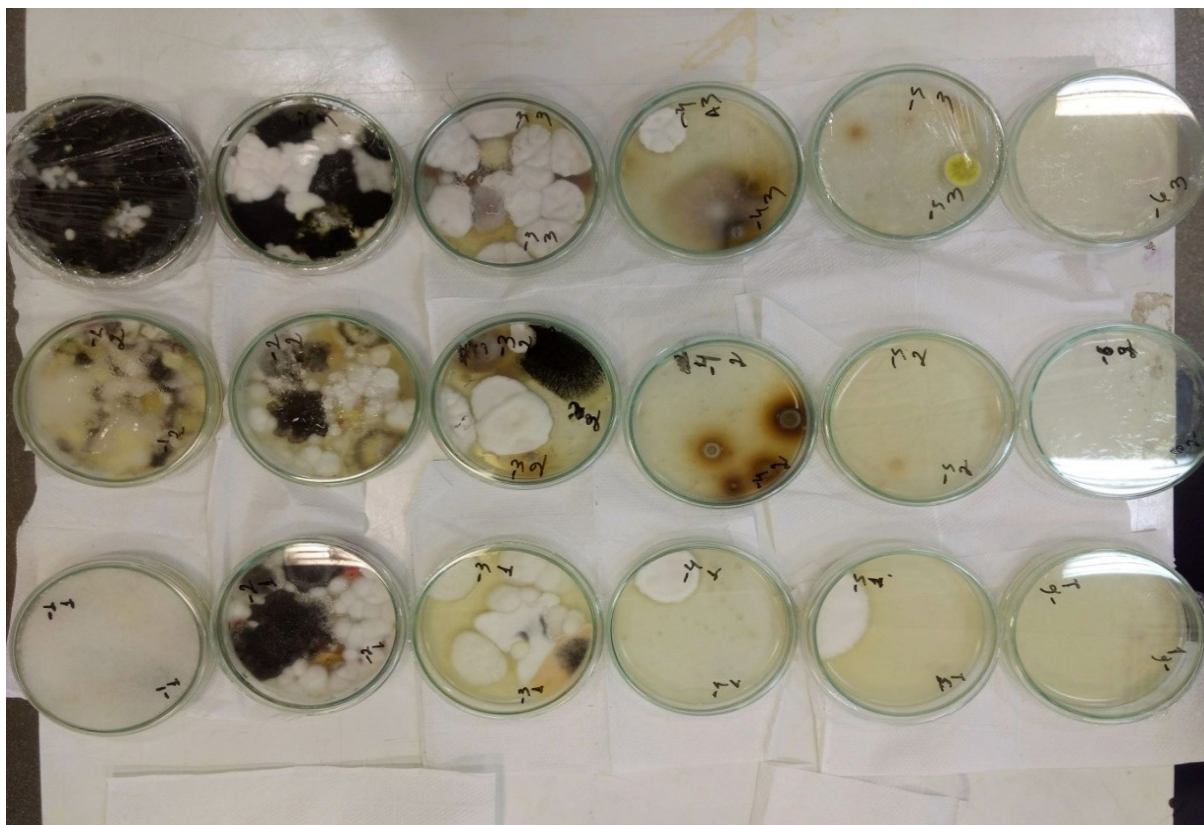
A metodologia baseou-se no procedimento de diluição seriada proposto por Gerba e Pepper (2004), com análises em triplicata. As soluções utilizadas, os meios e as vidrarias foram previamente autoclavadas. Amostras de 10g de solo foram diluídas em 95mL de solução salina (95g de NaCL e 95mL de água destilada) em Erlenmeyer. Inicialmente retirou-se uma alíquota de 1 mL dessa diluição e transferiu-se para um tubo contendo 9mL de água deionizada. Esse tubo passou por agitação em agitador tipo vortex para homogeneização da mistura, sendo posteriormente feita

a transferência de 1mL para um segundo tubo contendo 9mL de solução salina, e assim sucessivamente até a diluição  $10^{-6}$ . De cada diluição foi retirado 1mL da mesma e vertido para uma placa de Petri esterilizada.

Em seguida, o meio de cultivo Agar Sabouraud foi vertido para cada placa Petri contendo o inóculo, através da técnica Pour Plate. Posteriormente, as placas foram suavemente agitadas para distribuir o ágar e o inóculo através do fundo das mesmas. As placas ficaram em repouso para que ocorresse a solidificação do meio, e foram inseridas de cabeça para baixo na incubadora. Os cultivos foram verificados após um período de incubação de 7 dias, à temperatura de 30°C. No procedimento de contagem realizou-se a mesma metodologia descrita na contagem de bactérias.

A Figura 10 apresenta as placas com cultivo de fungos em todas as diluições realizadas para as três amostras de solo verificadas na fase de caracterização. As placas são exibidas da menor diluição para a maior diluição, no sentido da esquerda para a direita.

Figura 10. Placas com cultivo de fungos obtidos na etapa de caracterização do solo várzea



Fonte: Autora (2019)

### 3.2 FLUIDO UTILIZADO

A água de produção utilizada nesta pesquisa foi produzida no GEOAMB/UFBA através da mistura mecânica de 2% de petróleo oriundo da área de estudo, água deionizada e adição de 1g/L de NaCl (Cloroeto de Sódio). Gerou-se um volume de 250L, o qual foi acondicionado em um reservatório de 310L, previamente tratado com Extran Neutro a 5%. A Figura 11 permite que seja verificada parte do processo de armazenamento da água de produção sintética.

Figura 11. Visualização de parte do processo de armazenamento da água de produção sintética utilizada neste trabalho



Fonte: Autora (2018)

Tornou-se necessário a aplicação de ensaios de caracterização para verificar a proximidade dos valores de algumas propriedades da água de produção sintética, como salinidade, condutividade elétrica, viscosidade e concentração de hidrocarbonetos, com relação aos valores observados no fluido de produção proveniente da região de origem das amostras de solo, utilizado por Lima (2018).

### 3.2.1 Caracterização da Água Produzida

#### 3.2.1.1 Viscosidade

A viscosidade da água de produção foi medida no GEOAMB/UFBA, através do uso de um viscosímetro rotacional modelo Digital DVET da Braseq Tecnologia, o

qual mede o torque necessário para girar um elemento imerso (o fuso) em um fluido. A medida final é dada em viscosidade.

A mediação de viscosidade nesse aparelho é normatizada pela ASTM D4016-14. De acordo com o manual de utilização do equipamento, a escolha do fuso e da velocidade a ser aplicada no ensaio deve ser feita conforme a viscosidade aparente do fluido, considerando-se que o valor de viscosidade esperado deve ser inversamente proporcional ao tamanho do fuso, e à velocidade de rotação. Dessa forma, ao ser observado visualmente que a viscosidade da água de produção ensaiada aproximava-se da viscosidade da água, optou-se por escolher a maior velocidade de rotação disponível no aparelho (60 RPM) e o fuso de maior diâmetro (fuso ULA).

Foram realizadas medidas para as temperaturas de 20°C, 30°C e 40°C, através do acoplamento ao viscosímetro de um banho térmico (Modelo TC-550, Brookfield, USA), o que permitiu a verificação do comportamento do fluido a diferentes temperaturas. Parte do processo de medição da viscosidade da água de produção trabalhada pode ser visto na Figura 12, quando foi utilizado o equipamento viscosímetro, para tal fim.

Figura 12. Equipamento viscosímetro utilizado para análises de viscosidade das amostras de água de produção obtidas no GEOAMB/UFBA



Fonte: Autora (2018)

### 3.2.1.2 *Massa Específica*

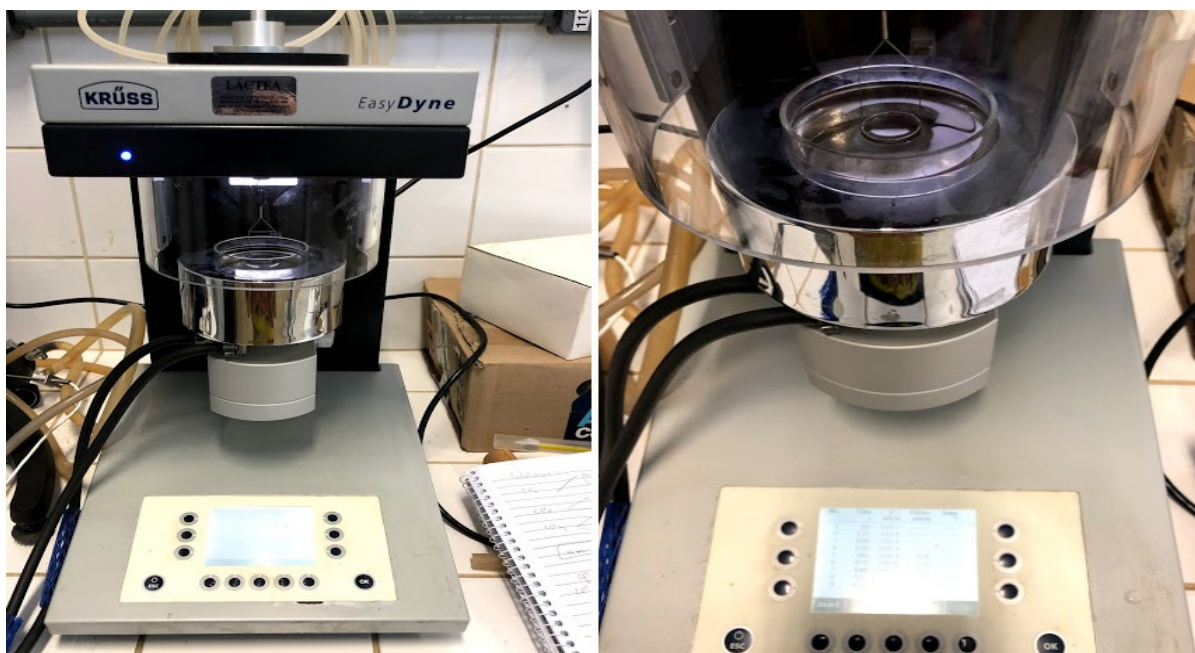
A massa específica da água de produção utilizada nos experimentos foi aferida, à temperatura de 20 °C, por meio de um tensiômetro de bancada (Modelo EasyDyne, Kruss), o qual permite a realização da medida de massa específica simultaneamente à medição de tensão superficial do fluido.

### 3.2.1.3 *Tensão Superficial*

A tensão superficial do fluido foi aferida no GEOAMB/ UFBA, com o uso de um tensiômetro de bancada (Modelo EasyDyne, Kruss) acoplado a um banho térmico (Modelo TC-550, Brookfield, USA) para controle da temperatura. As análises foram realizadas nas temperaturas de 20°C, 30°C e 40°C. As temperaturas dos fluidos foram checadas utilizando-se um Alicata Amperímetro (True-RMS Fluke 323, Fluke).

Para a determinação da tensão superficial empregou-se o método do anel (*Du Nouy*), normatizado pela ASTM D971-12, que consiste na utilização um anel de platina, por ser quimicamente inerte, para a medida da força de contato do mesmo com o líquido analisado. A Figura 13 ilustra parte do ensaio de medição da tensão superficial da água de produção, com utilização de equipamento empregado para aferição dessa tensão.

Figura 13. Equipamento utilizado para aferição da tensão superficial da água de produção analisada no presente trabalho



Fonte: Autora (2019)

#### 3.2.1.4 Condutividade Elétrica, pH e Salinidade.

Esses parâmetros foram medidos no LEPETRO/IGEO/UFBA através de um medidor multiparâmetros, da HANNA instruments (modelo HI5521). Inicialmente o eletrodo para medição de pH foi inserido em um becker contendo a água de produção (Figura 15) e, após estabilização da medição, o valor de pH foi aferido na



tela do aparelho. Para a medição da condutividade elétrica e da salinidade, outro eletrodo foi inserido no becker com a amostra do fluido, permitindo a leitura desses parâmetros.

Figura 14. Visualização de parte do processo de medição de pH da água de produção analisada neste trabalho, com utilização de equipamento empregado com essa finalidade



Fonte: Autora (2018)

### 3.2.1.5 Concentração de HTP na água de produção sintética

A extração de HTP foi realizada pela técnica de extração líquido/líquido, conforme o método EPA 3510C, desenvolvido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA).

Essa análise foi realizada em triplicata, para obtenção de resultados mais confiáveis. Alíquotas de 700mL da água de produção foram retiradas do tanque de armazenamento, no GEOAMB/UFBA, armazenadas em frascos de vidro e posteriormente levadas para a realização da extração no LEPETRO/IGEO/UFBA.

Cada amostra foi inserida em um funil de extração com torneira, com capacidade de 1000mL, para realização da filtração (na Figura 14 podem ser observadas fases desse procedimento de filtração). Inicialmente cada espécime foi misturada com 30mL de Diclorometano (DCM). O funil de extração foi agitado por 3 min, e, após a agitação esperou-se a divisão da fase orgânica da fase aquosa, sendo aberta a torneira para filtrar a fase orgânica em um funil contendo algodão e sulfato de sódio, que foi posteriormente colocado sobre um balão para recolhimento do material filtrado. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, totalizando uma mistura de cada amostra com 90mL de DCM. Após esse processo, o balão contendo o filtrado das amostras, foi concentrado em um rotaevaporador. O volume resultante no balão foi transferido para um *vial*, de massa conhecida, com capacidade de 2mL, o qual passou por processo de secagem, com auxílio de jato de nitrogênio, sendo posteriormente pesado, avolumado com 0,5mL de DCM.

Figura 15. Etapas da extração de HTP da água de produção utilizada na presente pesquisa



Fonte: Autora (2018)

Na sequência do procedimento analítico realizou-se a leitura de concentração de HTP dos extratos em um cromatógrafo a gás com detector de ionização por chama (CG/DIC).

### 3.2.1.6 Análise Microbiológica

#### 3.2.1.6.1 Cultivo e contagem de bactérias

As análises foram realizadas em triplicata. Optou-se por não empregar procedimentos de diluição nem filtração, devido as características do fluido analisado, como a alta salinidade, o que possibilitou a obtenção de unidades quantificáveis de microrganismos sem realização da diluição seriada. Dessa forma quatro alíquotas de 10 $\mu$ L do fluido foram vertidas para uma placa de Petri contendo meio de cultivo Agar Nutriente.

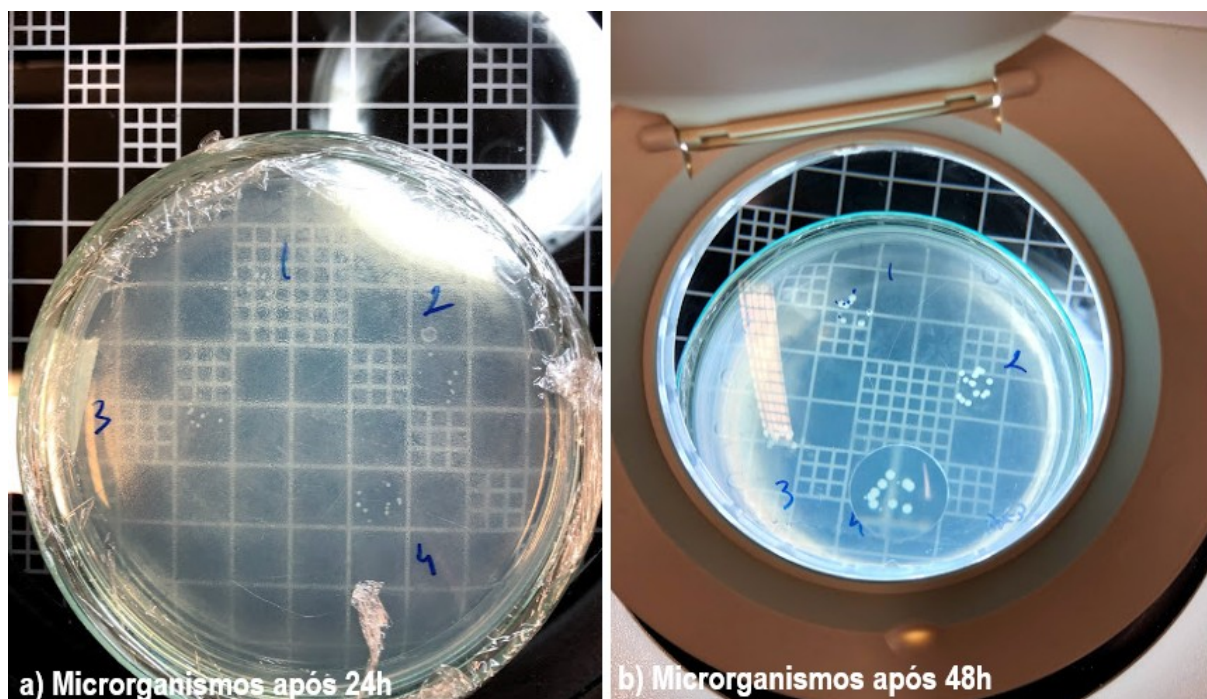
A contagem foi realizada conforme a mesma metodologia aplicada para a contagem de UFC no solo. Parte do procedimento adotado para o cultivo das bactérias da água de produção na fase de caracterização pode ser visto na Figura 16. A Figura 17 apresenta a evolução dos microrganismos da água de produção após 24h e 48h de incubação.

Figura 16. Foto exemplificando parte dos procedimentos adotados para o cultivo de bactérias da água de produção ensaiada



Fonte: Autora (2019)

Figura 17. Visualização de parte do processo de contagem de bactérias da água de produção ensaiada

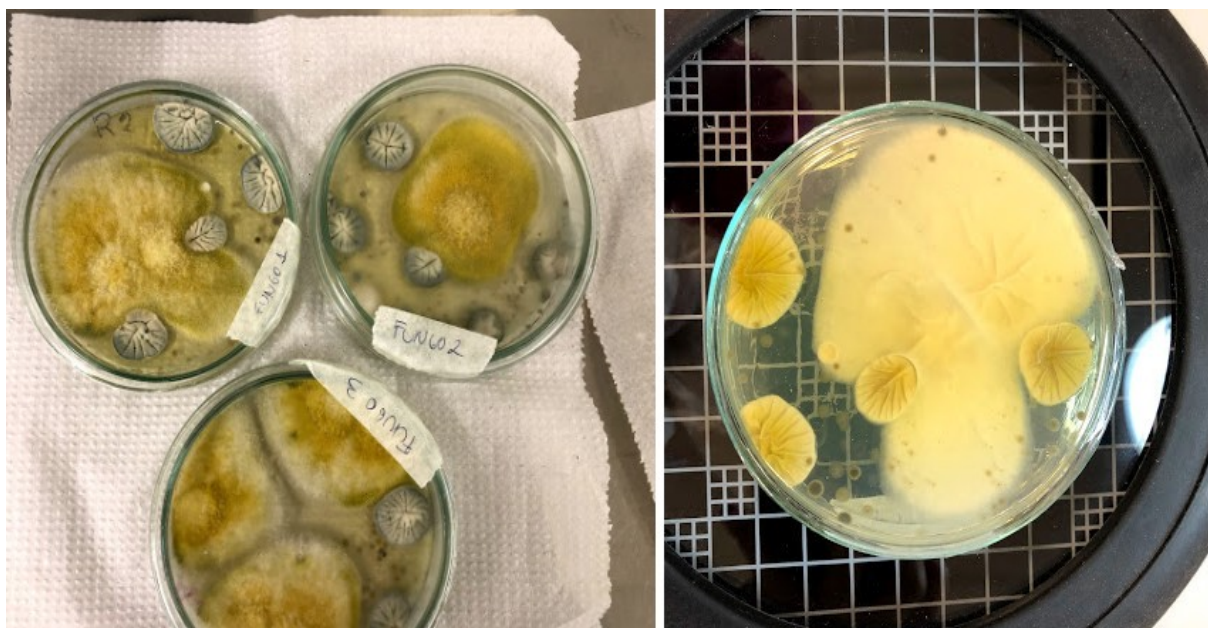


Fonte: Autora (2019)

#### 3.2.1.6.2 Cultivo e contagem de fungos

Devido as características do fluido, como a alta salinidade, optou-se por não realizar procedimentos de diluição nem filtragem, sendo vertido 1mL do fluido para cada uma das três placas de Petri. Posteriormente, transferiu-se para cada placa o meio de cultivo Ágar Sabouraud (método Pour Plate), seguindo-se o mesmo procedimento realizado no cultivo de fungos no solo. Os fungos obtidos na caracterização da água de produção sintética, após incubação durante 7 dias, podem ser visto na Figura 18.

Figura 18. Fungos cultivados em placas, obtidos da água de produção, durante a etapa de caracterização



Fonte: Autora (2019)

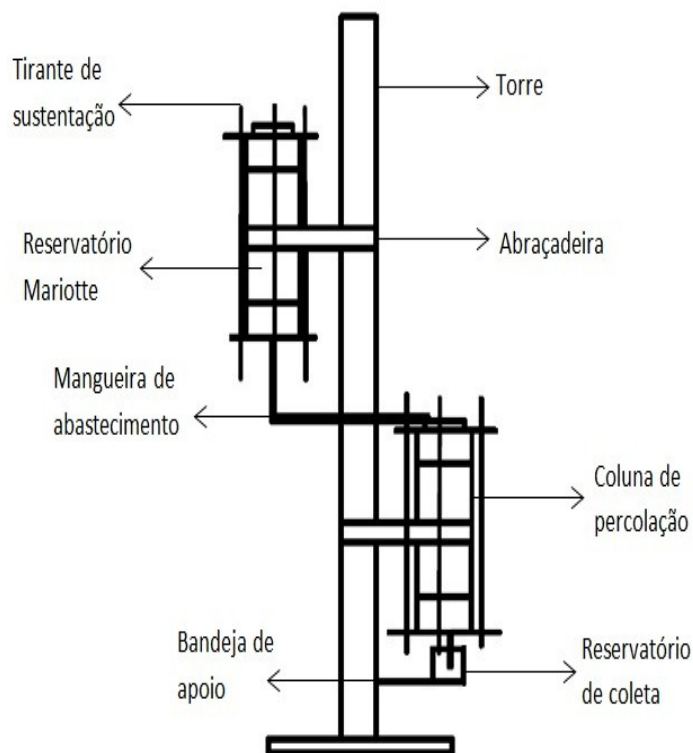
### 3.3 ENSAIOS DE COLUNA

Para propiciar uma melhor comparação dos resultados obtidos nos ensaio de coluna e nas análises microbiológicas, adotou-se a realização de 4 ensaios simultâneos. Três ensaios constituídos pela percolação da água de produção sintética em colunas de solo e um experimento de controle, com a percolação de água destilada. Todas as etapas necessárias para a execução desses ensaios serão descritas detalhadamente nos subitens a seguir.

#### 3.3.1 Constituintes do Equipamento

A montagem experimental dos ensaios de coluna adotados neste trabalho, consistiu em um sistema composto por torre, reservatório e colunas de percolação, estrutura apresentada na Figura 19. Esse sistema foi semelhante àquele utilizado em ensaios de coluna desenvolvidos anteriormente no GEOAMB/UFBA.

Figura 19. Estrutura da montagem do ensaio de coluna utilizado neste trabalho para percolação de fluidos em colunas de solo



Fonte: Autora (2018)

Cada parte constituinte do equipamento é descrita e apresentada nos subitens seguintes:

### 3.3.1.1 Torre

Essa parte do equipamento, apresentada na Figura 20, é responsável pela sustentação do permeâmetro. É formada por uma base retangular de aço, com lados de 70cm, e uma haste tubular soldada no centro da base, de diâmetro igual a 50mm. A haste serve para a fixação da abraçadeira do corpo de prova e da bandeja de apoio.

Figura 20. Visualização da torre do equipamento do ensaio de coluna utilizado neste trabalho



Fonte: Autora (2018)

### 3.3.1.2 Reservatórios

Inicialmente, adotou-se dois reservatórios do tipo Mariotte (um para os corpos de prova, a serem percolados com a água de produção, e outro para o corpo de prova de controle, percolado com água destilada). Esses reservatórios possuem por função o abastecimento do ensaio e o controle da carga hidráulica constante no topo do corpo de prova. Para evitar a absorção das partículas de óleo pela parede do reservatório abastecido com a água de produção, optou-se por impregnar as paredes internas do mesmo com uma camada de óleo bruto. A Figura 21 apresenta os reservatórios empregados na fase inicial desta pesquisa.

Figura 21. Fotos apresentando os reservatórios dos ensaios de coluna empregados na fase inicial deste trabalho



Fonte: Autora (2019)

### 3.3.1.3 Colunas de percolação

As colunas de percolação (Figura 22) consistem em colunas de aço inox com dimensões de 40cm de comprimento, 21,9cm diâmetro e 3,76mm de espessura de parede, acopladas a cabeçotes em alumínio (Figura 23) superior e inferior, os quais proporcionam a vedação das colunas, o abastecimento com a água de produção contida no reservatório e a saída do fluido percolado.

Para que não fossem criados caminhos preferenciais de fluxo (a qual já é dificultada pelo fato de a amostra ser compactada na própria coluna), optou-se por revestir a parede interna das colunas metálicas com aplicação de resina (adesivo estrutural de base epóxi) e uma camada de areia, a qual foi calcinada em mufla a 600°C por 6h para eliminação de prováveis microrganismos existentes, propiciando



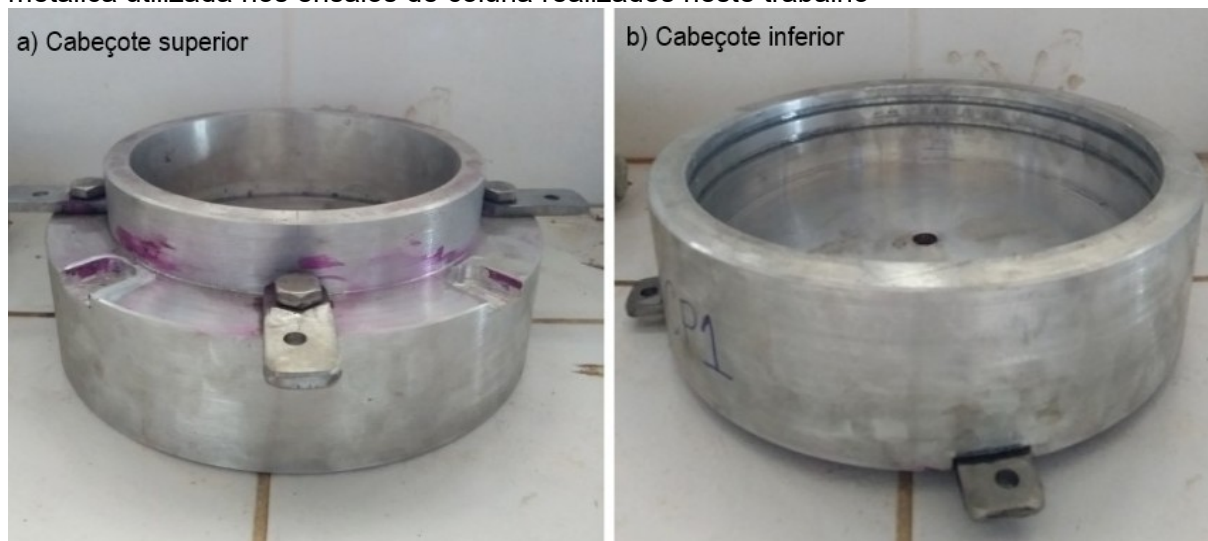
uma maior rugosidade da superfície e melhor aderência e compatibilidade química da mesma com o solo compactado.

Figura 22. Visualização das colunas metálicas para montagem do ensaio de coluna realizado neste trabalho



Fonte: Autora (2018)

Figura 23. Visualização dos cabeçotes, superior e inferior, para acoplamento na coluna metálica utilizada nos ensaios de coluna realizados neste trabalho



Fonte: Autora (2018)

### 3.3.2 Compactação dos Corpos de Prova

A compactação dos corpos de prova dos ensaios de coluna foi realizada conforme os resultados de umidade ótima e massa específica seca máxima, obtidos no ensaio de compactação, na energia do Proctor Normal.

A massa de solo correspondente a cada corpo de prova foi umidificada com 1% acima da umidade ótima, para compensar as perdas de umidade devido ao manuseio e mistura do solo, e inserida em sacos para homogeneização da umidade pelo período de 24h. Após esse tempo, a umidade do solo foi verificada, avaliando-se se a mesma encontrava-se dentro do intervalo de  $\pm 1\%$  com relação a umidade ótima. Após a constatação da obtenção de valores dentro desse intervalo, prosseguiu-se com os procedimentos de compactação.

O tubo de aço inox foi empregado como molde do corpo de prova, sendo encaixado no cabeçote inferior. Para impedir que partículas finas se desprendessem do corpo de prova durante o processo de fluxo e a fim de permitir a melhor percolação do mesmo, evitando-se o seu acúmulo na base da coluna, inseriu-se

uma fina camada de pedrisco no cabeçote inferior, e superior a essa camada foi acoplado um filtro de geotêxtil.

Uma massa de solo equivalente a primeira camada foi disposta no interior da coluna, sendo então nivelada, submetida aos golpes e escarificada para otimizar a aderência entre as camadas. Os golpes foram dados com uso de soquete com altura de queda 45cm e peso de 4,50kgf. O procedimento foi repetido até findar a confecção dos corpos de prova, os quais foram vedados com filme plástico para evitar a perda de umidade. A Tabela 2 apresenta os dados da compactação, e a Figura 24 mostra parte das etapas do procedimento de compactação dos corpos de prova.

Tabela 2 . Dados de compactação dos corpos de prova de solo várzea

Energia de Compactação (Kgf.cm/cm <sup>3</sup> )	Massa por Camada (Kg)	Número de camadas	Número Golpes por camada
5,95	1,82	15	27

Fonte: Autora (2019)

Figura 24. Visualização de parte das etapas de compactação dos corpos de prova realizados para os ensaios de coluna



Fonte: Autora (2019)

### 3.3.3 Montagem do experimento

Após a compactação, os corpos de prova (CPs) foram fixados nas torres de sustentação. Inicialmente, com a proposta de utilização dos reservatórios do tipo Mariotte, realizou-se uma escavação com altura de 3cm no topo de cada CP, permitindo o acoplamento no cabeçote superior de um anel biselado com conexão para a mangueira de saída dos reservatórios, com o objetivo de se manter o nível de fluido constante de 3cm sobre cada corpo de prova de acordo com o princípio de tubo de Mariotte. Para vedação dos espaços vazios existentes entre o topo do corpo de prova e o encaixe do cabeçote superior, aplicou-se uma quantidade de massa de bentonita, suficiente para evitar vazamentos. A aplicação da bentonita é exibida na Figura 25. As etapas de montagem das colunas descritas acima podem ser vista na Figura 26.

Figura 25. Visualização do processo de aplicação de bentonita para vedação do espaço entre topo do CP e cabeçote superior das colunas



Fonte: Autora (2019)

Figura 26. Visualização do encaixe do cabeçote superior e do anel biselado com entrada para a mangueira dos reservatórios



Fonte: Autora (2019)

Para evitar a evaporação do fluido sobre os corpos de prova, os mesmos tiveram os topos vedados com papel filme. Os corpos de prova a serem percolados com o fluido oleoso tiveram as entradas do anel biselado, encaixado sobre o cabeçote superior, interligadas às mangueiras provenientes das saídas do reservatório contendo a água de produção estudada. Já o corpo de prova do experimento controle, teve a entrada do anel interligada ao reservatório abastecido com água destilada.

Nos cabeçotes inferiores de cada corpo de prova foram interligadas mangueiras de pequeno diâmetro, as quais possibilitaram a saída do fluido percolado para frascos de coleta de aproximadamente 250cm<sup>3</sup> de volume. A montagem do ensaio de coluna pode ser vista na Figura 27.

Figura 27. Visualização da montagem inicial dos ensaios de coluna dos experimentos deste trabalho



Fonte: Autora (2019)

Realizada a montagem das colunas nas torres e a abertura das mangueiras para a alimentação do sistema com os fluidos contidos nos reservatórios empregados, verificou-se que após um período de 15 dias as variações de fluidos nos dois reservatórios utilizados mantiveram-se aproximadamente nulas, o que acarretaria um tempo muito longo de ensaio.

Como alternativa, para acelerar a percolação propiciando o aumento da carga hidráulica no sistema, optou-se por realizar adaptações de tampas metálicas para as colunas, conforme ilustrado na Figura 28, que permitissem a aplicação de pressão de ar nos reservatórios de entrada. As tampas metálicas possuíam *o'rings* nas cavas internas para proporcionar a vedação das colunas, além de encaixes para hastes metálicas que foram interligadas entre a tampa e o cabeçote inferior, possibilitando a fixação das tampas e a melhor vedação das colunas.

Figura 28. Visualização da tampa metálica encaixada na coluna de percolação de fluido utilizada neste trabalho



Além dessas mudanças, o novo sistema acarretou o uso de novos reservatórios, os quais eram constituídos de acrílico, com dimensões de 63mm de diâmetro, 500mm de comprimento e espessura de 4mm, possibilitando o armazenamento de cerca de 1558cm<sup>3</sup> de fluido percolante. Uma escala milimétrica colada na parede externa do reservatório, possibilitou as medidas de variações de volume.

Os três reservatórios a serem abastecidos com a água de produção tiveram suas paredes internas impregnadas com óleo cru, de forma a evitar a absorção dos hidrocarbonetos presentes na mesma. A vedação dos reservatórios foi propiciada pelo uso de uma tampa inferior, metálica, com *oring* na cava interna e um orifício de saída para o fluido, o qual foi conectado na entrada central para o corpo de prova, existente na tampa metálica da coluna, além do encaixe de uma tampa superior do reservatório com um orifício de entrada de linha de pressão e uma válvula de alívio. Os detalhes descritos dos reservatórios podem ser vistos na Figura 29. A montagem do novo sistema para emprego dos ensaios de coluna é apresentado na Figura 30.

Figura 29. Visualização de detalhes do reservatório dos fluidos utilizados nos ensaios de coluna deste trabalho



Fonte: Autora (2019)



Figura 30. Visualização da montagem final do experimento dos ensaios de coluna



Fonte: Autora (2019)

#### 3.3.4 Execução das análises dos ensaios de coluna

Após a montagem do novo aparato experimental, iniciou-se o ensaio com o abastecimento dos reservatórios. A altura da coluna do fluido, em cada reservatório, assim como a pressão de ar aplicada, foram monitoradas periodicamente, executando-se o controle da carga hidráulica aplicada e a observação da velocidade de percolação dos fluidos nos corpos de prova.

As cargas de pressão aplicadas variaram de acordo com a taxa de infiltração detectada para cada coluna durante o experimento, de forma a manter a velocidade de saída do fluido entre  $10^{-7}$  e  $10^{-6}$  cm/s, taxas que possibilitaram a execução do ensaio em tempo hábil, com a obtenção de coletas de aproximadamente 250mL de fluido percolado em um período de 3 a 4 dias.

O cálculo de permeabilidade foi realizado aplicando-se a Lei de Darcy, considerando-se a carga hidráulica constante, devido as diferenças de carga advindas das variações dos níveis de fluido nos reservatórios, serem muito pequenas com relação a carga total do sistema. O gradiente hidráulico ( $i$ ) foi determinado conforme a Equação 10:

$$i = \frac{P+H+L}{L} \quad (10)$$

Onde:

$P$  = Carga de pressão aplicada em altura de coluna dá água (L);

$H$  = Nível de água no reservatório (L);

$L$  = Comprimento da coluna de solo (L).

O fluido percolado nos quatro ensaios de coluna, foi coletado em frascos de vidro de 250mL, que podem ser vistos na Figura 31. Esses frascos foram devidamente identificados com o número do corpo de prova e a data de coleta.

Posteriormente, os vasos com fluidos coletados foram refrigerados em geladeira (6°C) até serem submetidos ao processo de quantificação do teor de HTP, no LEPETRO/IGEO/UFBA, através de extração líquida em volumes de aproximadamente 500mL da água de produção coletada, ou seja, volume proveniente de duas coletas consecutivas. Para a averiguação dos valores de concentração inicial ( $C_0$ ) realizou-se a retirada de amostras de fluido, diretamente dos reservatórios durante procedimento de reabastecimento, as quais foram também submetidas a quantificação do teor de HTP.

Figura 31. Visualização de parte da coleta do fluido percolado das colunas, armazenados em vasos de 250mL



Fonte: Autora (2019)

A extração de HTP seguiu o método MEA003 desenvolvido pelo LEPETRO/IGEO/UFBA. Esse método consiste na mistura em funil de extração, da amostra de fluido com 100mL de Diclorometano, seguido de agitação durante 3min. Após a agitação, espera-se a separação de fases e a mistura é filtrada em um funil sobre um balão de coleta. Esse processo é repetido mais 3 vezes, com a adição de 40mL de Diclorometano em cada uma delas. Após a finalização da extração, o material contido nos balões é concentrado em rotoevaporador, transferido para *vials* de 2mL, os quais são submetidos a secagem e depois avolumados. Os extratos têm suas concentrações de HTP lidas em cromatógrafo a gás.

Durante as extrações notou-se a presença de emulsão contendo material argiloso nos fluidos percolados, o que pode ser verificado na Figura 32. A Figura 33 apresenta uma comparação de emulsões obtidas durante a extração de água

destilada coletada do corpo de prova controle e de água de produção coletada de um dos corpos prova, onde se pode observar a diferença de tonalização das duas emulsões, ocasionada pela forte presença de material argiloso carregado nos corpos de prova percoladas com a AP.

Figura 32. Visualização de parte do processo de obtenção de emulsão formada durante extração de fase oleosa de fluido percolado nas colunas de solo várzea



Fonte: Autora (2019)

Figura 33. Visualização de emulsões formadas para diferentes corpos de prova durante extração líquido/líquido dos fluidos de percolação



Fonte: Autora (2019)

Outro fator relevante que foi notado durante a realização dos ensaios de coluna foi a variação nas taxas de percolação, as quais tenderam a reduzir com o passar do tempo dos ensaios, o que acarretou o emprego de aumentos de pressões durante todo o experimento.

Foi perceptível a mudança de coloração nos fluidos percolados contidos nos vasos de coleta. A Figura 34 apresenta frascos com fluido percolado, em ordem crescente de tempos de coleta. Nesses vasos pôde-se observar a deposição de partículas finas de solo no fundo. A coluna 3 (CP3) possuiu um atraso na percolação com relação às outras colunas de solo, apesar de todas terem sido compactadas na mesma energia de compactação, além de que, desde o primeiro volume coletado

nesse corpo de prova, percebeu-se a presença de partículas no fundo do mesmo (Figura 35).

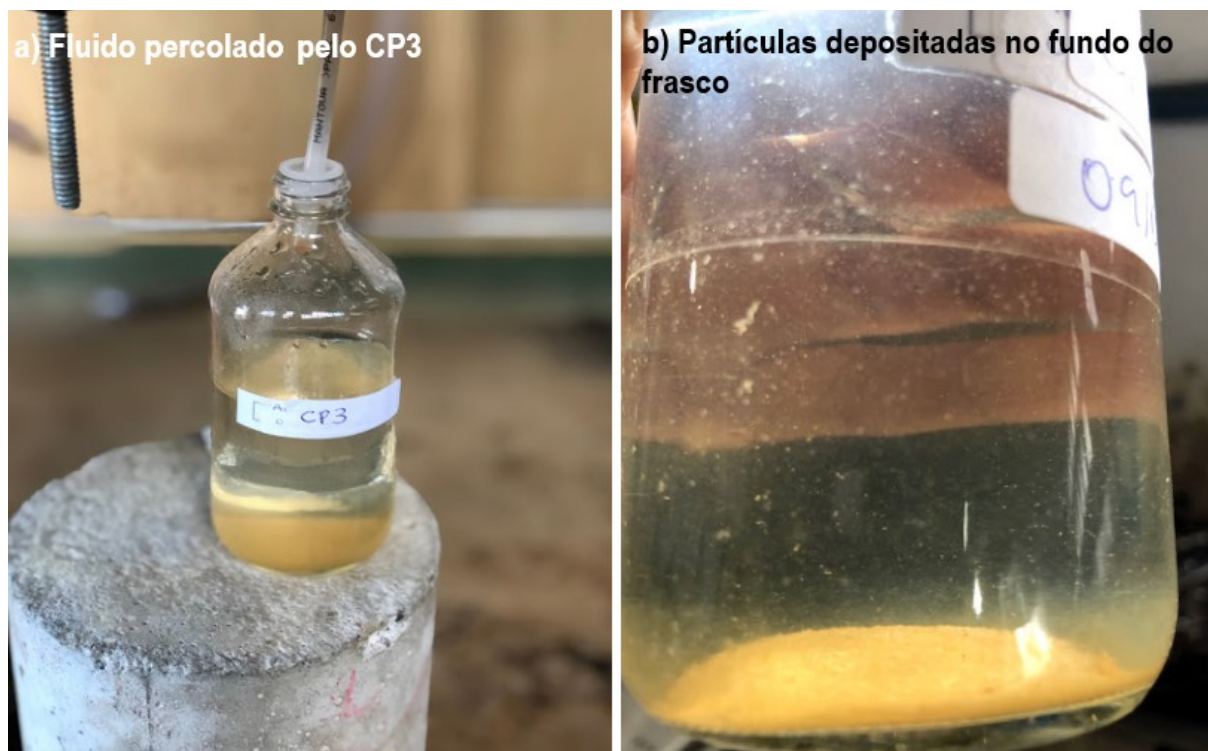
A presença de material nos volumes percolados pode ser associado ao fenômeno de dispersão das argilas, o que proporciona a obstrução dos poros do solo e, conseqüentemente, a redução das taxas de infiltração detectadas durante todo o ensaio.

Figura 34. Visualização na mudança de coloração no fluido percolado em coluna de solo várzea



Fonte: Autora (2019)

Figura 35. Visualização de fluido percolado pelo CP3, onde nota-se a presença de partículas depositadas no fundo do frasco de armazenamento



Fonte: Autora (2019)

Os ensaios de coluna foram finalizados após a obtenção da estabilização da concentração de HTP da água de produção ensaiada no reservatório de entrada e de saída (estabilização dos valores de  $C/C_0$ ).

#### 3.3.4.1 Determinação dos Parâmetros de Interesse do Ensaio de Coluna

A curva de chegada e os parâmetros de migração de contaminante foram determinados em função dos valores de concentração de HTP identificados nas amostras de fluido coletadas ( $C$ ) e da concentração inicial do fluido contido nos reservatórios ( $C_0$ ), do tempo das coletas, e do volume de poros percolados acumulados.

Os resultados obtidos foram plotados na forma de  $C/C_0$  (concentração no reservatório de coleta/concentração inicial), versus número de volumes de poros percolados ( $V_p$ ) ou tempo ( $t$ ).

A modelagem das curvas de chegada consistiu na aplicação da forma incremental da Equação 2 (item 2.6.1- Modelagem da curva de chegada), devido as variações de velocidades detectadas durante a realização dos ensaios de coluna e as taxas variáveis de decaimentos observadas através da plotagem dos dados coletados.

#### *3.3.4.2 Amostras de solo para análises microbiológicas*

Amostras de aproximadamente 200g de solo foram retiradas nos intervalos de 1, 15, 30, e 60 dias após a finalização de cada ensaio de coluna para a realização de ensaios microbiológicos. A Tabela 3 apresenta os procedimentos de análise microbiológicas realizados em cada tipo de amostra obtida:



Tabela 3. Análises microbiológicas para cada tipo de amostra de solo

Tipo de Amostra	Tempos de coleta	Análises microbiológicas
Solo coletado do CP1, CP2, CP3, CP4	T0 (após 1 dia de finalização do ensaio de coluna)	-Cultivo e contagem de microrganismos, isolamento, teste de oxidação e análise de genética dos microrganismos aprovados. -Análise genética do microbioma (metagenômica) em amostra global de solo.
Solo coletado do CP1, CP2, CP3, CP4	T1 (após 15 dias de finalização do ensaio de coluna) T2 (após 30 dias de finalização do ensaio de coluna)	-Cultivo e contagem de microrganismos
Solo coletado do CP1, CP2, CP3, CP4	T3 (após 60 dias de finalização do ensaio de coluna)	-Cultivo e contagem de microrganismos. -Análise genética do microbioma (metagenômica) de amostras individuais de cada corpo de prova.

Fonte: Autora (2019)

Para a coleta das amostras de solo de cada coluna, utilizou-se um coletor de amostras indeformadas construído em aço inoxidável, de paredes finas e base biselada, com 50mm de diâmetro interno. Para cada coleta inseriu-se um revestimento de PVC (*liner*) na parte interna do amostrador. Retirou-se os reservatórios de cada ensaio de coluna, e a tampa superior foi aberta para a retirada das amostras de solo, a qual foi realizada através da cravação do amostrador. Após a coleta das amostras, a coluna foi vedada novamente, com o encaixe da tampa superior e vedação do orifício que dava acesso ao reservatório. As colunas só foram novamente reabertas nos tempos necessários para novas coletas, sendo sempre vedadas após as mesmas.

Na Figura 36 pode ser observado parte do procedimento empregado na retirada de amostras de solo das colunas.

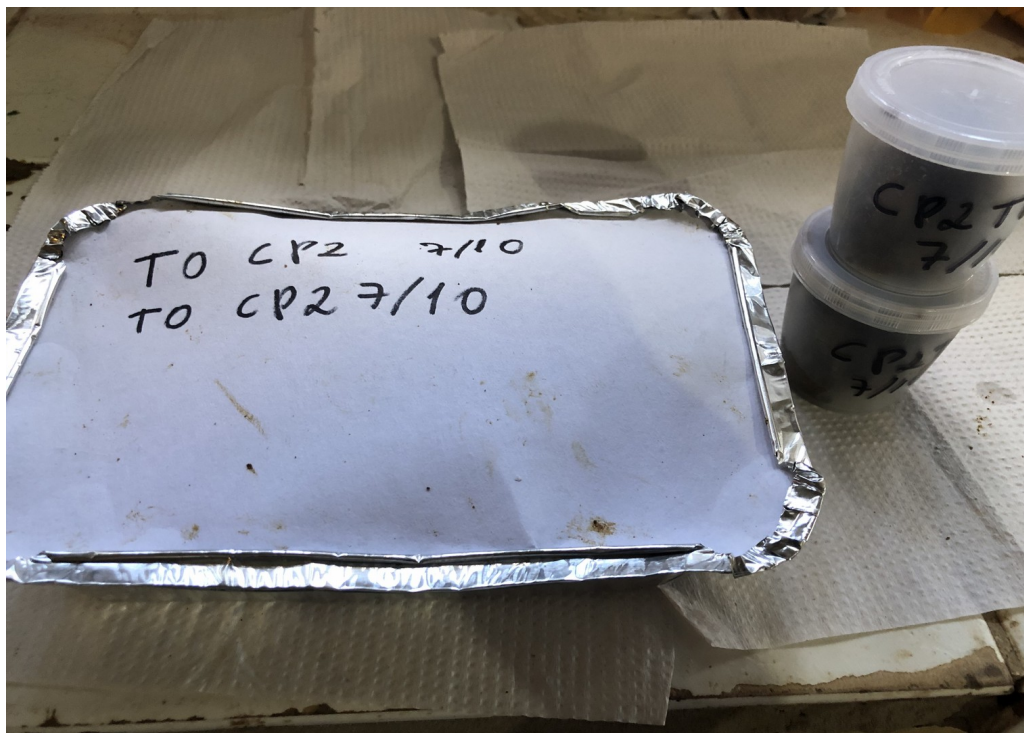
Figura 36. Visualização de parte do procedimento de coleta de amostras das colunas de solo, para análises microbiológicas



Fonte: Autora (2019)

O material coletado foi homogenizado e inserido uma parte em vasos coletores, os quais foram congelados com objetivo de preservar as amostras para realização de análises genéticas do microbioma. Outra parte foi inserida em recipiente de alumínio e mantida preservada durante 24h até que fossem realizadas as análises de caracterização microbiológica. A Figura 37 apresenta como foi realizado o armazenamento dessas amostras.

Figura 37. Visualização dos métodos de armazenamento das amostras de solo para análises microbiológicas



Fonte: Autora (2019)

Os ensaios microbiológicos empregados nas amostras retiradas das colunas, em diferentes tempos, são detalhados nos itens a seguir:

### 3.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS RETIRADAS DAS COLUNAS DE SOLO

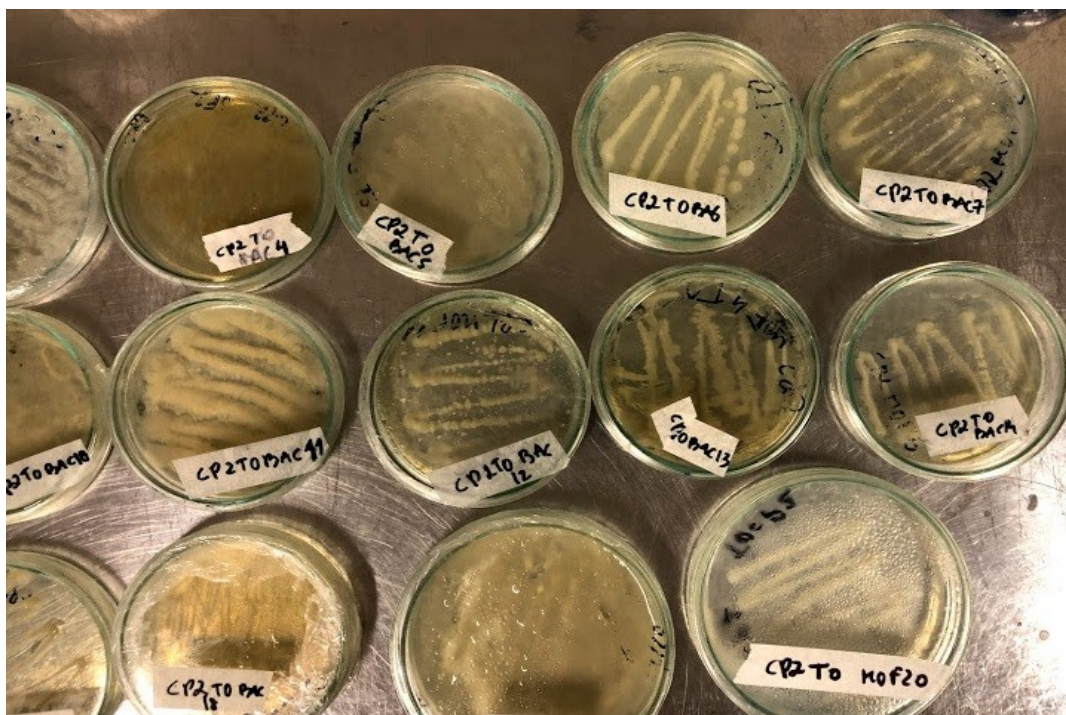
#### 3.4.1 Cultivo, contagem e isolamento dos microrganismos

Realizou-se o cultivo e contagem de fungos e bactérias para as amostras retiradas de cada corpo de prova em diferentes tempos (T0, T1, T2, T3), conforme metodologia já detalhada no item 3.1.5 (Análise Microbiológica). Após contagem das unidades formadoras de colônia foi feito o isolamento de cada microrganismo para purificação das culturas.

Inicialmente realizou-se a identificação visual (através da diferenciação de cor e textura) dos diferentes tipos de fungos e bactérias contidas nas placas de cultivo. No isolamento de bactérias o procedimento baseou-se na técnica de esgotamento por estrias, utilizando uma alça de platina para a formação da estria em placa de Petri contendo meio de cultura Agar Nutriente em estado sólido. No isolamento de fungos o repique foi realizado com o auxílio de uma ponteira e a amostra de fungo contida no meio recortado foi inserida em uma placa de Petri contendo meio de cultura Agar Sabouraud em estado sólido. As placas com cada isolado de fungo e bactéria foram identificadas e incubadas à 30°C, durante período de 48h, para bactérias, e 7 dias para fungos. Após incubação, as placas foram armazenadas em geladeira até a realização dos preparos necessários para execução dos testes de oxidação.

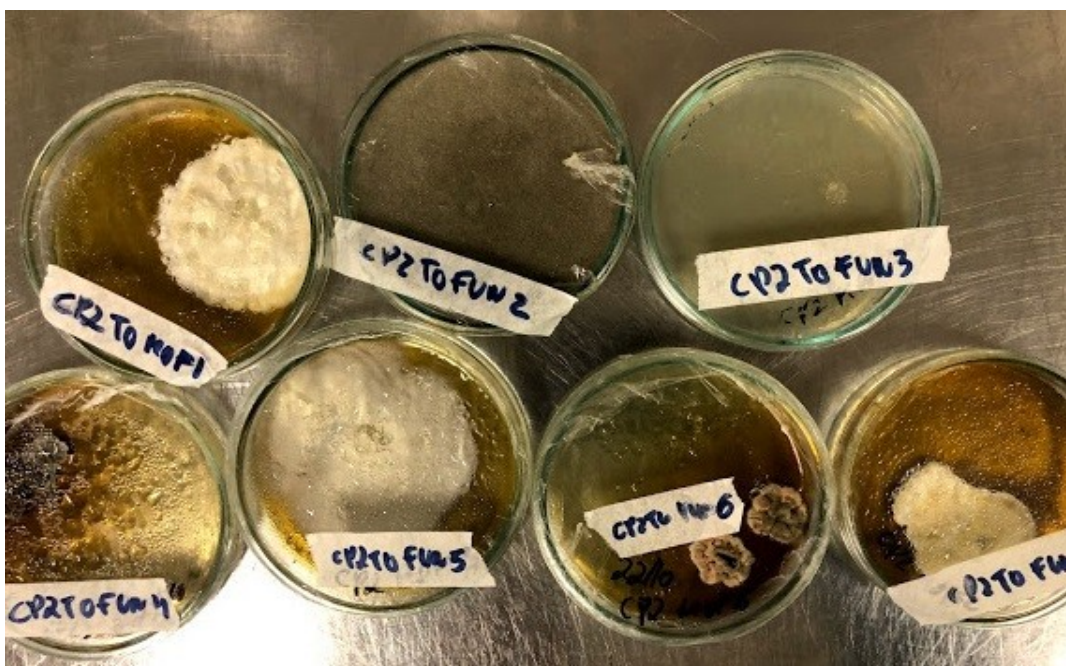
A Figura 38 apresenta algumas bactérias isoladas para um dos corpos de prova e a Figura 39 apresenta fungos isolados para o mesmo CP.

Figura 38. Exemplificação de bactérias isoladas de amostra do CP2 no tempo T0



Fonte: Autora (2020)

Figura 39. Exemplificação de fungos isolados de amostra retirada do CP2 no tempo T0



Fonte: Autora (2020)

Os microrganismos isolados das quatro colunas de solo, provenientes das amostras de solo extraídas no tempo T0 (primeira coleta) foram submetidos a testes de oxidação, para os quais tornou-se necessária a preparação de suspensões microbianas.

O preparo das suspensões microbianas é detalhado por Lima (2014). No presente trabalho, um fragmento de aproximadamente 0,6cm foi recortado de cada placa contendo isolados de fungos e bactérias, utilizando-se uma pipeta de Pauster. Essa amostra foi transferida para um tubo de vidro contendo 5mL de solução salina, o qual passou por agitação, durante período de 24h, em mesa agitadora à 200RPM e à 30°C (Figura 40). Os procedimentos adotados nos testes de oxidação são detalhados no próximo item.

Figura 40. Visualização de soluções microbianas colocadas em mesa agitadora



Fonte: Autora (2020)

### 3.4.2 Testes de oxidação

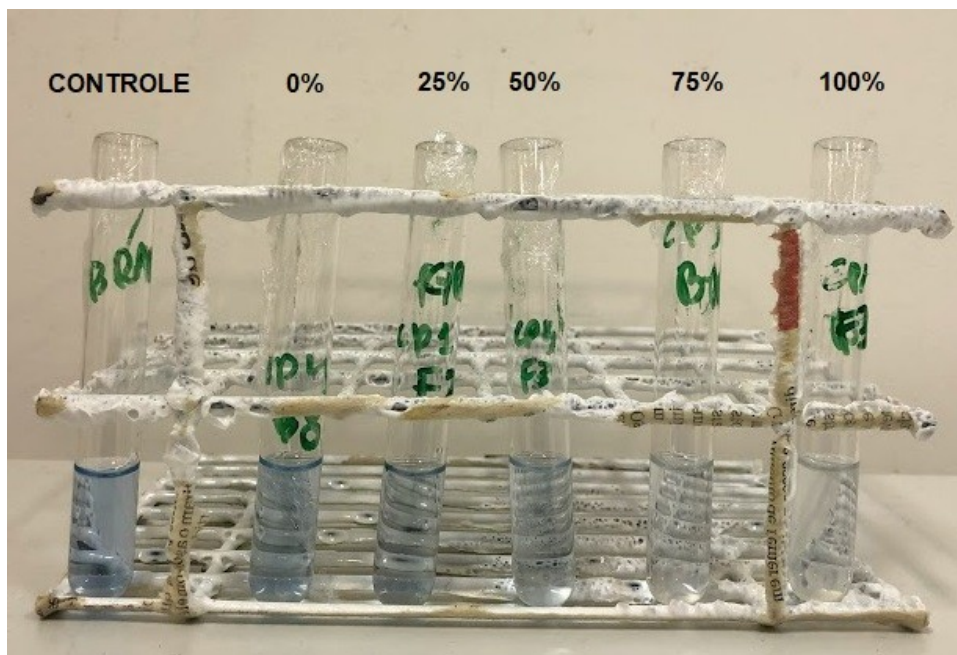
Os testes de oxidação foram realizados para a identificação da potencialidade de degradação da água de produção ensaiada pelos fungos e bactérias isoladas. Esse ensaio foi realizado em duas etapas, conforme procedimento adotado por Lima et al. (2017). Na primeira etapa adicionou-se 250µL de meio Difco TM Bushnell-Haas Broth (BH), somado a 25µL de suspensão microbiana padronizada em 10<sup>8</sup> UFC/mL, mais 10µL da água de produção e mais 5µL do indicador DCPIP, em tubos de vidro. Preparou-se amostras de controle negativo contendo as mesmas soluções, com exceção da suspensão microbiana, para cada análise.

Os tubos contendo as soluções foram incubados por 48 h a 30°C. O indicador utilizado (DCPIP) possui a capacidade de indicar a ocorrência de processo de oxidação microbiana de hidrocarbonetos através de mudança de coloração azul para incolor (DANTAS, 2017). Dessa forma analisou-se as mudanças de coloração de cada solução preparada, através da comparação dos tons obtidos com relação aos controles negativos, classificando a descoloração em porcentagens (25%, 50%, 75% e 100%). A Figura 41 apresenta as diferentes colorações obtidas na primeira fase desse teste.

Os microrganismos que alcançaram classificação acima de 50% de descoloração foram submetidos a segunda fase do teste de oxidação. Na segunda etapa realizou-se a mistura de 74% (1,85mL) de meio BH, 25% (0,625mL) do inóculo, 1% (0,025 mL) de fonte de carbono (água de produção) em tubos de vidro de 5mL, os quais foram submetidos a agitação por 12h a 200rpm em mesa agitadora, a temperatura de 30°C. Após a agitação adicionou-se o indicador redox DCPIP (0,080mL) prosseguindo com a incubação das soluções a 30°C por 24 h.

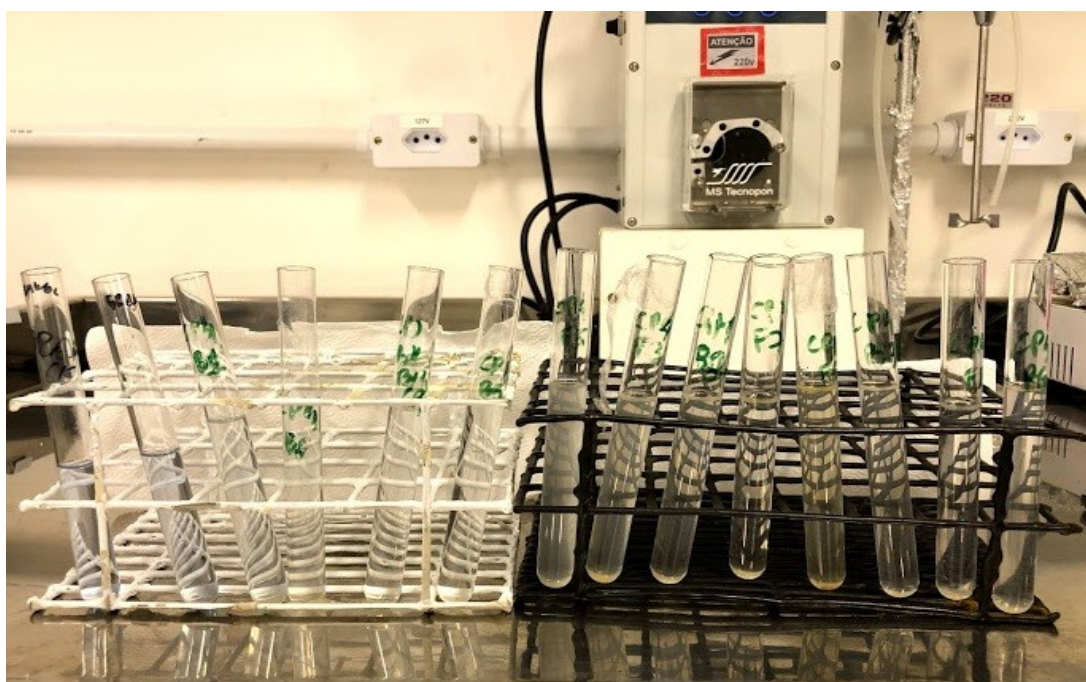
Os resultados de oxidação foram apurados após 12h e 24h da inserção do indicador, classificando a descoloração conforme critério visual e com o auxílio de um espectrofotômetro. A Figura 42 apresenta as variações de coloração obtidas para microrganismos aprovados na segunda fase desse teste.

Figura 41. Visualização das diferentes colorações das amostras na primeira etapa do teste de oxidação



Fonte: Autora (2020)

Figura 42. Visualização das diferentes colorações das amostras na segunda fase do teste de oxidação



Fonte: Autora (2020)



Na primeira fase foram ensaiados 82 microrganismos, dos quais somente 41 apresentaram 100% de descoloração na realização da segunda fase do teste de oxidação, sendo detectados com capacidade de degradar a água de produção ensaiada. Esses fungos e bactérias foram submetidos a análises genéticas para identificação dos gêneros dos mesmos.

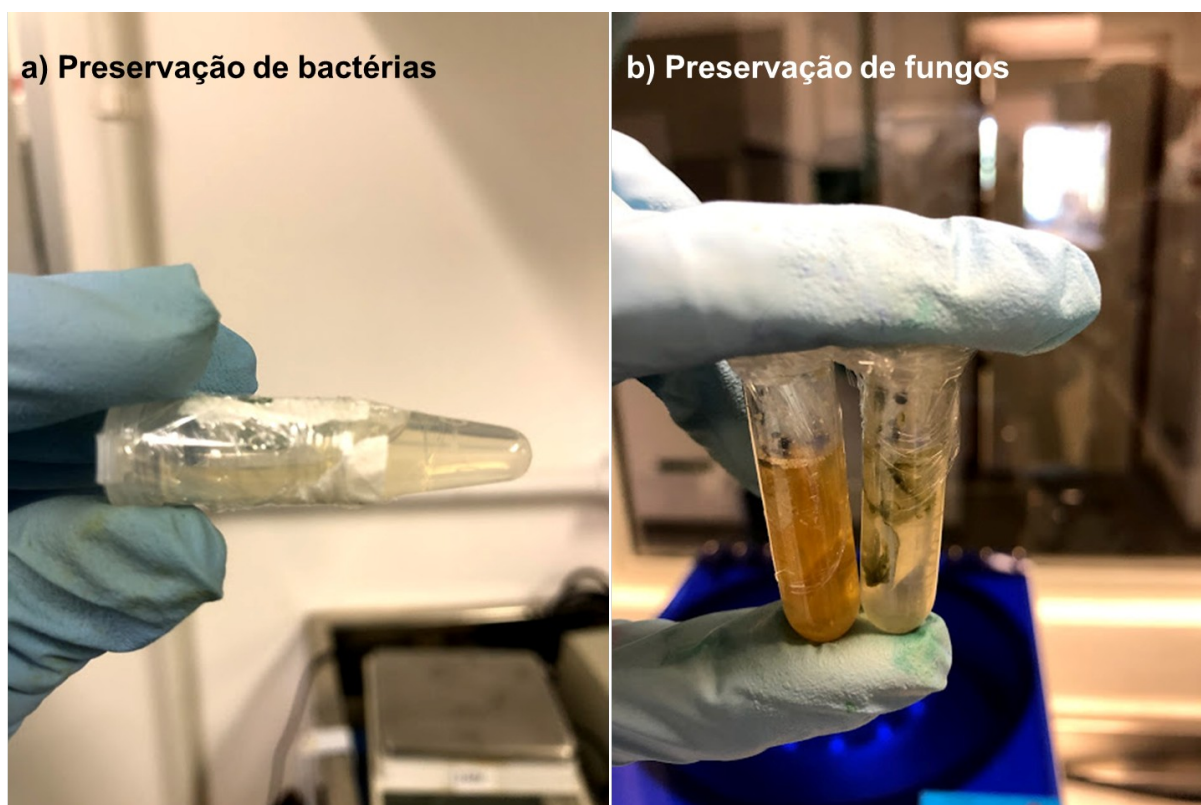
### 3.4.3 Preservação dos Microrganismos

Para que os microrganismos possam ser utilizados em futuras pesquisas, realizaram-se procedimentos para a preservação dos fungos e bactérias detectados como capazes de degradar hidrocarbonetos, conforme resultado obtido na segunda fase do teste de oxidação.

Para a preservação das bactérias utilizou-se método de criopreservação. O meio de cultura ágar nutriente foi vertido em tubos de Eppendorfs de forma inclinada, proporcionando a obtenção de maior área superficial. Em seguida, esses tubos foram submetidos durante 48H a 30°C, em incubadora, a teste de esterilidade. Após esse período, com auxílio de uma alça de platina, semeou-se as cepas através de estrias. Após 48 H de incubação, adicionou-se em cada tubo de Eppendorf 1mL de mistura contendo 1% de glicerol diluído a 10% em água destilada. Os tubos foram envolvidos com filme plástico e submetidos ao congelamento.

Para a preservação dos fungos adotou-se método semelhante ao método de preservação Castellani. Adicionou-se 3 discos de cada micélio em tubos de Eppendorf contendo 1,5mL de água esterilizada. As amostras de fungos foram preservadas em refrigerador a 4°C. A Figura 43 apresenta fases dos métodos de preservação realizados para as bactérias e fungos.

Figura 43. Visualização de parte do processo de preservação dos microrganismos



Fonte: Autora (2020)

#### 3.4.4 Análises genéticas

Nesta fase da pesquisa realizou-se o método de sequenciamento genético, para a identificação dos gêneros/espécies dos 41 microrganismos detectados (22 bactérias e 19 fungos isolados), de acordo com o teste de oxidação, com potencial de degradação de HTP. Além disso, foram realizadas análises metagenômicas para o conhecimento da diversidade microbiológica das amostras de solo criopreservadas retiradas das colunas. As amostras de solo e de microrganismos isolados foram encaminhadas a um laboratório externo de biotecnologia (GoGenetic/ Universidade Federal do Paraná ) para a realização dessas análises. Os procedimentos adotados são detalhados a seguir:

a) Identificação dos isolados

Para a identificação dos 41 microrganismos isolados foi realizado processo de purificação de DNA com o kit UltraClean Tissue and Cells DNA Extraction kit (MoBio). Na amplificação do DNA empregou-se o método convencional de PCR (reação em cadeia da polimerase) com termociclador Veriti (Thermo), em reação contendo 20ng de DNA genômico purificado com sistema GoTaq (Promega). Para a região 16S, foram utilizados 32 ciclos de desnaturação (96°C por 30 seg), anelamento do primers 27F/1492R (60°C por 45 seg) e extensão do produto (72°C por 45 seg). Os produtos foram analisados por eletroforese em agarose 1% (tampão TAE). As reações foram purificadas enzimaticamente com ExoI/SAP (Thermo). No sequenciamento Sanger os produtos de PCR foram marcados com BigDye v3.1 (Thermo), em reação contendo 50ng de DNA. Foram utilizados 35 ciclos de desnaturação (96°C por 15 seg), anelamento do primer (15 seg à 60°C) e extensão do produto (60°C por 4 min) para marcação com terminadores fluorescentes. Os produtos marcados foram precipitados com 20% de acetato de amônio 7,5M e três volumes de etanol absoluto, e re-suspensos em 10µL de HiDi-formamida.

Essas amostras foram sequenciadas em Genetic Analyser 3500xL (Thermo), utilizando capilares de 50cm com polímero Pop7 (Thermo). Os eletroforetogramas gerados foram convertidos em sequência de bases com o programa Sequencing Analysis v5.4 (Thermo). As sequências foram trimadas por qualidade Phred >25, e o assembly feito com programa CAP3. O contig foi comparado com banco de dados nr (NCBI) com o programa BLASTn.

b) Análises metagenômicas de amostras de solo

Nas análises metagenômicas das amostras de solo 20ng de DNA metagenômico foram utilizados como molde para 18 ciclos de amplificação da região V4 do 16SrDNA de bactérias e arqueas, usando os primers 515F e 806R e GoTaq Master Mix (Promega). De forma similar, a região V9 do 18SrDNA de eucariotos foi amplificada com 25 ciclos usando os primers 1389F e EukBR. Os produtos de PCR

foram analisados por eletroforese em agarose 1,5%, e quantificados usando Qubit dsDNA HS kit (Invitrogen). A mistura de 10 pM dos amplicons foi sequenciada com MiSeq Reagent 500V2 (Illumina) em aparelho Illumina MiSeq, gerando sequências de 250 bases. As sequências de DNA foram analisadas usando QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) versão 1.9.2. As sequências foram agrupadas em OTUs (Operational Taxonomic Units) considerando 97% de identidade com o banco de dados de 16S e 18S SILVA 132.

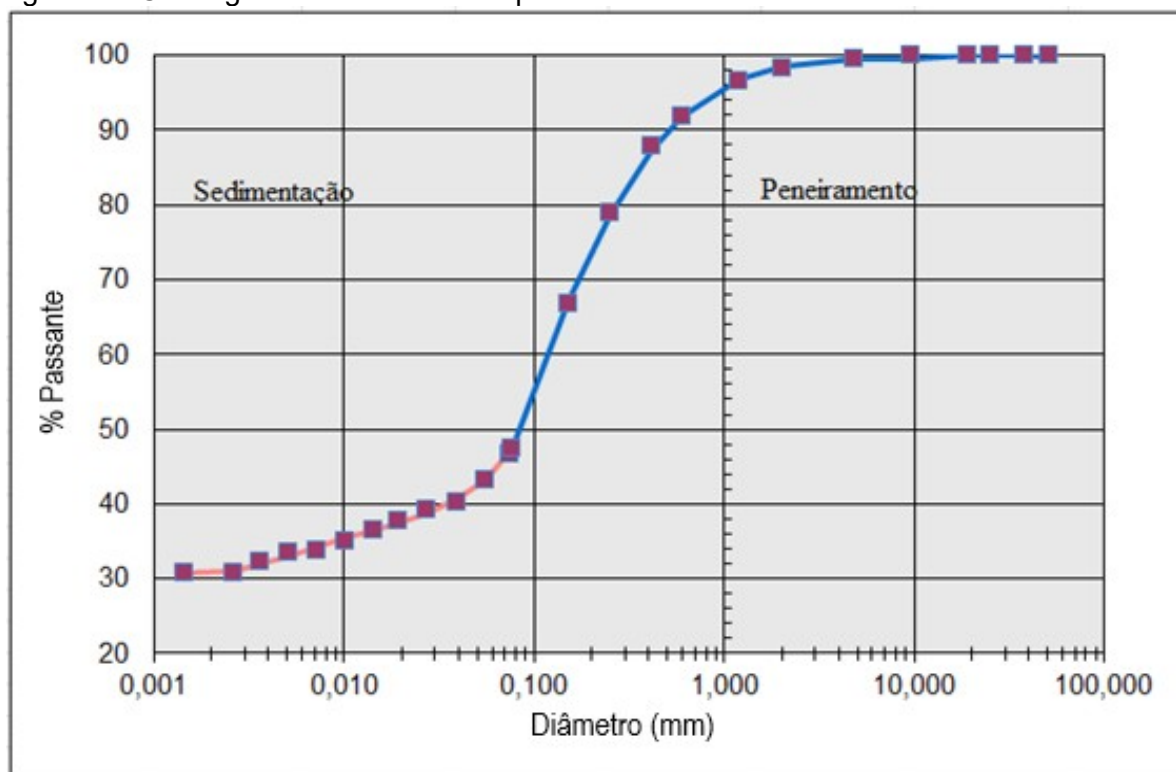
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO

#### 4.1.1 Caracterização Geotécnica

A Figura 44 apresenta a curva granulométrica obtida para o solo várzea. Verificou-se que o mesmo apresenta um alto teor de finos, com mais de 30% de parcela com textura pertencente ao grupo das argilas (partículas com diâmetro inferior a 0,002 mm). A Tabela 4 contém um resumo dos resultados obtidos para os ensaios de caracterização geotécnica do solo, os quais permitiram a classificação do mesmo conforme o sistema SUCS e pela NBR 6502.

Figura 44. Curva granulométrica obtida para o solo em estudo



Fonte: Autora (2019)

Tabela 4. Resumo dos resultados dos ensaios de caracterização geotécnica do solo várzea

Parâmetros	Resultados
$\rho_s$ (g/cm <sup>3</sup> )	2,73
Passante na peneira #200 (0,075mm)	49,00
WL (%)	46
WP (%)	25
IP	21
Ia	0,65
SUCS	SC
NBR 6502	Areia argilo-siltosa com vestígios de pedregulhos

Fonte: Autora (2019)

O conhecimento das propriedades geotécnicas do solo é essencial para a interpretação dos processos de fluxo de substâncias no mesmo. O solo em estudo pôde ser classificado como uma areia argilo-siltosa, ou seja, um material com expressiva presença de partículas finas, o que também é confirmado pelo elevado índice de plasticidade obtido para o mesmo ( $IP > 15$ ). Apesar de o material possuir porcentagem elevada de partículas de argila, verifica-se pelo índice de atividade (Ia) que esse grupo é formado por argilos minerais de baixa atividade, podendo o material ser classificado como inativo ( $Ia < 0,75$ ).

Solos finos apresentam comportamento diferenciado ao serem percolados por fluidos, sendo característico desse tipo de material a obtenção de baixos coeficientes de permeabilidade. Na avaliação de solos que possibilitam o melhor desenvolvimento de microrganismos encontra-se, na literatura, o alerta a aplicação de biorremediação em solos finos, principalmente devido ao fenômeno de sucção, característico das partículas de argila, as quais possuem cargas elétricas desbalanceadas em sua superfície. A sucção da substância percolante por essas partículas proporciona a redução da biodisponibilidade do contaminante. Com relação a permeabilidade, esse tipo de solo é criticado por dificultar a transferência de receptores de elétrons e nutrientes às células microbianas (VIDALI, 2001; GOGOI et al. 2003; MEGHARAJ et al., 2011).

Ressalta-se que nesta pesquisa as colunas de solo foram ensaiadas em estado de saturação, o que ameniza os efeitos da sucção na biodisponibilidade do

contaminante ao ser percolado no solo várzea. Além do mais, apesar de o solo estudado apresentar alto teor de partículas de argila, os solos predominantes nas áreas próximas ao local de coleta, no campo terrestre de exploração de petróleo pertencente a Bacia Potiguar-RN, conforme estudo de Sousa (2018), tratam-se de areias mal graduadas, com menor porcentagem de argila, o que pode permitir, em situações de campo, a melhor aplicação de técnicas de biorremediação nessas áreas.

As características do solo várzea serão consideradas nas análises seguintes e nas interpretações dos processos de fluxo da água de produção no mesmo.

#### 4.1.2 Ensaio de Compactação

A Tabela 5 apresenta os parâmetros ótimos de compactação, os quais foram adotados na confecção das colunas de solo. Na Tabela 6 são apresentados os dados e relações utilizadas no controle de compactação dos corpos de prova.

Tabela 5. Resultados do ensaio de compactação do solo várzea

Energia de Compactação	$W_{opt}$ (%)	$\gamma_{dmax}$ (KN/m <sup>3</sup> )
Proctor Normal	18,08	16,58

Fonte: Autora (2018)

Tabela 6. Parâmetros de controle de compactação

Coluna de solo	W (%)	$\gamma_d$	n	W-W <sub>otm</sub>	$\gamma_d / \gamma_{dmax}$
CP 1	17,04	16,69	0,38	-1,04	1,01
CP 2	19,1	16,60	0,39	1,02	1,00
CP 3	18,4	16,70	0,39	0,27	1,01
CP 4	19,1	16,60	0,39	0,96	1,00

Fonte: Autora (2019)

Conforme os dados apresentados, avalia-se que a variação de umidade das colunas com relação a umidade ótima é baixa, com valores inferiores a 1%. Os corpos de prova 2, 3 e 4 foram compactados em um intervalo um pouco acima da umidade ótima. Apesar da baixa variação, deve-se considerar que solos compactados nesse estado encontram-se no ramo úmido da curva de compactação, o que resulta na obtenção de uma estrutura mais dispersa em comparação ao estado de compactação obtido no ramo seco. Esse tipo de estrutura proporciona um melhor empacotamento das partículas, o que pode influenciar nas propriedades hidráulicas do solo, com obtenção de reduzidas taxas de permeabilidade (MITCHELL, HOOPER e CAMPENELLA, 1965).

Com relação aos graus de compactação ( $G_c = \gamma_d / \gamma_{dmax}$ ), nota-se que todos apresentam-se aproximadamente iguais a 100%, o que indica que foi realizado um bom controle de compactação das colunas de solo, além do alcance de valores próximos de porosidade (n) para todos os corpos de prova. Esses parâmetros permitem a comparação das condições fluxo entre os CPs, já que os mesmos encontram-se dentro de uma mesma condição de compactação.



### 4.1.3 Caracterização Mineralógica

#### 4.1.3.1 FRX

A Tabela 7 contém os resultados obtidos no ensaio de Fluorescência de Raios-X realizado em amostras do solo em estudo. Conforme se pode observar, os elementos mais abundantes são o silício (Si) e o alumínio (Al). O elemento Si é típico em solos, estando presente na constituição das partículas finas e grossas. Também a relativa abundância de Al é característica em argilo-minerais e, portanto, já esperada no solo várzea. Logo, a composição obtida é peculiar ao tipo de material analisado. Vale ressaltar que outros elementos, como o oxigênio e o nitrogênio, não puderam ser detectado nessa análise, por possuírem números atômicos inferiores a 10.

Tabela 7. Concentração de elementos químicos do solo várzea, obtidos por ensaio de FRX

Concentração dos elementos (%)												
Si	Al	Cl	Ca	K	Fe	Co	Ti	Ag	Mo	Th	Se	Mn
27,81	7,21	3,74	3,32	3,12	1,45	1,08	0,54	0,30	0,11	0,10	0,06	0,05

Fonte: Autora (2018)

#### 4.1.3.2 DRX

A Tabela 8 apresenta as porcentagens dos principais componentes do solo obtidos através do ensaio de Difractometria de Raios-X, com predominância de quartzo (silicato), caulinita (argilo mineral) e microlina (feldspato), minerais característicos da formação do solo areno-argiloso em estudo. Tratando-se de argilominerais, ressalta-se que a caulinita possui formação 1:1 (Si:Al), possuindo baixa atividade e baixa superfície específica, o que está de acordo com os resultados obtidos na caracterização geotécnica do solo ( $I_a < 0,75$ ). Detectou-se a presença significativa de material amorfo, sem estrutura cristalina, que pode ser atribuído a presença de matéria orgânica e outros materiais no solo.

Tabela 8. Composição mineralógica do solo várzea obtida por DRX

Composto	(%)
Quartzo	20,36
Caulinita	14,21
Microclina	13,20
Titanita	6,37
Calcita	9,39
Macfalita	1,26
Amorfo	35,20

Fonte: Autora (2018)

#### 4.1.4 Caracterização Físico-Química do Solo

Os resultados obtidos nos ensaios empregados para a caracterização física e química do solo estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados dos ensaios de caracterização física e química do solo várzea estudado neste trabalho

Parâmetros Físicos e Químicos	Resultados
Fósforo assimilável (mg/Kg)	4,45
Nitrogênio Total (%)	1,49
Matéria Orgânica (%)	5,14
pH	8,43

Fonte: Autora (2018)

Os parâmetros físicos e químicos do solo são essenciais para a verificação da existência de condições ambientais propícias ao desenvolvimento microbiológico. Conforme os valores tabelados por Vidali (2001) (ver Tabela 1), os resultados apresentados condizem com aqueles considerados pelo autor como referentes a condições propícias à degradação, como o valor básico do pH e a presença de nutrientes (N e P).

Outra condição detectada no solo e que interfere no desenvolvimento microbiológico é a presença de matéria orgânica. Essa, assim como a parcela de argilominerais, funciona como um suporte geoquímico sólido e adsorvente, com capacidade de concentrar grupos microbianos em sua superfície (MARTINS e PEIXOTO, 2012). De acordo com os resultados obtidos na caracterização físico e química, pode-se considerar o solo várzea como propício ao crescimento de microrganismos, processo que poderá ser favorecido pelo fluxo da água de produção, a qual servirá como fonte de carbono para o desenvolvimento das atividades degradadoras.

#### 4.1.5 Concentração de HTP

A Tabela 10 apresenta a média dos valores obtidos nos ensaios em triplicata, para leitura da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo das amostras de solo. Devido à carência de valores de referências nacionais com relação a concentrações de HTP em solos, baseando-se, como meio consultivo, na lista holandesa de valores de qualidade do solo e da água subterrânea (CETESB, 1999), a qual estabelece para solos contaminados por HTP o valor de referência 50mg/Kg e como valor de interferência 5000mg/Kg, pode-se constatar que foram quantificados baixos valores de concentração desse composto (6,48 ppm) para o solo várzea. Esse resultado já era esperado, pois o solo não se encontrava visivelmente contaminado durante a extração de amostras, no local de origem do material.

Tabela 10. Concentração de HTP do solo várzea utilizado neste trabalho

---

Concentração de HTP (mg/Kg)	6,48
-----------------------------	------

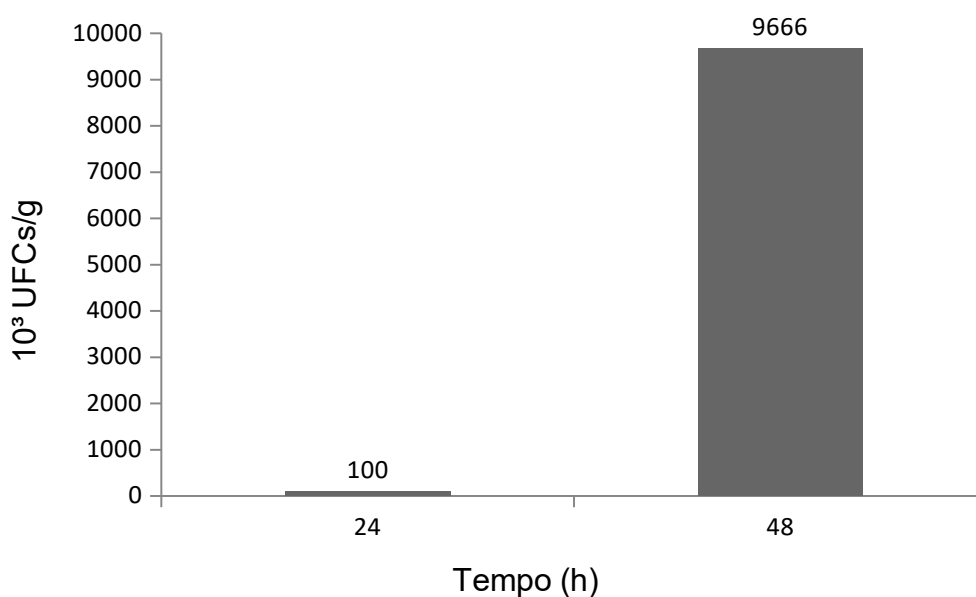
---

Fonte: Autora (2019)

#### 4.1.6 Cultivo e Contagem de Microrganismos

Devido ao grande número de colônias obtidas nas placas com cultivo de fungos do solo, constatou-se a impossibilidade de quantificação das mesmas. No gráfico da Figura 45 é apresentado o número de unidades formadoras de colônias (UFC), determinadas através da contagem realizada em placas com cultivo de bactérias após 24h e 48h de incubação. Observou-se um expressivo crescimento no número de colônias após 48h de incubação.

Figura 45. Representação gráfica da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de bactérias do solo várzea



Fonte: Autora (2019)

Na literatura, a contagem microbiológica de bactérias é padronizada em 24h de incubação (ROMEIRO, 2011). A contagem após 48h foi realizada apenas por questões comparativas de evolução desses microrganismos. A concentração bacteriana em solos propícios ao desenvolvimento de microrganismos, comumente, encontra-se na faixa de  $10^3$  a  $10^7$  UFC/g, estando o valor contabilizado para o solo várzea dentro deste intervalo (SANTOS et al., 2009). O grande número de colônias de fungos obtidas nas placas de cultivo, que impossibilitou a contagem dos mesmos,

indica a predominância desses microrganismos, relativamente às bactérias, na fase de caracterização do solo várzea.

Conforme Vidali (2001) os microrganismos podem ser encontrados em diversos ambientes sob variadas condições ambientais, desde que existam os requisitos principais para o seu desenvolvimento, que são a existência de fonte de energia e carbono. A contagem inicial de UFC do solo é um parâmetro importante na avaliação da quantidade desses microrganismos que são cultiváveis através de metodologias tradicionais laboratoriais (BALBA, AL-AWADHI e AL-DAHER, 1998).

De acordo com Margesin et al. (2003) o número de bactérias e fungos cultiváveis em laboratório podem não indicar o prevaletimento no solo de genótipos com potencial degradador de HTP, ou seja, o número de microrganismos não pode ser relacionado com o tipo de atividade desenvolvida por esses.

Como nessa fase de caracterização não foram realizados ensaios para verificação da capacidade da comunidade microbiológica do solo em degradar hidrocarbonetos, nada se pode afirmar quanto ao potencial biodegradador das UFC contabilizadas, podendo apenas ser constatada a presença de um número alto de microrganismos viáveis no solo.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO FLUIDO

### 4.2.1 Viscosidade

Os valores de viscosidade da fase dissolvida da água de produção obtidos para diferentes temperaturas, são apresentados na Tabela 11. Conforme se pode observar, os resultados encontrados se apresentam levemente superiores aos da água, pressupondo-se que a água pura possui viscosidade de 1,020 CP a uma temperatura de 20°C (WEAST et al., 1988). Apesar das medições terem sido realizadas com a fase dissolvida da AP, a mesma ainda contém partículas pequenas de óleo dispersas e uma parcela de óleo solúvel, o que justifica os maiores valores de viscosidade obtidos em comparação com a água pura (MOTTA et al., 2013).

As viscosidades medidas apresentaram decréscimos, conforme esperado, com a elevação da temperatura, já que o processo de aquecimento proporciona um maior distanciamento entre as moléculas, elevando a fluidez (GRANJEIRO et al., 2007). Através da medição da temperatura da água de produção nos reservatórios, constatou-se que a mesma se encontrava em torno de 28°C, podendo-se considerar a viscosidade do fluido nos reservatórios próxima a 1,25 CP, conforme os resultados obtidos.

Tabela 11. Viscosidade da água de produção obtida para diferentes temperaturas

Identificação do Fluido	Viscosidade (CP)		
	20°C	30°C	40°C
Água de Produção	1,35	1,25	1,18

Fonte: Autora (2018)

#### 4.2.2 Massa Específica

A massa específica obtida para a fase dissolvida da água de produção, a uma temperatura de 20°C está inserida na Tabela 12. Observou-se que massa específica do fluido estudado aproxima-se do valor relativo a água pura, a qual apresenta para a mesma temperatura, densidade de 0,9982 g/cm<sup>3</sup> (WEAST et al., 1988).

Tabela 12. Massa específica da água de produção ensaiada neste trabalho

Massa Específica (g/cm <sup>3</sup> )	0,998
---------------------------------------	-------

Fonte: Autora (2019)

#### 4.2.3 Tensão Superficial

Os valores de tensão superficial obtidos para o fluido analisado, para diferentes valores de temperatura, são apresentados na Tabela 13. Os valores apresentados podem ser considerados inferiores aos da água pura, já que a mesma apresenta a 20°C tensão superficial de 72.75 mN/m (WEAST et al., 1988).

Conforme Silva (2008) o óleo bruto, presente em águas de produção, apresenta tensoativos, os quais possuem propriedades como capacidade de formar bolhas ou espumas na superfície de um líquido e de reduzir a tensão superficial, o que pode justificar a menor tensão medida para a fase dissolvida do fluido em estudo, com relação a valores encontrados para a água pura.

Tabela 13. Tensão superficial do fluido ensaiado neste trabalho para diferentes temperaturas

Identificação do Fluido	Tensão Superficial (mN/m)		
	20°C	30°C	40°C
Água de Produção	65,1	58,8	59,1

Fonte: Autora (2019)

#### 4.2.4 Condutividade Elétrica, pH e Salinidade

Na Tabela 14 estão inseridos os resultados de condutividade elétrica, pH e salinidade obtidos para o fluido empregado neste trabalho (água de produção sintética), além dos valores desses parâmetros referentes a AP utilizada como fluido percolante no solo várzea por Lima (2018). Nota-se que a água de produção sintética utilizada neste estudo apresenta parâmetros físicos próximos ao fluido de produção ensaiado por Lima (2018).

Tabela 14. Parâmetros das águas de produção

Identificação do Fluido	CE ( $\mu$ S/cm)	pH	Salinidade (mg/L)	Na (g/L)
Fluido de produção original	2540	7,02	1320	270
Água de produção sintética	2380	6,12	1350	390

Fonte: Autora (2018)

As propriedades do fluido percolante interferem nas interações desenvolvidas durante o fluxo dessa substância no solo estudado, sendo característico de águas de produção de petróleo a alta salinidade.

A salinidade da água de produção se deve principalmente a concentração de cloreto de sódio, podendo variar de 250mg/L a 35.000mg/L (MOTTA et al. 2013). Na preparação da AP ensaiada utilizou-se na mistura 1000mg/L de NaCl, o que possibilitou a obtenção de alta condutividade elétrica e salinidade.

Na ciência dos solos é difundido o conhecimento do impacto ocasionado pelo fluxo de águas de elevada salinidade. Solos com significativa presença de argilo-minerais estão sujeitos ao efeito de dispersão dessas partículas ao serem percolados por fluidos com alta concentração de íons de Na (AYERS e WESTCOT, 1991; YOUSAF et al., 1987). A composição do solo várzea (teor de argilos minerais), aliado a salinidade da água de produção sintética, com elevada concentração de Na, intensificam a dispersão das partículas finas do solo, as quais são depositadas nos vazios do mesmo, podendo ocasionar reduções na permeabilidade.

Outro impacto que pode ser proporcionado pelas características do fluido, consiste nas interferências nas atividades microbiológicas. Altas salinidades e pH ácidos são capazes de reduzir e até inibir a ação dos microrganismos (KÄSTNER, BREUER-JAMMALI e MAHRO, 1998). O pH básico da água de produção sintética não ocasiona modificações no meio que interfiram significativamente no desenvolvimento da microbiota, porém a alta salinidade deverá ser considerada como fator de influência nas análises microbiológicas obtidas após aplicação dos ensaios de coluna.

#### 4.2.5 Concentração de HTP

A Tabela 15 contém os valores de concentração média de HTP obtidos para o fluido produzido nesta pesquisa e os referentes à água de produção original utilizada por Lima (2018). Verificou-se que a concentração de hidrocarbonetos obtida



apresenta-se inferior ao valor referente ao fluido percolado no solo várzea em experimento realizado por Lima (2018), o que influenciará no desenvolvimento das atividades degradadoras.

Tabela 15. Concentração de HTP dos fluidos ensaiados neste trabalho

Identificação do Fluido	Concentração Média de HTP
	( $\mu\text{g/L}$ )
Água de produção sintética	1116,59
Fluido de produção original	2860,00

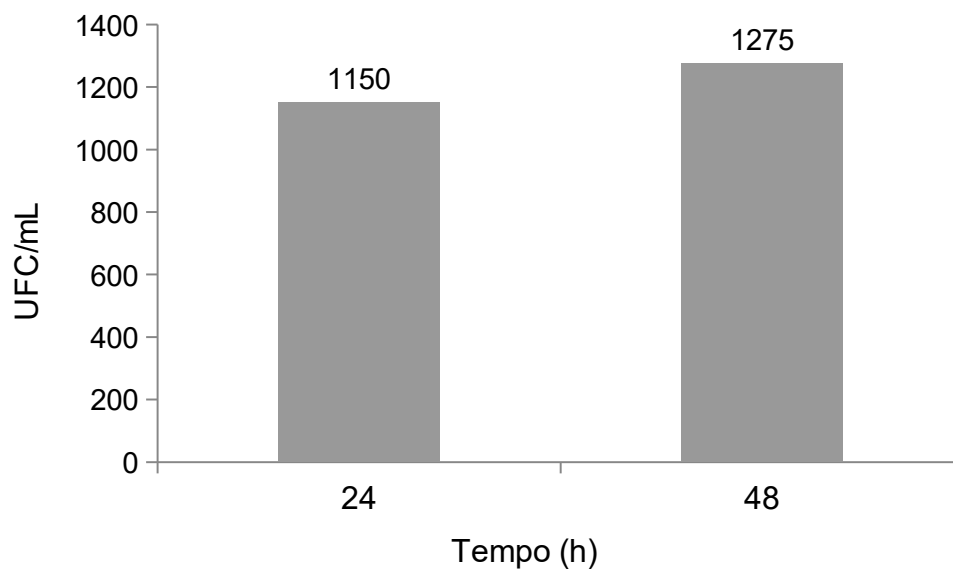
Fonte: Autora (2018)

#### 4.2.6 Cultivo e Contagem de Microrganismos

O cultivo de fungos e bactérias provenientes de amostras da água de produção ensaiada resultou na quantificação das UFC (Unidades Formadoras de Colônia) para bactérias, após 24h e 48h de incubação e para os fungos obtidos, após 7 dias de incubação.

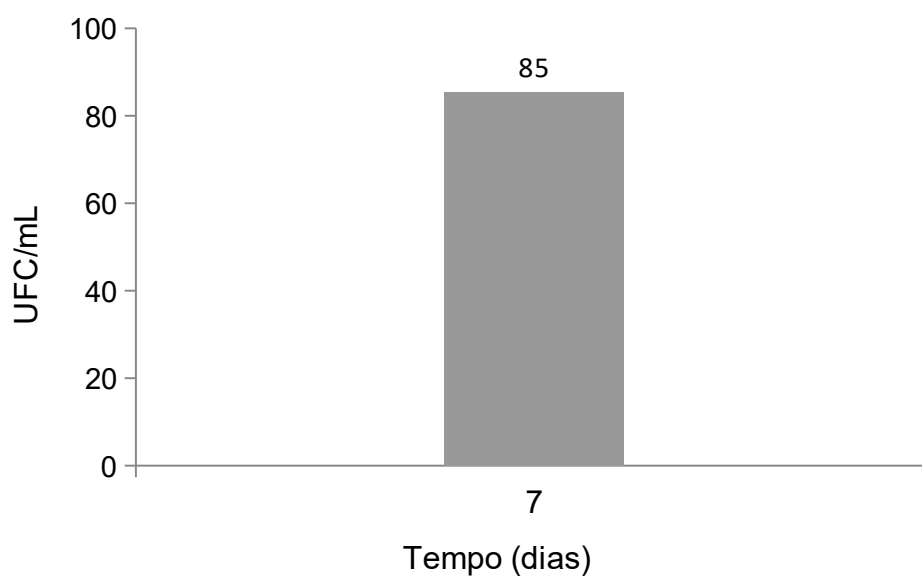
A Figura 46 e a Figura 47 apresentam, respectivamente, a representação gráfica da quantificação de UFC para bactérias e fungos, do fluido ensaiado. Observou-se que foram obtidas quantidades de colônias inferiores às observadas nas análises do solo, o que é justificado pelas características da água de produção, como a alta salinidade e o baixo valor nutricional, fatores não favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos.

Figura 46. Gráfico correspondente à contagem de UFC de bactérias da água de produção ensaiada neste trabalho



Fonte: Autora (2019)

Figura 47. Gráfico correspondente à contagem de UFC de fungos da água de produção ensaiada neste trabalho



Fonte: Autora (2019)

### 4.3 ENSAIOS DE COLUNA

A Tabela 16 apresenta os parâmetros hidráulicos medidos durante a realização dos ensaios de coluna e a Figura 48 apresenta graficamente o comportamento dos coeficientes de permeabilidade de cada corpo de prova.

Tabela 16. Parâmetros hidráulicos medidos durante a aplicação dos ensaios de coluna

Coluna de solo	$k_i$ (cm/s)	$k_f$ (cm/s)	$k_i/k_f$	$k_{med}$	Gradiente hidráulico médio (cm/cm)	Velocidade média de descarga (cm/s)	Tempo de ensaio (dias)
CP1	9,72E-06	1,41E-06	6,91	3,40E-06	41,09	1,17E-06	213
CP2	3,06E-07	1,28E-8	23,90	4,53E-8	56,79	1,13E-06	194
CP3	1,85E-08	4,79E-9	3,86	1,28E-8	111,75	1,22E-06	166
CP4	3,09E-07	1,09E-08	28,35	4,56E-8	60,30	1,37E-06	230

Fonte: Autora (2020)

Os elevados valores de gradientes hidráulicos médios ( $i_{med} > 40$  cm/cm) deveram-se à necessidade de aplicação de pressão de ar nos reservatórios durante a realização dos ensaios, já que obteve-se, já inicialmente, velocidades de fluxo na ordem de  $10^{-8}$  cm/s. Pelas características do solo ensaiado, composto por um material areno-argiloso, e devido aos efeitos da compactação, já se esperava o alcance de reduzidas taxas de permeabilidade.

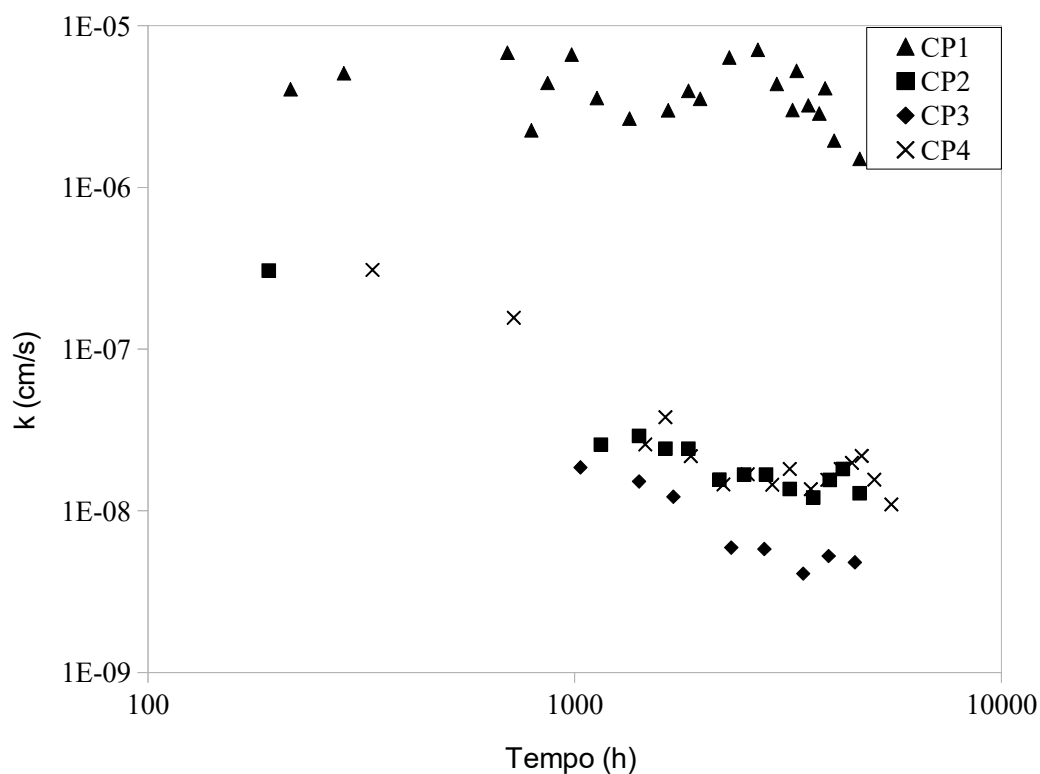
Ocorreram reduções nos valores  $k$  durante o ensaio, o que já havia sido constatado para o solo várzea nos ensaios aplicados por Lima (2018). Reduções de permeabilidades ocasionadas pelo efeito de dispersão de coloides são testemunhados em diversas pesquisas (YOUSAF et al., 1987; CURTIN et al., 1994; FREIRE et al., 2003), sendo conhecido o impacto do fluxo de águas de alta salinidade na permeabilidade de solos. Essas pesquisas verificam que o decréscimo de permeabilidade está associado com o aumento da taxa de adsorção de sódio

(RAS) das partículas. Lima e Machado (2019) comprovaram, através de ensaios de coluna, que o solo várzea, ao ser percolado por fluido de produção, proporciona a retenção de cátions de sódio e potássio. Esse fato foi relacionado as variações de permeabilidade detectadas no solo, já que pôde ser interpretado como um forte indício de ocorrência do fenômeno de dispersão das argilas.

Os corpos de prova percolados pela água de produção, com exceção do CP3, obtiveram maiores variações na permeabilidade em comparação ao CP1, o qual foi percolado por água destilada. Pode-se observar também os maiores valores de permeabilidade, inicial ( $k_i$ ) e final ( $k_f$ ), obtidos para o CP1. Essas diferenças comprovam que as características da água de produção (alta salinidade e condutividade elétrica) potencializaram o fenômeno de dispersão das partículas finas do solo, ocasionando obstruções dos poros disponíveis para a percolação do fluido.

O CP3 apresentou atrasos na saída do fluido percolado, obtendo desde o início taxas inferiores de permeabilidade, o que possibilitou uma menor variação de  $k$  entre o início e o final do ensaio, além da necessidade de emprego de maior carga de pressão na linha de ar interligada ao reservatório desse corpo de prova, o que resultou em um superior valor gradiente hidráulico médio ( $i_{méd} = 111,75 \text{ cm/cm}$ ). Esse corpo de prova também apresentou partículas finas, carregadas da coluna, depositadas no frasco com fluido drenado, desde a primeira coleta, o que sugere que esse CP sofreu maiores efeitos do fenômeno de dispersão.

Figura 48. Gráfico dos coeficientes de permeabilidade obtidos nos ensaios de coluna



Fonte: Autora (2020)

#### 4.3.1 Curvas de chegada

A Figura 49 e a Figura 50 apresentam graficamente as curvas de chegada obtidas neste trabalho para a condição de decaimento microbiológico, em termos de tempo de ensaio e volume de poros percolados, respectivamente. Na Tabela 17 encontram-se os parâmetros utilizados nesta pesquisa na modelagem das curvas obtidas, além dos valores utilizados nos ensaios realizados por Lima (2018). Esses valores, aliados às curvas de chegada ( $C/C_0xt$ ) geradas por Lima (2018), presentes na Figura 51, permitem uma comparação entre os resultados obtidos nos dois trabalhos, os quais foram realizados no mesmo solo.

Ressalta-se a dificuldade de comparação de resultados com outros dados da literatura que evidenciam taxas de decaimentos em curvas de chegada pela redução de concentração de determinada espécie química por ação degradadora de microrganismos, principalmente com resultados baseados na aplicação de ensaios

de coluna. Martins (2010) ao realizar a percolação de fluido contendo benzeno e tolueno em blocos de solo de grandes dimensões constatou decaimentos nas concentrações analisadas, os quais, assim como neste trabalho, não podiam ser representados através de uma constante de decaimento de primeira ordem, porém modelagens das curvas de chegada não foram realizadas pelo autor. Dessa forma, a análise dos parâmetros utilizados na modelagem das curvas de chegada deste trabalho serão feitos com base em comparações aos valores adotados por Lima (2018).

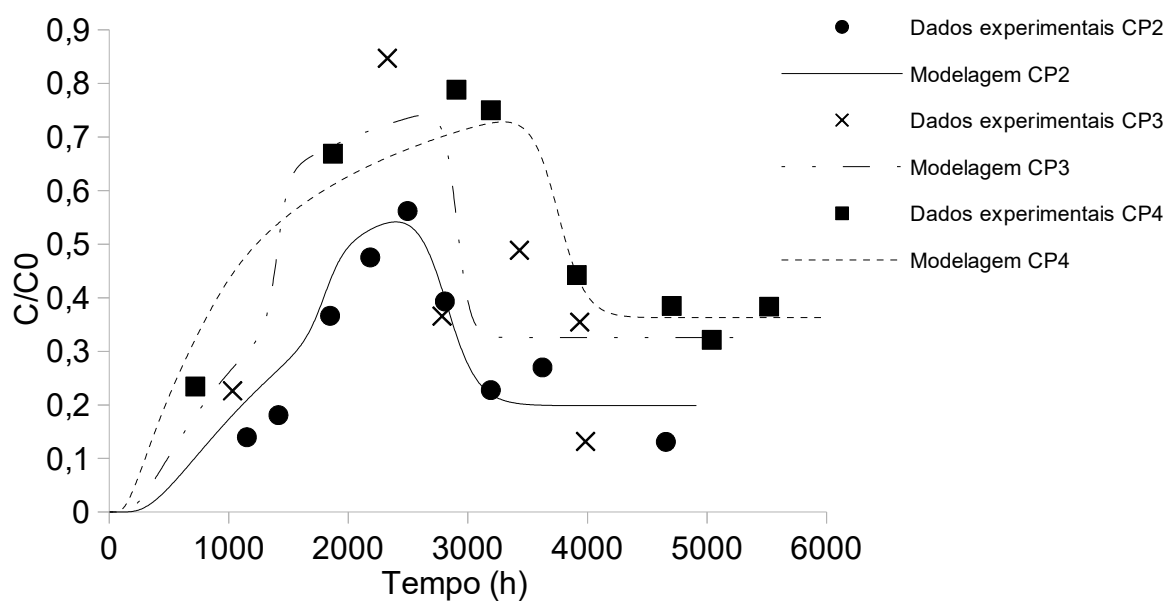
Tabela 17. Parâmetros utilizados na modelagem das curvas de chegada

Colunas de Solo	$\alpha$ (cm)	$R_d$	$V_{smed}$ (cm/s)	$D_h$ (cm <sup>2</sup> /s)	$P_L$	$t_1$ (s)	$\mu_{m\acute{a}x}$	$\beta$	$R^2$
CP1*	110,00	2,00	1,85E-6	2,09E-4	0,35	4,00E6	1,50E-6	3,00E-7	0,82
CP2*	50,00	1,70	4,45E-6	1,83E-4	0,78	1,00E6	9,00E-7	8,00E-7	0,88
CP3*	60,00	1,50	1,09E-6	7,10E-5	0,62	5,00E6	5,00E-7	3,00E-7	0,92
CP2	87,97	1,59	2,91E-6	2,61E-4	0,45	1,05E7	5,48E-7	2,04E-6	0,93
CP3	200,00	1,30	3,12E-6	6,30E-4	0,20	1,06E7	5,90E-7	5,00E-6	0,74
CP4	108,70	1,40	3,51E-6	3,84E-4	0,36	1,38E7	3,45E-7	2,40E-6	0,96

Legenda: \*Lima (2018);  $\alpha$ : coeficiente de dispersividade longitudinal;  $R_d$ : fator de retardo;  $V_{smed}$ : velocidade média de fluxo;  $D_h$ : coeficiente de dispersão hidrodinâmica;  $P_L$ : Número de Peclet;  $t_1$ : tempo para  $0,5 \mu_{m\acute{a}x}$ ;  $\mu_{m\acute{a}x}$ : taxa de degradação máxima;  $\beta$ : fator de inclinação;  $R^2$ : fator de ajuste.

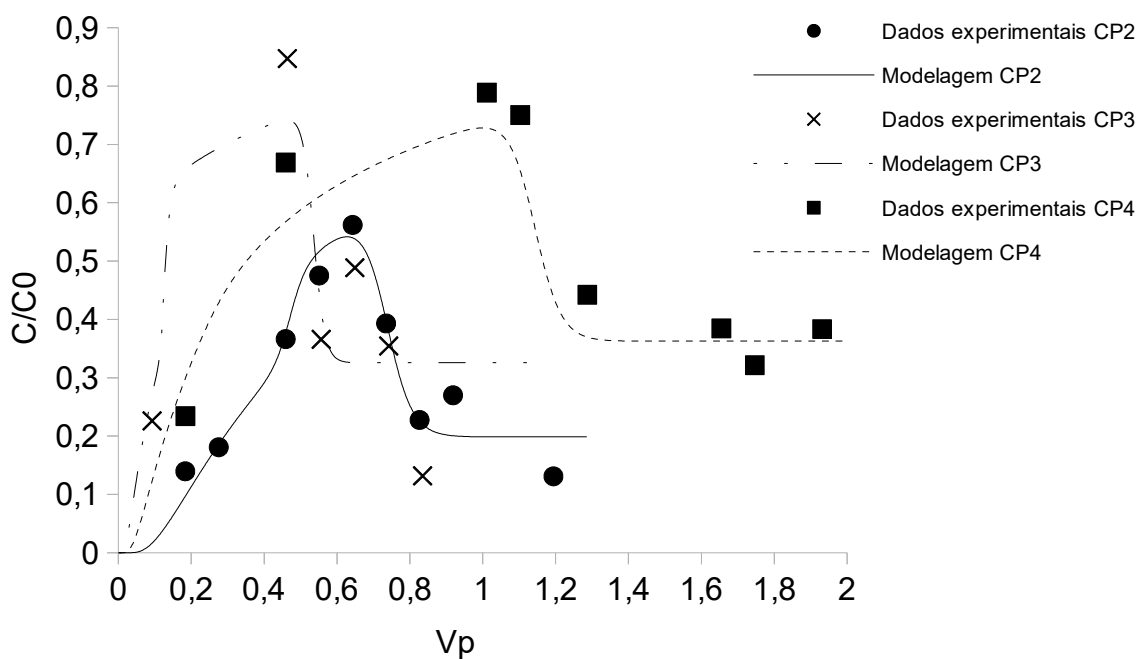
Fonte: Autora (2020)

Figura 49. Gráfico das curvas de chegada  $C/C_0$  x Tempo de ensaio, obtidas neste trabalho



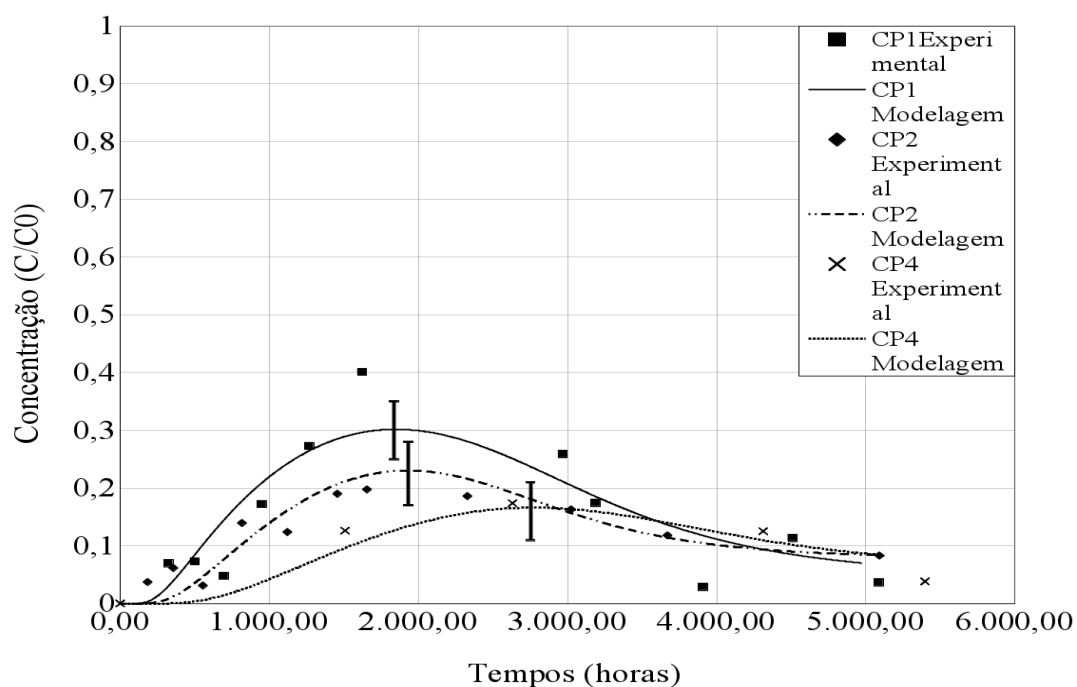
Fonte: Autora (2020)

Figura 50. Gráfico das curvas de chegada  $C/C_0$  x Volume de poros percolados, obtidas neste trabalho



Fonte: Autora (2020)

Figura 51. Gráfico das Curvas de chegada  $C/C_0 \times$  Tempo, dos ensaios realizados por Lima (2018)



Fonte: Lima (2018)

Conforme discutido anteriormente, para condições de fluxo lento ( $P_L < 1$ ), caso predominante em solos compostos por partículas de granulação fina, o valor do coeficiente de retardo ( $R_d$ ) não pode ser obtido através da correlação na curva de chegada do valor de volume de poros correspondente a uma concentração relativa ( $C/C_0$ ) de 0,5. Nesses casos Shackelford (1995) sugere que o valor de  $R_d$  seja obtido através do cálculo da área acima da curva, sob a condição de estabilização da concentração, ou seja, para  $C/C_0$  igual a 1. Como essa condição não foi atingida para os valores de concentração de HTP gerados nesta pesquisa, devido à ocorrência de decaimentos, a obtenção do  $R_d$  foi realizada por ajustes nas curvas de chegada que proporcionassem a obtenção de fatores de ajuste ( $R^2$ ) próximo a 1 e respeitando o critério de que  $R_d$  deve ser maior ou igual a 1. Dessa forma os



parâmetros de modelagem foram gerados através do uso de um aplicativo interativo (LibreOffice solver), objetivando o máximo valor do coeficiente de determinação  $R^2$ .

A comparação dos parâmetros empregados na presente pesquisa e aqueles obtidos por Lima (2018) mostra que, apesar de resultarem de experimentos realizados em um mesmo solo, comportamentos diferentes foram obtidos para as curvas de chegada em ambos trabalhos. A principal diferença está nos parâmetros referentes ao processo de decaimento. Nota-se que, nesta pesquisa, alcançou-se superiores valores de  $t_1$ , sugerindo que foi necessário um maior tempo de adaptação da comunidade microbiana degradadora de hidrocarbonetos da água de produção.

O atraso com relação a  $t_1$  pode ser justificado pelo comportamento hidráulico desenvolvido pela AP e pelo teor de hidrocarbonetos da mesma. O desenvolvimento da atividade biodegradadora em solos depende da composição do substrato, da disponibilidade de nutrientes e, no caso de atividade aeróbia, do transporte de oxigênio para as células microbianas (YANG, ERICKSON, e FAN, 1994; GOGOI et. al, 2003). Logo fenômenos que reduzam a permeabilidade do meio, interferem no desenvolvimento da atividade dos microrganismos degradadores, além dessa atividade ser dificultada pela existência de substratos menos concentrados. Ressalta-se que a água de produção utilizada nessa pesquisa possui um teor inferior de HTP com relação ao fluido adotado por Lima (2018), além de ter sido detectado durante os ensaios de coluna menores coeficientes de permeabilidade. Apesar de demandar maior tempo para a efetivação da degradação, os maiores valores de fator de inclinação ( $\beta$ ) apontam que o decaimento ocorreu de forma brusca, ou seja, após o desenvolvimento desses microrganismos a degradação dos compostos ocorreu rapidamente.

Apesar dos baixos valores de permeabilidade, obtiveram-se maiores velocidades de fluxo ( $V_s$ ) em relação aos valores encontrados por Lima (2018), devido à necessidade de aplicação de altas cargas de pressão nos reservatórios, o que também auxiliou, pela maior dissolução do ar na água, na distribuição de moléculas de oxigênio dissolvidas para a coluna de solo, já que as mesmas encontravam-se vedadas, permitindo a aeração do sistema. As taxas de velocidade

possibilitaram alcances de baixos valores de volume de poros percolados. Para o tempo  $t_1$  foram atingidos valores de  $V_p$  inferiores a 1, sendo que para dois corpos de prova (CP2 e CP3) o ensaio de coluna foi encerrado antes do alcance de 1 volume de poros percolados.

Outro parâmetro que apresentou divergências com relação aos valores obtidos por Lima (2018) foi o coeficiente de dispersividade ( $\alpha$ ). Esse parâmetro está relacionado com as propriedades dos agregados e do fluido percolante, sendo fortemente influenciado pela porosidade e distribuição dos tamanhos dos grãos, de forma que solos com maior porosidade proporcionam menor dispersividade do soluto, enquanto que uma maior distribuição granulométrica dos grãos, que proporcione um melhor empacotamento, resulta na obtenção de maior dispersividade (XU e ECKSTEIN, 1997). Em solos com elevados teores de argila, o que resulta em baixas condutividades hidráulicas, a estrutura do solo é fator preponderante na dispersividade (BROMLY et al., 2007). Ou seja, fatores que proporcionem a obtenção de menores coeficientes de permeabilidade, influenciam em maiores dispersividades do soluto.

Com relação as propriedades do fluido, Sousa et al. (2020) ao percolar água de produção em solos arenosos, constatou que os altos valores de  $\alpha$  obtidos para esse tipo de fluido podem ser justificados pelas particularidades de sua constituição. A AP possui partículas de óleo de diferentes tamanhos, estando essas presentes em sua forma dispersa e dissolvida. Ambos tipos de partículas são transportadas pelo fluxo de água, o que proporciona a obtenção de altos valores para o coeficiente de dispersividade. Os superiores valores de  $\alpha$ , em relação aos gerados por Lima (2018), influenciados pelas características do solo e da AP ensaiada, associados as maiores taxas de velocidade obtidas, justificam os elevados valores de coeficiente de dispersão hidrodinâmica ( $D_h$ ) gerados nesta pesquisa.

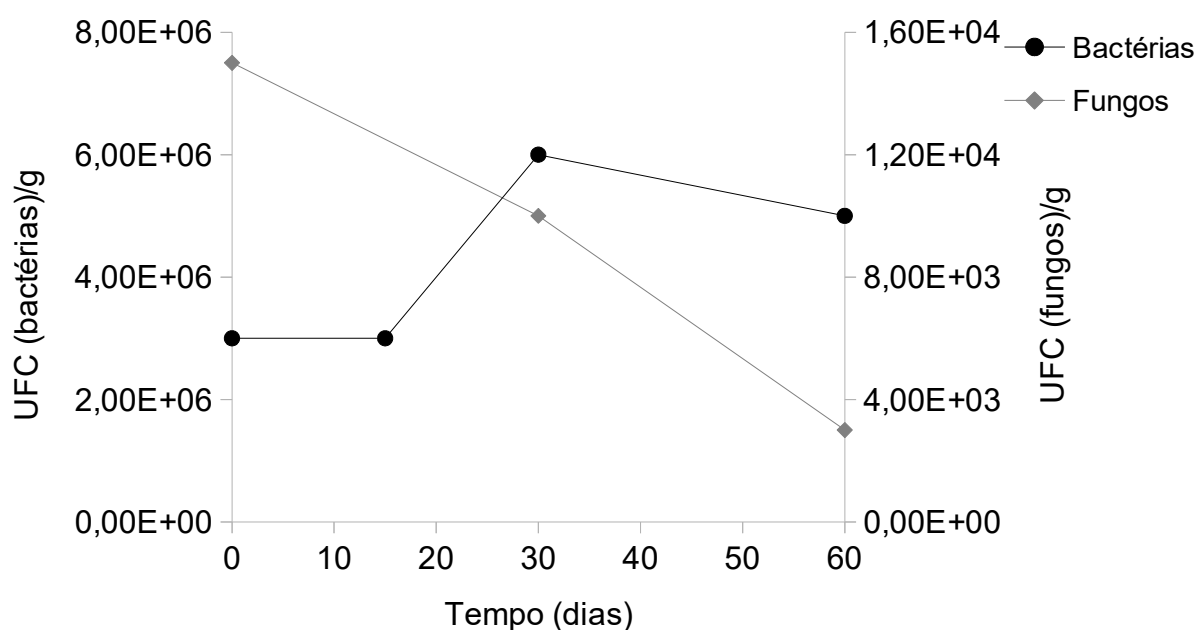
As colunas ensaiadas obtiveram valores levemente superiores ao valor de umidade ótima obtido no ensaio de compactação. Solos compactados no ramo úmido da curva de compactação obtém uma estrutura dispersa, a qual proporciona um melhor empacotamento das partículas, resultando em permeabilidade inferior ao

material compactado em umidade inferior a ótima (MITCHELL, et al., 1965). As colunas compactadas por Lima (2018) concentravam-se no ramo seco da curva de compactação, possuindo uma estrutura mais floculada. Essa diferença estrutural também pode ser associada as menores taxas de permeabilidade e elevados valores de coeficiente de dispersividade obtidos para esta pesquisa.

#### 4.3.2 Contagem microbiológica

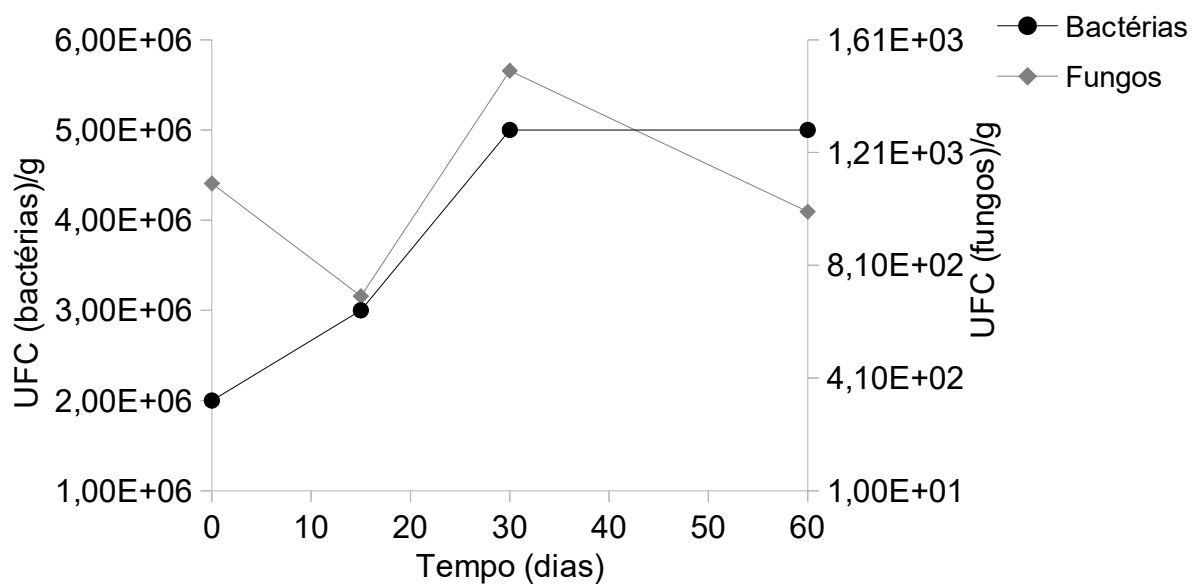
A Figura 52 a 55 apresentam os gráficos correspondentes aos resultados das contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos e bactérias obtidas das amostras de solo retiradas das colunas em diferentes tempos.

Figura 52. Representação gráfica da contagem de UFC de bactérias e fungos obtidas para o CP1



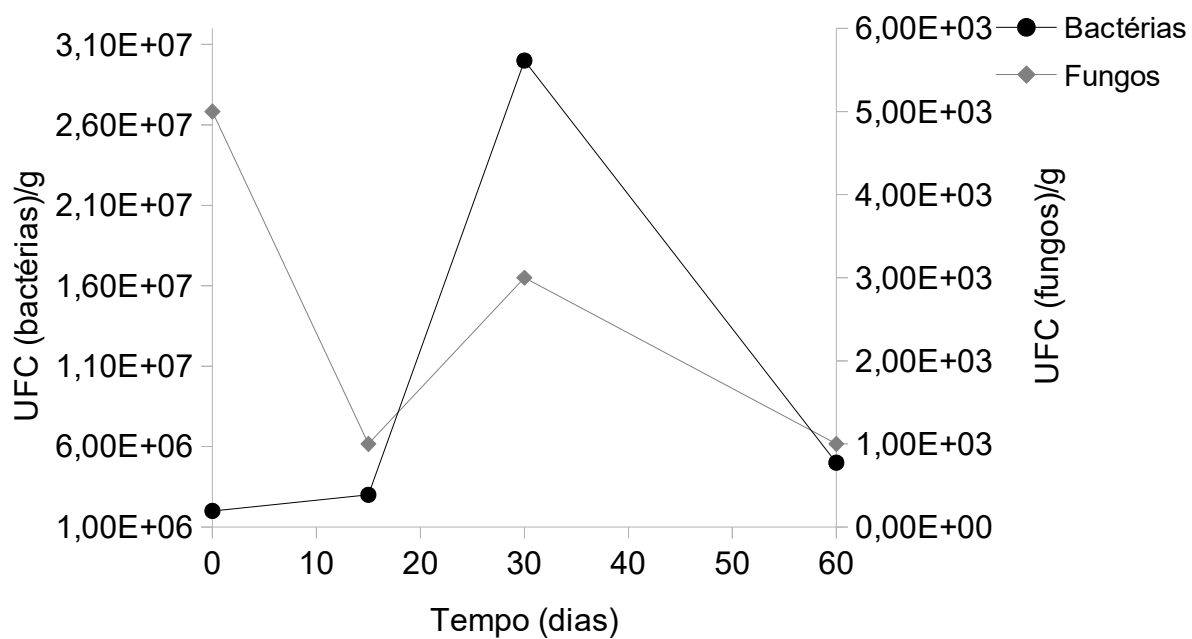
Fonte: Autora (2020)

Figura 53. Representação gráfica da contagem de UFC de bactérias e fungos obtidas para o CP2



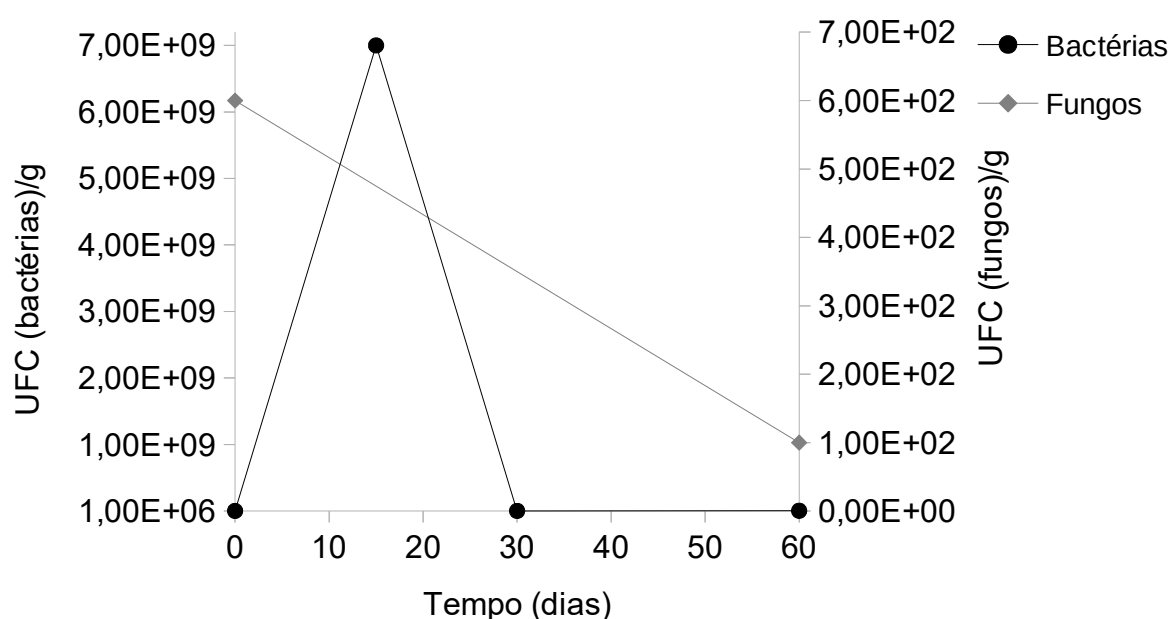
Fonte: Autora (2020)

Figura 54. Representação gráfica da contagem de UFC de bactérias e fungos obtidas para o CP3



Fonte: Autora (2020)

Figura 55. Representação gráfica da contagem de UFC de bactérias e fungos obtidas para o CP4



Fonte: Autora (2020)

Os resultados contidos nos gráficos apresentados permitiram o monitoramento microbiológico das colunas, apontando um melhor desenvolvimento de bactérias nas nessas colunas em relação aos fungos, com obtenção de valores superiores de UFC para esses microrganismos.

Ururahy et al. (1998) ao analisar a biodegradação de resíduos petrolíferos, constatou que o principal ocasionador da redução no número de microrganismos é a ineficiência na aeração. As colunas ensaiadas, após o encerramento dos testes de coluna, mantiveram-se fechadas, sendo encerrada a única fonte de abastecimento de oxigênio (entradas de pressão de ar nos reservatórios). Ademais, apesar de ser constado a presença de nutrientes no solo (fósforo e nitrogênio), os teores constados, na caracterização do solo, não se encontravam em altos valores. A concentração de nutrientes é essencial para o desenvolvimento e manutenção das atividades degradadoras, a redução dessas também pode ser tida com um dos fatores responsáveis pela minimização das UFC de fungos e bactérias

contabilizadas com o passar do tempo de ensaio (VIDALI, 2001; GOGOI et al., 2003).

O maior número de UFC de bactérias foi obtido para o CP1, percolado com água destilada. Em solos contaminados é comum que ocorra uma redução no número total de microrganismos, resultando na restrição da diversidade da microbiota, já que há a prevalência do reduzido número de espécies que são estimuladas pela presença de hidrocarbonetos (ELLIS JR e ADAMS JR, 1961). Durante as contagens, para as colunas percoladas com água de produção, através de análise visual, notou-se a redução de UFC de bactérias e fungos com características distintas (variação de cor, tamanho e textura), indicando a atenuação da diversidade da microbiota com o passar do tempo de ensaio.

O fluido percolado no CP2, CP3 e CP4, água de produção sintética, foi caracterizado como um fluido de alta salinidade. A salinidade promove alterações na microflora, podendo reprimir a atividade de microrganismos (KÄSTNER, BREUER-JAMMALI e MAHRO, 1998). Além desses fatores, ainda deve-se considerar o fato de que nem todos os microrganismos presentes nas amostras de solos analisadas podem ser cultivados através de técnicas microbiológicas laboratoriais tradicionais, ou seja, as contagens de UFC realizadas podem não englobar todas as colônias existentes nas amostras de solo analisadas (MARGESIN et al., 2003).

A maior redução do número de fungos, em comparação às UFC de bactérias, indica que as bactérias possuíram uma melhor capacidade de adaptação às características do fluido estudado, como a alta salinidade. Vale ressaltar que, na fase de caracterização do solo, o número de UFC de fungos superou às de bactérias. Esse resultado fortalece a hipótese de incapacidade de adaptação dos fungos ao solo sobre as condições de fluxo impostas, apesar de ser constatado na literatura a tolerância da comunidade fúngica a adversas condições de toxidade, sendo suas colônias mais flexíveis a altas contaminações do que as bactérias (TIŠMA; ZELIĆ e VASIĆ-RAČKI, 2010).

O pico obtido no número de UFC, mesmo após 15 dias de vedação das colunas, indica que poderia ocorrer maiores degradações do fluido percolado, com obtenções de menores concentrações relativas de hidrocarbonetos ( $C/C_0$ ), caso o ensaio de coluna não tivesse sido previamente encerrado.

#### 4.3.3 Análises genéticas

##### *4.3.3.1 Análises metagenômicas de amostras de solo*

As Tabelas 18 e 19, apresentam, respectivamente, os principais fungos e bactérias encontrados nas amostras de solos através das análises metagenômicas. Os resultados apresentados permitem uma comparação da microbiota detectada em uma amostra inicial (T0), com os microrganismos presentes nas amostras retiradas de cada corpo de prova após período de 60 dias de encerramento dos ensaios de coluna (T3). Os microrganismos com capacidade de degradar hidrocarbonetos, conforme resultado de teste de oxidação, identificados através da técnica de sequenciamento genético, encontram-se em destaque nas tabelas apresentadas.

Tabela 18. Fungos identificados através de análises metagenômicas nas amostras de solo

Fungos	CP percolado com água (T3)	CP percolado com AP (T3)				Amostra inicial (T0) (%)
	CP1 (%)	CP2 (%)	CP3 (%)	CP4 (%)	Média (%)	
Malasseziales: Incertae Sedis: <i>Malassezia</i>	14,57	12,52	18,75	31,21	19,26	17,38
Agaricomycetes: Não identificado: Não identificado: <i>Não identificado</i>	1,78	4,33	2,34	0,42	2,22	1,34
Eurotiales: Trichocomaceae: <i>Talaromyces</i>	1,62	1,66	1,79	3,47	2,13	7,61
Helotiales: Não identificado: <i>Não identificado</i>	1,35	5,71	0,00	0,00	1,77	0,00
Saccharomycetales: Incertae Sedis: <i>Candida</i>	4,02	0,00	0,00	2,31	1,58	0,00
Saccharomycetales: Não identificado: <i>Não identificado</i>	4,10	0,09	1,12	0,18	1,37	0,00
Pleosporales: Não identificado: <i>Não identificado</i>	1,00	0,74	1,95	0,00	0,92	0,00
Capnodiales: Não identificado: <i>Não identificado</i>	0,00	0,55	1,90	0,58	0,76	2,71
Agaricales: Não identificado: <i>Não identificado</i>	1,31	0,00	0,00	1,26	0,64	0,03
Onygenales: Não identificado: <i>Não identificado</i>	1,24	1,29	0,00	0,00	0,63	0,58
Saccharomycetales: Não identificado: <i>Não identificado</i>	0,54	0,64	0,28	1,00	0,62	1,04
Hypocreales: Hypocreaceae: <i>Trichoderma</i>	0,00	0,46	0,00	1,02	0,37	0,00
Eurotiomycetes: Eurotiales: <i>Aspergillus</i>	0,00	0,00	0,28	0,00	0,07	0,000

Fonte: Autora (2020)



Tabela 19. Bactérias identificadas através de análises metagenômicas de amostras de solo

Bactérias	CP percolado com água (T3)	CP percolado com AP (T3)				Amostra Inicial (T0)(%)
		CP1 (%)	CP2 (%)	CP3 (%)	CP4 (%)	
Burkholderiales: Comamonadaceae: <i>Delftia</i>	66,43	66,36	70,86	71,83	69,68	65,91
Acidobacteria:Não identificado: Não identificado: <i>Não identificado</i>	1,30	3,13	0,41	4,34	2,63	0,00
Acidobacteria:Não identificado: Não identificado: <i>Não identificado</i>	3,97	3,52	1,93	1,63	2,36	1,11
Burkholderiales:Comamonadaceae: <i>Não identificado</i>	2,14	2,16	2,23	2,26	2,22	0,00
Burkholderiales: Comamonadaceae: <i>Não identificado</i>	1,35	1,83	1,71	1,92	1,82	0,00
Saprosirales: Chitinophagaceae: <i>Sediminibacterium</i>	0,34	1,02	0,02	2,58	1,21	0,06
Xanthomonadales: Xanthomonadaceae: <i>Não identificado</i>	0,36	2,01	0,81	0,16	0,99	0,43
Caulobacterales: Caulobacteraceae: <i>Mycoplana</i>	0,01	2,21	0,06	0,17	0,81	0,00
Acidobacteria:Não identificado: Não identificado: <i>Não identificado</i>	4,10	1,63	0,22	0,47	0,77	0,49
Sphingomonadales:Erythrobacteraceae: <i>Não identificado</i>	7,61	0,78	0,19	1,29	0,75	0,06
Caulobacterales: Caulobacteraceae: <i>Não identificado</i>	0,34	0,34	1,10	0,25	0,56	0,46
Não identificado: Não identificado: <i>Não identificado</i>	2,22	1,22	0,08	0,29	0,53	0,00
Sphingomonadales: Sphingomonadaceae: <i>Não identificado</i>	0,45	0,49	0,80	0,25	0,50	0,31
Caulobacterales: Caulobacteraceae: <i>Phenylobacterium</i>	0,24	0,26	0,55	0,23	0,35	0,13
Fusobacteriales: Fusobacteriaceae: <i>Fusobacterium</i>	0,29	0,11	0,48	0,36	0,32	0,19
Rhizobiales: Hyphomicrobiaceae: <i>Rhodoplanes</i>	0,12	0,19	0,40	0,12	0,24	0,01
Rhizobiales: Methylocystaceae: <i>Methylosinus</i>	0,02	0,06	0,03	0,40	0,16	0,05
Sphingomonadales: Sphingomonadaceae: <i>Novosphingobium</i>	0,05	0,16	0,07	0,16	0,13	0,05
Bacillales: Staphylococcaceae: <i>Staphylococcus</i>	0,08	0,09	0,21	0,02	0,11	0,09
Sphingomonadales: Sphingomonadaceae: <i>Sphingomonas</i>	0,24	0,08	0,10	0,14	0,10	0,08
Xanthomonadales: Xanthomonadaceae: <i>Stenotrophomonas</i>	0,00	0,01	0,07	0,02	0,04	0,02
Bacillales: Bacillaceae: <i>Bacillus</i>	0,00	0,00	0,10	0,00	0,03	1,10
Bacillales: Bacillaceae : <i>Lysinibacillus</i>	0,00	0,00	0,10	0,00	0,03	0,10
Pseudomonadales: Pseudomonadaceae: <i>Pseudomonas</i>	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02

Fonte: Autora (2020)

O resultado das análises metagenômicas possibilitou uma comparação evolutiva dos microrganismos. Em solos contaminados por hidrocarbonetos é comum que ocorra uma redução da diversidade da microbiota, com predominância de espécies que possuem seu metabolismo estimulado pela presença desse composto (ELLIS JR e ADAMS JR, 1961). Detectou-se que as bactérias com maior percentual no solo estão associadas a atividade degradadora de hidrocarbonetos, conforme buscas na literatura. Esses microrganismos são em sua grande maioria, aeróbios, com destaque para a maior porcentagem do gênero *Delftia*, bactéria com potencial de degradação de hidrocarbonetos de alto peso molecular (SHETTY et al., 2015).

Dentre os genomas identificados estão associados a degradação de HTP os gêneros de bactéria *Mycoplana*, *Phenylobacterium*, *Fusobacterium*, *Rhodoplanes*, *Sphingomonas*, *Methylosinus*, *Novosphingobium*, *Staphylococcus*, os quais apresentaram acréscimos em comparação a amostra inicial (OLDENHUIS et al., 1991; ELLIS JR e ADAMS JR, 1961; KERTESZ e KAWASAKI, 2010; MUKHERJEE et al., 2016; KURI, CUMARI e ROY, 2019; DONG, WANG E LI, 2020). Dentre os microrganismos que não puderam ter seus gêneros identificados, conforme banco de dados utilizado na plataforma QIIME, destacam-se àqueles pertencentes às famílias Erythrobacteraceae, Comomonadaceae, Xanthomonadaceae, Caulobacteraceae e Sphingomonadaceae, as quais são relatadas na literatura por possuírem gêneros com capacidade de degradar HTP (TÁNCSICS et al., 2009; KERTESZ e KAWASAKI, 2010; TONON, THOMPSON e MOREIRA, 2014; YANG et al., 2014; GUTIERREZ, 2019).

Os metagenômas apresentaram resultados mais expressivos para a população de bactérias, observando-se para essas a predominância de microbiota degradadora de hidrocarbonetos, com evolução em relação a amostra inicial. A prevalência de bactérias nas colunas de solo também foi constada no monitoramento microbiológico, através do procedimento de contagem de UFC.

Para os fungos, identificou-se com maior participação nas amostras o gênero *Malassezia*, o qual não está relatado na literatura com associações a atividades

degradadoras de hidrocarbonetos. Dentre os fungos que não puderam ser identificados em nível de gênero, encontrou-se as ordens Eriotales, Helotiales e Agaricales, além da família Aspergillus, as quais podem englobar espécies degradadoras de hidrocarbonetos (SANCHEZ et al., 2012; RIZVI E RÁMAN, 2017; MOHAMMADIAN, ARZANLOU E BABAI-AHARI, 2017; AL-HAWASH, ZHANG e MA, 2019), porém não foram obtidos resultados expressivos de evolução desses fungos no solo.

Alguns microrganismos, tanto fungos como bactérias, se apresentaram em porcentagens levemente maiores no CP1, percolado com água destilada. A água de produção ensaiada gerou modificações na microbiota do solo. Dentre as propriedades desse fluido que ocasionam maior impacto na alteração das atividades microbiológicas, destaca-se a salinidade. Altas salinidades podem inibir a atividade de alguns microrganismos, assim como existem aqueles que se adéquam a ambientes hipersalinos, desenvolvendo bem seu metabolismo. Os fungos e bactérias com maior participação nas amostras retiradas do CP1 podem ter seus desenvolvimentos afetados pela presença de alta concentração de NaCl da água de produção sintética. Vale ressaltar que na caracterização microbiológica da mesma, a baixa contagem de UFC foi atribuída a salinidade desse fluido (ANDRONOV et al., 2012; MARTINS e PEIXOTO, 2012; AHAMED et al., 2014).

#### 4.3.3.1 Sequenciamento genético de microrganismos Isolados

Nas análises genéticas dos microrganismos isolados do solo e selecionados com capacidade de degradar hidrocarbonetos, através de teste de oxidação com indicador DCPIP, identificou-se 4 espécies de bactérias (pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus*) e duas espécies de fungos (gênero *Malassezia* e *Talaromyces*) que não possuem a capacidade de degradar hidrocarbonetos relatada na literatura. Dentre os microrganismos já catalogados, detectou-se as espécies de bactéria *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas poae* e *Stenotrophomonas rhizophila* (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2014; KUMAR e

MANJUNATHA, 2015; KHAN et al, 2016; WANG et al., 2019) e os fungos *Aspergillus sp*, *Trichoderma sp* e *Talaromyces sp* (AL-HAWASH, ZHANG, e MA, 2019; ZAFRA e CORTÉS-ESPINOSA, 2015; ROSSIANA, MAYAWATIE E AMIN, 2018).

Repetições de espécies obtidas na identificação dos microrganismos com potencial de degradar HTP demonstraram o prevaecimento nas placas de cultivo da espécie de bactérias *Pseudomonas sp*. e de fungos *Talaromyces sp*. Ou seja, dentre os microrganismos viáveis presentes no solo, os quais foram cultivados e isolados em placas contendo meio de cultivo, houve a predominância desses gêneros como degradadores de hidrocarbonetos. Esse resultado difere dos obtidos nas análises metagenômicas das amostras de solo, onde detectou-se a alta predominância do gênero de bactérias *Delfia* e de fungos *Malassezia*.

Microrganismos com percentagem relevantes na identificação da microbiota das amostras não foram detectados através do isolamento e aplicação do teste de oxidação. As técnicas biológicas tradicionais, que consistem no emprego de meio de cultura para o desenvolvimento dos microrganismos, se diferenciam das técnicas moleculares utilizadas para as análises genéticas da microbiota das amostras de solos, sendo essas independentes de culturas (MARGESIN et al., 2003). Poucos microrganismos possuem capacidade de serem cultivados e isolados de amostras de solo, através de técnicas biológicas tradicionais, ou seja, nem todos os microrganismos detectados pelas análises metagenômicas podem ser cultiváveis em placas com meios de cultivo, não sendo incluídos nos testes de oxidação realizados.

Dentre os microrganismos identificados, as bactérias se apresentaram com maior presença na amostra inicial, conforme dados em destaque na Tabela 19. A redução dessas nas amostras analisadas no tempo T3 (60 dias após finalização dos ensaios de coluna) pode ser justificada pelas condições de aeração, já que, por se tratarem de microrganismos aeróbios, a falta de oxigênio e a criação de zonas anaeróbias pode ser considerada um fator de maior impacto na atividade dessas bactérias (YANG, ERICKSON, e FAN, 1994). Vale ressaltar que no monitoramento

microbiológico, através da contagem de UFC das amostras em diferentes tempos, constatou-se também a redução de microrganismos para o tempo T3.

Assim como em outros ensaios microbiológicos realizados neste trabalho (monitoramento microbiológico das amostras de solo e as análises metagenômicas) observou-se a predominância das bactérias com relação aos fungos, o que confirma que as bactérias dominaram os processos de degradação de hidrocarbonetos no solo em estudo, sendo capazes de se adaptarem melhor as condições de fluxo e mudanças físico-químicas impostas ao solo nos ensaios de coluna.

Vale ressaltar que, os microrganismos identificados foram preservados, conforme relatado na metodologia (item 3.4.3), o que possibilita futuras análises do uso dos mesmos em técnicas de biorremediação em campo. Como já comentado, apesar da constatação da microbiota degradadora de hidrocarbonetos no solo estudado, as características do solo várzea, com alta presença de partículas de argila que lhe conferem propriedades como a baixa permeabilidade, podem impactar no desenvolvimento das atividades degradadoras em campo. Sousa (2018) ao realizar ensaios de coluna com fluidos petrolíferos em solos pertencentes a áreas vizinhas ao local de coleta do solo várzea, não verificou decaimentos nas curvas de chegada geradas, o que pode ser interpretado como indicativo da ausência de microbiota degradadora de HTP nesses solos. Apesar de pertencerem a áreas próximas, os solos ensaiados por Sousa (2018) tratam-se de areais mal graduadas, com menor porcentagem de argila e maior permeabilidade, nas quais a aplicação dos microrganismos identificados no solo várzea podem propiciar tratamentos de campo mais eficazes de degradação de HTP, sem a gravidade de desenvolvimento de população de microrganismos exógenos.

## 5 CONCLUSÕES

A constituição do solo várzea, por tratar-se de um material areno-argiloso, aliado às características da fase dissolvida da água de produção sintética ensaiada, formada por um fluido de elevada salinidade, resultaram em condições de fluxo sob o fenômeno de dispersão de argilas. Foram constatadas reduções nas permeabilidades durante a execução dos ensaios de coluna, com alcance de  $k=4,81E-9$  para um dos corpos de prova percolados com água de produção. Os valores superiores de permeabilidades obtidos para o CP percolado com água destilada, obtendo-se no final do ensaio  $k=1,41E-06$ , e a presença de partículas finas nos vasos com fluido coletado, foram essenciais para a constatação da ocorrência de dispersão dos argilominerais do solo.

Os dados coletados dos ensaios de coluna e a plotagem das curvas de chegada apontaram a ocorrência de decaimentos nas concentrações de hidrocarbonetos do fluido percolado nas colunas de solo várzea. Além disso, resultados de ensaios físico-químicos no solo apontaram, inicialmente, condições satisfatórias para o desenvolvimento de microrganismos, com constatação da presença de fósforo e nitrogênio, e valor básico de pH. Ensaio de caracterização microbiológica mostraram que o solo várzea possuía uma alta densidade microbiológica, com contabilização de bactérias de  $1E5$  UFC/g de solo para 24H de incubação das placas. Dessa forma, na modelagem das curvas de chegada considerou-se um termo de decaimento não linear, o qual foi interpretado como um termo de decaimento microbiológico.

Uma comparação entre os parâmetros de modelagem do presente trabalho e os realizados por Lima (2018) mostraram que, apesar da análise de um mesmo solo, as diferentes características das águas de produção ensaiadas e as condições de fluxo impostas em ambas pesquisas, resultaram na obtenção de curvas com comportamentos diferentes, porém em todas, detectou-se a ocorrência de decaimentos nas concentrações de HTP.

A associação dos decaimentos obtidos com a atividade de microrganismos, pôde ser confirmada através de análises microbiológicas. A contagem de UFC em amostras de solo retiradas das colunas demonstraram uma tendência de redução das mesmas com a escassez de nutrientes e oxigênio. As análises genéticas de amostras de solo identificaram uma microbiota com percentual relevante de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, conforme dados da literatura, com presença em maior significância de bactérias, principalmente do gênero *Delftia*. As bactérias degradadoras de HTP se apresentaram em maior porcentagem nas amostras analisadas no tempo T3 (60 dias após finalização dos ensaios de coluna) com relação a amostra global obtida no tempo T0 (1 dia de finalização dos ensaios de coluna). Todos os ensaios microbiológicos, realizados em amostras de solo retiradas das colunas, apontam a predominância de bactérias na degradação de hidrocarbonetos com relação aos fungos.

A análise genética de microrganismos selecionados com potencial de degradar hidrocarbonetos permitiu a identificação de 4 espécies de bactérias (pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus*) e duas espécies de fungos (gênero *Malassezia* e *Talaromyces*) ainda não associadas à atividade degradadora de HTP, podendo esses microrganismos serem explorados em técnicas inovadoras de remediação em campo. Dentre as possibilidades existentes, essas espécies poderiam ser aproveitadas na remediação de solos pertencentes a áreas vizinhas ao local de coleta do solo várzea, as quais possuem como característica a presença de solos com maior permeabilidade, devido a menor porcentagem de argila, o que pode gerar resultados mais promissores de degradação *in situ*.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, com identificação e preservação de espécies degradadoras de hidrocarbonetos do solo várzea, e visando o desenvolvimento de técnicas de biorremediação em campo é proposto que seja estudado a inserção desses microrganismos em solos de baixa permeabilidade para a produção de barreiras minerais que possibilitem a retenção e degradação de hidrocarbonetos no caso de vazamentos. Dentre as técnicas de inserção existentes sugere-se o estudo da adição ao solo de microcápsulas contendo combinações dos espécimes isolados com nutrientes, de forma que garanta a latência desses microrganismos até que ocorra a disponibilidade do contaminante.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ASTDR). **Total Petroleum Hydrocarbons**, 5 p., 1999.
- AHAMED, F., DHAR, K., FERDOUSE, J., & ANWAR, M. N. Effect of salinity on the growth of petroleum hydrocarbons degrading *Bacillus* sp. isolated from chronically polluted ship breaking yards. *Bio technology*, V.68, 2014.
- AL-HAWASH, Adnan B.; ZHANG, Xiaoyu; MA, Fuying. **Removal and biodegradation of different petroleum hydrocarbons using the filamentous fungus *Aspergillus* sp. RFC-1**. *MicrobiologyOpen*, v. 8, n. 1, 2019.
- ALMEIDA NETO, O. B. **Dispersão da argila e condutividade hidráulica em solos com diferentes mineralogias, lixiviados com soluções salino-sódicas**. Tese de Doutorado (Programa de Pós Graduação em Engenharia Agrícola)- UFV, 2007.
- ALVAREZ, P.J.; ILLMAN, W. A. **Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models**. John Wiley & Sons, 2005.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D4016-14**-Standard Test Method for Viscosity and Gel Time of Chemical Grouts by Rotational Viscometer (Laboratory Method), ASTM International, West Conshohocken, PA, 2014.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D971-12**, Standard Test Method for Interfacial Tension of Oil Against Water by the Ring Method .ASTM International, West Conshohocken, PA, 2012.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E1621-13**. Standard guide for elemental analysis by wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry, PA, 2013.
- ANDRADE, J.A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, C. S. F. **Biorremediação de Solos Contaminados Por Petróleo E Seus Derivados**. *Eclética química*, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.
- ANDRADE, L.D; CRUCIANI, D.E. **Condutividade hidráulica no processo de eluição em um solo bruno-não-cálcico**. *Scientia Agricola*, v. 53, n. 1, p. 43-50, 1996.
- ANDRONOV, E. E.; PETROVA, S. N.; PINAEV, A. G.; PERSHINA, E. V.; RAKHIMGALIEVA, S. Z., AKHMEDENOV, K. M.; SERGALIEV, N. K. **Analysis of the structure of microbial community in soils with different degrees of salinization using T-RFLP and real-time PCR techniques**. *Eurasian soil science*, v.45, n.2, p.147-156, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6459**: Determinação do Limite de Liquidez. Rio de Janeiro, 7 p., 1984.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6502**: Rochas e solos. Rio de Janeiro, 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7180**: Solo- Determinação do Limite de Plasticidade-Método de Ensaio. Rio de Janeiro, 1984.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7181**: Solo – Análise Granulométrica. Rio de Janeiro, 13 p., 1984.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7182**: Solo – Ensaio de Compactação. Rio de Janeiro, 10 p., 1984.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 17505-2**: Armazenagem de líquidos inflamáveis e combustíveis. Parte 2: Armazenamento em tanques e em vasos, Rio de Janeiro, 65p., 2013.

ATLAS, R.M. (1981). **Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective**. *Microbiological Reviews*, v. 45, n.1, p.180–209, 1981.

ATLAS, R.M. **Bioremediation of petroleum pollutants**. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 35, n.1-3, p.317-327, 1995.

AYERS, R.S., WESTCOAT, D.W. **A qualidade da água na agricultura**. UFPB, Campina Grande, 1991.

AZAMBUJA, E., CANCELIER, D. B., & NANNI, A. S. **Contaminação dos solos por LNAPL: discussão sobre diagnóstico e remediação**. II SIMPÓSIO DE PRÁTICA DE ENGENHARIA GEOTÉCNICA DA REGIÃO SUL, Porto Alegre, p. 185-202, 2000.

AZEVEDO, I. C.D.; NASCENTES, C. R.; DE MATOS, A.T.; DE AZEVEDO, R. F. **Determinação de Parâmetros de Transporte de Metais Pesados em Latossolo Compactado**. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, V. 9, n.4, p. 623–630, 2005.

BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. **Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation**. *Journal of microbiological methods*, v. 32, n. 2, p. 155-164, 1998.

BARBOSA, M.C.; JUCÁ, J.F.T.; BATALHA, M.S.; COELHO, C.R.B.; SOUZA, M. M.; MACIEL, F. J. **Transporte de Contaminantes e Fluxo de Gases em Solos Não Saturados**. In *Solos não Saturados no Contexto Geotécnico* (pp. 367–413). São Paulo: Associação Brasileira de Mecânica dos Solos e Engenharia Geotécnica, 2015.

BEAR, J. **Dynamics of fluids in porous materials**. *Society of Petroleum Engineers*: Dallas, TX, USA, 1972.

BEKINS, B. A.; WARREN, E.; GODSY, E. M. **A comparison of zero-order, first-order, and monod biotransformation models**. *Groundwater*, v. 36, n. 2, p. 261-268, 1998.

BENTO, F. M., CAMARGO, F. A. O., OKEKE, B. C., & FRANKENBERGER, W. T. **Comparative Bioremediation Of Soils Contaminated With Diesel Oil By Natural Attenuation, Biostimulation And Bioaugmentation**. *Bioresource Technology*, v.96,n. 9, 2005.

BERGMANN, C.R. **Estudo Experimental e Analítico do Transporte de Contaminantes em Solos com Finos**. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil – COPPE) Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 102 p., 2016.

BORDEN, R. C., DANIEL, R. A., LEBRUN IV, L. E.; DAVIS, C. W. **INTRINSIC BIODEGRADATION OF MTBE AND BTEX IN A GASOLINE-CONTAMINATED AQUIFER**. *Water Resources Research*, v.33;n.5,p. 1105-1115, 1997.

BROMLY, M.; HINZ, Christoph; AYLMORE, L. A. G. **Relation of dispersivity to properties of homogeneous saturated repacked soil columns**. *European journal of soil science*, v. 58, n. 1, p. 293-301, 2007.

COSTA, C., BRITO, G., VENDAS, D., LOPES, M., CAMELO, A. **Brochura Técnica: Solos Contaminados - O Problema e as Soluções De Remediação**. APEMETA, 2015.

CERNIGLIA, C. E. **Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**. *Biodegradation*, v.3, n. 2–3, p. 351–368,1992.

CHAÎNEAU, C. H., MOREL J., DUPONT, J., BURY, E.; OUDOT, J. **Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil**. *Science of the Total Environment*, v. 227, n. 2-3, p. 237-247, 1999.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Lista Holandesa de valores de qualidade do solo e da água subterrânea – Valores STI**. São Paulo, 1999.

COMPANHIA, DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Ações Corretivas Baseadas em Risco (ACBR) Aplicadas a Áreas Contaminadas com Hidrocarbonetos Derivados de Petróleo e Outros Combustíveis Líquidos - Procedimentos**. 2006.

CORSEUIL, H. X.; MARINS, M. D. **Contaminação de águas subterrâneas por**

**derramamentos de gasolina: o problema é grave.** *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 2, n. 2, p. 50-54, 1997.

COUTO, P.R.; MALTA, S.M. **Um Estudo sobre a Influência do Acoplamento Físico-Biológico nos Processos de Remediação em Zonas Saturadas.** *IXV Congresso Nacional de Águas Subterrâneas*, 2006.

CURTIN, D., STEPPUHN, H.; SELLES, F. 1994. **Clay dispersion in relation to sodicity, electrolyte concentration and mechanical effects.** *Soil Sci. Soc. Am. J.* v. 58, n. 3, p. 955-962, 1994.

CUTRIGHT, T. J. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation and Kinetics Using *Cunninghamella echinulata* var. *elegans*.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 35, n. 4, p. 397-408, 1995

DANIEL, D. E.; BENSON, Craig H. **Water content-density criteria for compacted soil liners.** *Journal of Geotechnical Engineering*, v. 116, n. 12, p. 1811-1830, 1990.

DANTAS, C. P. **Utilização de Protótipo de Biorreator de Imersão Temporária na Biodegradação de Petróleo em Sedimento de Manguezal.** Dissertação (Pós graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente-POSPETRO) Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

DAOUD, Y.; ROBERT, M. **Influence of particle size and clay organization on hydraulic conductivity and moisture retention of clays from saline soils.** *Applied clay science*, v. 6, n. 4, p. 293-299, 1992.

DHAWAN, S.; ERICKSON, L. E.; FAN, L. T. **Model development and simulation of bioremediation in soil beds with aggregates.** *Groundwater*, v. 31, n. 2, p. 271-284, 1993.

DÍAZ, M. P., GRINGSON, S. J., PEPPIATT, C. J., BURGESS, J. G. **Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments.** *Marine Biotechnology*, v.2, n.6, p. 522-532, 2000.

DICKHOUT, J. M.; MORENO, J.; BIESHEUVEL, P. M.; BOELS, L.; LAMMERTINK, R. G. H.; DE VOS, W. M. **Produced Water Treatment by Membranes: A Review From a Colloidal Perspective.** *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 487, p.523-534, 2017.

DONG, Z.L.; WANG, B.S.; LI, J. **Effects of Petroleum Hydrocarbon Contamination on Soil Bacterial Diversity in the Permafrost Region of the Qinghai-Tibetan Plateau.** *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, p.1-18, 2020.

ELLIS JR, ROSCOE; ADAMS JR, RUSSELL S. **Contamination of soils by petroleum hydrocarbons.** *Advances in Agronomy*. Academic Press, p. 197-216,

1961.

EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Levantamento exploratório - reconhecimento de solos do estado do Rio Grande do Norte** .Boletim Técnico n.º 21 - Convênio de mapeamento de solos MA/DNPEA-SUDENE/DRN .Recife, 1971.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA)- **METHOD 3510C**: Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction; 8p.; 1996.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA)- **METHOD 3540C**: Soxhlet Extraction; 8p.; 1996.

EKINS, Paul; VANNER, Robin; FIREBRACE, James. **Zero emissions of oil in water from offshore oil and gas installations: economic and environmental implications**. *Journal of Cleaner Production*, v. 15, n. 13-14, p. 1302-1315, 2007.

FAKHRU'L-RAZI, A.; PENDASHEH, A.; ABDULLAH, L. C.; BIAK, D. R. A., MADAENI, S. S.; ABIDIN, Z. Z. **Review Of Technologies for Oil and Gas Produced Water Treatment**. *Journal of Hazardous Materials*, v. 170,n.2–3, p. 530–551, 2009.

FREIRE, M. B. D. S., RUIZ, H. A., RIBEIRO, M. R., & FERREIRA, P. A. **Condutividade hidráulica de solos de Pernambuco em resposta à condutividade elétrica e RAS da água de irrigação**. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 7, n. 1, p. 45-52, 2003.

GRANJEIRO, A. A.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; MATA, M. E. R. M. C. **Viscosidades de polpas concentradas de figo-da-Índia**. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.13, n.2, p.219-224, 2007.

GERBA, C.P., PEPPER, I.L. **Environmental microbiology: a laboratory manual**. *Soil Science*, v. 170, n. 12, p. 1050-1051, 2004.

GOGOI, B. K., DUTTA, N. N., GOSWAMI, P., MOHAN, T. K. **A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site**. *Advances in Environmental Research*, v.7, n.4, p.767-782, 2003.

GUTIERREZ, T. **Aerobic Hydrocarbon-Degrading Gammaproteobacteria: Xanthomonadales**. *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*, p. 191-205, 2019.

JACQUES, R. J. S., BENTO, F. M., ANTONIOLLI, Z. I., CAMARGO, F. A. D. O. **Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**. *Ciência Rural*, v.37,n.4, p.1192-1201,2007.

KANMANI, S.; GANDHIMATHI, Rajan; MUTHUKKUMARAN, Kasinathan. **Bioclogging in porous media: influence in reduction of hydraulic conductivity and organic contaminants during synthetic leachate permeation**. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, v. 12, n. 1, p. 126, 2014.

KÄSTNER, Matthias; BREUER-JAMMALI, Maren; MAHRO, Bernd. **Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil.** *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, n. 1, p. 359-362, 1998.]

KERTESZ, M. A.; KAWASAKI, A. **Hydrocarbon-degrading sphingomonads: Sphingomonas, sphingobium, novosphingobium, and sphingopyxis.** *In: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology.* 2010.

KIM, G. H.; KIM, J. H. **Sustainability of the in situ bio-barriers for contaminant containment in residual soils.** *KSCE Journal of Civil Engineering*, v.8,n.2, p.189-195, 2004.

KHAN, A. H. A.; ANEES, M.; ARSHAD, M., MUHAMMAD, Y. S.; IQBAL, M.; YOUSAF, S. **Effects of illuminance and nutrients on bacterial photo-physiology of hydrocarbon degradation.** *Science of The Total Environment*, v.557, p.705-711, 2016.

KUMAR, SV Praveen; MANJUNATHA, B. K. **Studies on hydrocarbon degradation by the bacterial isolate Stenotrophomonas rhizophila (PM-1) from oil spilled regions of Western Ghats of Karnataka.** *Science, Technology and Arts Research Journal*, v. 4, n. 3, p. 139-144, 2015.

KURI,M.L; KUMARI , V.;ROY, S. **Phenylobacterium Korensee Best Indigenous Petroleum Hydrocarbon Degrading Bacteria Isolated from Contaminated Soil of Bahrur, Alwar Region, India.** *International Journal of Contemporary Research and Review* .v.10,n.8,p.2023-20211, 2019.

LEAHY, J.G.COLWELL, R.R.**Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.54, p.305-315, 1990.

LEITE, J. C. **Estudos laboratoriais de percolação em colunas de misturas de solos lateríticos compactadas: equipamentos e ensaios.** Teses de Doutorado - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

LIMA, D.F. **Avaliação De Processos Geoquímicos e da Eficiência de Consórcios Fúngicos em Testes de Simulação da Biorremediação em Sedimentos de Manguezal Contaminados com Óleo.** Tese (Doutorado em Geologia) - Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 230p.,2014.

LIMA, D. F.; OLIVEIRA, O. M. C., GERIS, R. M.S., TRIGUIS, J. A., QUEIROZ, A. F.S.; CRUZ, M. J. M.,; BARRETO, I. S. **Isolation and selection of fungi for degrading saturated hydrocarbons, aromatic hydrocarbons and NSO compounds.** *Open Journal of Yangtze Oil and Gas*, V.2, n. 1, p.10-26, 2017.

LIMA, F.A.L.V. **Transporte de Contaminantes Oriundos da Água De Produção da Indústria Petrolífera em Solos Argilosos Compactados.** Dissertação de Mestrado (Pós Graduação em Engenharia Civil)- Universidade Federal da Bahia, Salvador, 249p., 2018.

LIMA, F.A.L.V.; MACHADO, S.M. **Compacted Brazilian soil hydraulic behaviour during the percolation of petroleum-produced water.** *Journal of Environmental Engineering and Science*, v. 14, n. 3, p. 179-191, 2019.

LUCAS, G.M.S. **MOBILIZAÇÃO DE PARTÍCULAS COLOIDAIS EM MEIOS POROSOS.** Tese de Doutorado (Programa de Pós Graduação de Engenharia) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, Rio de Janeiro, 160p., 2006.

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

LAY, WINSON CL; LIU, YU; FANE, ANTHONY G. **Impacts of salinity on the performance of high retention membrane bioreactors for water reclamation: a review.** *Water research*, v. 44, n. 1, p. 21-40, 2010.

LABORATÓRIO DE EXCELÊNCIA EM GEOQUÍMICA - LEPETRO. **MEA003-Método de ensaio: Extração Líquido/Líquido.** 2019.

MACHADO, C. J. S., VILANI, R. M., FRANCO, M. G., DA COSTA LEMOS, S. D. **Legislação ambiental e degradação ambiental do solo pela atividade petrolífera no Brasil.** *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, v.28, 2013.

MARGESIN, R., LABBE, D., SCHINNER, F., GREER, C. W.; WHYTE, L. G. **Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils.** *Appl. Environ. Microbiol.*, v.69 n.6, p.3085-3092,2003.

MARTINS, C.P. **Construção, instrumentação e monitoramento de um lisímetro in situ para avaliação da biodegradação de benzeno e tolueno em solo residual de gnaiss.** Dissertação de Mestrado (Pós Graduação em Engenharia Civil)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

MARTINS, LUIZ FERNANDO; PEIXOTO, RAQUEL SILVA. **Biodegradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 865-872, 2012.

MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. (2017). **Soil and Brownfield Bioremediation.** *Microbial Biotechnology*, v.10, n. 5, p. 1244–1249, 2017.

MEGHARAJ, M., RAMAKRISHNAN, B., VENKATESWARLU, K., SETHUNATHAN, N., & NAIDU, R. **Bioremediation Approaches For Organic Pollutants: A Critical Perspective.** *Environment International*, v.37, n.8, p.1362–1375, 2011.

MELO JÚNIOR, A. S. **Análise Quantitativa Do Material Particulado Na Região De Campinas Através Das Técnicas De Microfluorescência De Raios X E Reflexão Total Usando Radiação Síncrotron.** Tese de Doutorado-Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.

MIRANDA, J. H.; DUARTE, S. N. **Modelo para simulação da dinâmica de nitrato em colunas verticais de solo não saturado de nitrato em colunas verticais de solo não saturado.** *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.6, n.2, p.235–241, 2002.

MITCHELL, J. K.; HOOPER, D. R.; CAMPENELLA, Ri.G. *Permeability of compacted clay.* **Journal of the Soil Mechanics and Foundations Division**, v. 91, n. 4, p. 41-66, 1965.

MOHAMMADIAN, E.; ARZANLOU, M.; BABAI-AHARI, A. **Diversity of culturable fungi inhabiting petroleum-contaminated soils in Southern Iran.** *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 110, n. 7, p. 903-923, 2017.

MONOD, Jacques. **The growth of bacterial cultures.** *Annual review of microbiology*, v. 3, n. 1, p. 371-394, 1949.

MORRIS, S. BLACKWOOD, C. **The Ecology of the Soil Biota and their Function.** *In: Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry.* Academic Press ,p. 273-309, 2015.

MOTTA, A. R. P; BORGES, C. P.; KIPERSTOK, A.; ESQUERRE, K. P.; ARAUJO, P. M.; BRANCO, L. P. N. **Tratamento de água produzida de petróleo para remoção de óleo por processos de separação por membranas: revisão.** *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.18, n.1,p. 15–26., 2013.

MUKHERJEE, A.; CHETTRI, B.; LANGPOKLAKPAM, J. S.; SINGH, A. K.; CHATTOPADHYAY, D. **Draft genome sequence of hydrocarbon-degrading *Staphylococcus saprophyticus* strain CNV2, isolated from crude oil-contaminated soil from the Noonmati Oil Refinery, Guwahati, Assam, India.** *Genome Announc.*, v.4,n.3, p.e00370-16, 2016.

MUTECA, F. L. L. (2012). **Biorremediação de solo contaminado com óleo cru proveniente de Angola.** Dissertação de Mestrado–Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

NAKA, A.; YASUTAKA, T.; SAKANAKURA; H., KALBE, U.; WATANABE, Y.; INOBA, S.; SOMEYA, M. **Column percolation test for contaminated soils: Key factors for standardization.** *Journal of Hazardous Materials*, v.320,p. 326–340,2016.

OLDENHUIS, R.;OEDZES, J. Y.; VAN DER WAARDE, J. J.;JANSSEN, D. B. **Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by *methylosinus trichosporium ob3b* and toxicity of trichloroethylene.** *Appl. Environ. Microbiol.*, v.57, n.1, p.7-14, 1991.

PACWA-PŁOCINICZAK, M., PŁAZA, G. A., POLIWODA, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. **Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil.** *Environmental Science and Pollution Research*, v.21,n.15, 2014.



PENG, C.; LEE, J.-W.; SICHANI, H. T.; NG, J. C. **Toxic effects of individual and combined effects of BTEX on *Euglena gracilis***. *Journal of Hazardous Materials*, v.284, p.10–18, 2015.

PEREIRA NETTO, A. D., MOREIRA, J. C., DIAS, A. E. X. O., ARBILLA, G., FERREIRA, L. F. V., OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J. **Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica**. *Química Nova*, v.23, n.6, p.765–773, 2000.

PICCOLI, R.; NASCIMENTO, G.C.; PERDONÁ, C.R.; PERUCCHI, P.; VITORETTI, P.; WERNCK, A.S.W. **A Importância da Utilização da Difração de Raios X na Caracterização de Argilas**. *International Atomic Energy Agency*, p. 8., 2015.

PINEDO, J., IBÁÑEZ, R., PRIMO, O., IRABIEN, A. **Hydrocarbon analysis for risk assessment in polluted soils**. *Chem Engineer Transact*, v.28, p.79-84, 2012.

PIRES, F., SOUZA, C., SILVA, A., PROCÓPIO, S., FERREIRA, L. **Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas**. *Planta daninha*, v.21,n.2, p. 335-341, 2003.

QUANN, R.J.; JAFFE, S.B. **Structure-oriented lumping: describing the chemistry of complex hydrocarbon mixtures**. *Industrial & engineering chemistry research*, v. 31, n. 11, p. 2483-2497, 1992

REZENDE, H.J.A.; FERNANDES, P.R.M. **CONCENTRAÇÕES MÁXIMAS ACEITÁVEIS (CMA) PARA HIDROCARBONETOS NO MEIO FÍSICO DO ESTADO DE MINAS GERAIS**. *Águas Subterrâneas*, 2013.

RIJNAARTS H.H.M., HESSELINK P.G.M., DODDEMA H.J. **Activated *In-Situ* Bioscreens**. *Soil & Environment*, v.5, p. 929-937, 1995.

RIZVI, SYED; RAMAN, ANANTANARAYANAN. **Botrytis cinerea (Helotiales Sclerotiniaceae)-induced changes in *Vitis vinifera* (Vitales Vitaceae) leaves influence the oviposition behaviour and life history of *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera Tortricidae)**. *Ethology Ecology & Evolution*, v. 29, n. 6, p. 574-588, 2017.

RIZZO, A. C.L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; SANTOS, R. L. C.; SOBRAL, L. G. S. (2006). **Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores**. *CETEM*, 2006.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Universidade Federal de Viçosa, 279 p., 2011.

ROSSIANA, N.; MAYAWATIE, B.; AMIN, M. R. **Morphological characteristics of *Talaromyces* sp., *Cladosporium* sp. and *Penicillium* sp. as microfungi in biodegradation of oil sludge using scanning electron microscope (SEM)**. *J Bacteriol Mycol Open Access*, v.6,n.6, p.330-333, 2018.

ROY, A. S., BARUAH, R., BORAH, M., SINGH, A. K., BORUAH, H. P. D., SAIKIA, N., BORA, T. C. **Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, V.94, p. 79-89, 2014.

RYAN, J. N.; ELIMELECH, M. **Colloid mobilization and transport .** *Groundwater.Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, v. 107, p. 1-56, 1996.

SANCHEZ, A.; RODRÍGUEZ, Y.; RAMÓN, A.; SAMÓN-LEGRÁ, E.; LAVANDERA, D.; DÍAZ, S.; LUISA, A.; CRUZ, M. ; BATISTA, G. R. **Physiologic behavior of the marine basidiomycete *Nia vibrissa* (Basidiomycota: Agaricales) in presence of polycyclic aromatic hydrocarbons.**p.10, 2012.

SANTOS, R. D. M., LEITE, S. G. F., SOBRAL, L. G. S., RIZZO, C. L. **Remedição de solo contaminado por petróleo em Biopilhas.** *In: Anais do 4º PDPETRO*.Campinas, 10p., 2009.

SENGIK, E. ALBUQUERQUE, K.P. **Os Colóides do Solo.** Apostila - Universidade Estadual de Maringá, 2003.

SILVA, P. K. L. D. **Remoção de óleo da água de produção por flotação em coluna utilizando tensoativos de origem vegetal.** Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

SHACKELFORD, C. D. **Critical Concepts for Column Testing.** *Journal of Geotechnical Engineering*, v. 120, n. 10, p.1804–1828, 1994.

SHACKELFORD, C. D. **Cumulative mass approach for column testing.** *Journal of geotechnical engineering*, v. 121, n. 10, p. 696-703, 1995.

SHETTY, A. R.; DE GANNES, V.; OBI, C. C.;LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; CHENG, J. F.; TESHIMA, H. **Complete genome sequence of the phenanthrene-degrading soil bacterium *Delftia acidovorans* Cs1-4.** *Standards in genomic sciences*, v.10, n.1, p.55., 2015.

SOUSA, R.G.U. **Estudo em colunas da percolação de óleo bruto, água de produção e efluente tratado em solos naturais do Rio grande do Norte e do ceará.** Dissertação de Mestrado (Pós Graduação em Engenharia Civil)- Universidade Federal da Bahia, Salvador, 192 p., 2018.

SOUSA, R.G.U., DE OLIVEIRA, I.B., MACHADO, S.L., DE FÁTIMA CARVALHO, M. **Solute Dispersion of Organic Compounds on Undisturbed Soil Columns.***Transp. Porous Media*, v. 132, p.267–282, 2020.

SNYDER, V. VÁZQUEZ, M. **STRUCTURE.** *In: Encyclopedia of Soils in the Environment.* Elsevier , p. 54-68, 2005.

TÁNCSICS, A.; SZABÓ, I.; SZOBOSZLAY, S.; BAKA, E.; MÁRIALIGETI, K.; RÉVÉSZ, S. **The role of beta-proteobacteria in aromatic hydrocarbon degradation: fingerprinting of 16s rRNA gene and catechol 2, 3-dioxygenase gene by t-rflp in BTEX degradative bacterial communities.** In: *current research topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. p. 664-668, 2009.

TEIXEIRA, P. C., DONAGEMMA, G. K., FONTANA, A., & TEIXEIRA, W. G. **Manual de métodos de análise de solo.** Embrapa, Rio de Janeiro, v. 4, 2017.

TELLEZ, G. T.; NIRMALAKHANDAN, N. **Bioreclamation of oilfield produced wastewaters: characterization and feasibility study.** In: *Produced Water*. Springer, Boston, MA, p. 523-533, 1992.

TIŠMA, MARINA; ZELIĆ, BRUNO; VASIĆ-RAČKI, ĐURĐA. **White-rot fungi in phenols, dyes and other xenobiotics treatment—a brief review.** *Croatian Journal of Food Science and Technology*, v. 2, n. 2., p. 34-47, 2010.

TONON, L.A.C.; MOREIRA, A.P.B.; THOMPSON, F. The family Erythrobacteraceae. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, p.213-235, 2014.

URURAHY, A.F.P; MARINS, M. D., VITAL, R. L.; GABARDO, I. T.; PEREIRA, Jr, N. **Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste.** *Revista de microbiologia*, v. 29, n. 4, p. 254-258, 1998.

VAN GENUCHTEN, M.T. **Analytical solutions for chemical transport with simultaneous adsorption, zero-order production and first-order decay.** *Journal of Hydrology*, v. 49, n. 3-4, p. 213-233, 1981.

VAN GENUCHTEN, M. Th; PARKER, J. C. **Boundary Conditions for Displacement Experiments through Short Laboratory Soil Columns 1.** *Soil Science Society of America Journal*, v. 48, n. 4, p. 703-708, 1984.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. **Recent advances in petroleum microbiology.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, p.67, v. 4, p.503-549, 2003.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. **A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.120, p.71–83, 2017.

VARONA-TORRES, E.; CARLTON, D. D.; HILDENBRAND, Z. L.; SCHUG, K. A. **Matrix-effect-free determination of BTEX in variable soil compositions using room temperature ionic liquid co-solvents in static headspace gas chromatography mass spectrometry.** *Analytica Chimica Acta*, v.1021, p.41–50, 2018.

VIDALI, M. **Bioremediation. An overview.** *Pure Appl. Chem*, Vol. 73, 2001.

VIEIRA, D. S.; CAMMAROTA, M. C.; CAMPORESE, E. F. S. **Redução De Contaminantes Presentes Na Água De Produção De Petróleo,** In: *2º Congresso*

*Brasileiro de P&G em Petróleo & Gás*, 2003.

WANG, J., DONG, M., ASGHARI, K. **Effect of oil viscosity on heavy oil-water relative permeability curves**. In *SPE/DOE Symposium on Improved Oil Recovery*. Society of Petroleum Engineers, 2006.

WANG, D., LIN, J., LIN, J., WANG, W.; LI, S. **Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by *Bacillus subtilis* BL-27, a Strain with Weak Hydrophobicity**. *Molecules*, v.24,n.17, 2019.

WEAST, R. C., ASTLE, M. J., BEYER, W. H. **CRC handbook of chemistry and physics** .Vol. 69, Boca Raton, FL: CRC press, 1988.

WU, M., LI, W., DICK, W. A., YE, X., CHEN, K., Kost, D., CHEN, L. **Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination**. *Chemosphere*, Vol.169, p. 124-130, 2017.

XU, Moujin; ECKSTEIN, Yoram. **Statistical analysis of the relationships between dispersivity and other physical properties of porous media**. *Hydrogeology Journal*, v. 5, n. 4, p. 4-20, 1997.

YANG, Xiaoqing; ERICKSON, L. E.; FAN, L. T. **Dispersive-convective characteristics in the bioremediation of contaminated soil with a heterogeneous formation**. *Journal of hazardous materials*, v. 38, n. 1, p. 163-185, 1994.

YANG, S.;WEN, X.;ZHAO, L.; SHI, Y.;JIN, H. **Crude oil treatment leads to shift of bacterial communities in soils from the deep active layer and upper permafrost along the China-Russia crude oil pipeline route**. *PloS one*, v.9,n.5, 2014.

YOUSAF, M., ALI, O.M., RHOADES, J.D. **Clay dispersion and hydraulic conductivity of some salt-affected arid land soils**. *Soil Science Society of America Journal*, v. 51, n. 4, p. 905-907, 1987.

ZAFRA, German; CORTÉS-ESPINOSA, Diana V. **Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: a mini review**. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 24, p. 19426-19433, 2015.

ZHANG, X. X., CHENG, S. P., CHENG-JUN, Z. H. U., SHI-LEI, S. U. N. **Microbial PAH-degradation in soil: degradation pathways and contributing factors**. *Pedosphere*, v.16, n.5,p.55-565, 2006.