

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

IGOR ALVES DA SILVA

**ASSOCIAÇÃO DE *BACILLUS SPP.* NA BIORREMEDIAÇÃO DE
“ÓLEO QUEIMADO” EM SOLO TIPO ARGISSOLO VERMELHO**

CAÇAPAVA DO SUL

2023

IGOR ALVES DA SILVA

**ASSOCIAÇÃO DE *BACILLUS SP.* NA BIORREMEDIAÇÃO DE
“ÓLEO QUEIMADO” EM SOLO TIPO ARGISSOLO VERMELHO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientador: Thiago Henrique Lugokenski

Coorientador: Guilherme Casa Nova

CAÇAPAVA DO SUL

2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

S586a Silva, Igor Alves Da
ASSOCIAÇÃO DE BACILLUS SP. NA BIORREMEDIAÇÃO DE "ÓLEO
QUEIMADO" EM SOLO TIPO ARGISSOLO VERMELHO / Igor Alves Da
Silva.
67 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade
Federal do Pampa, ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA, 2023.
"Orientação: Thiago Henrique Lugokenski".

1. Biorremediação. 2. óleo lubrificante. 3. Respirômetro de
Bartha. 4. Bacillus Subtilis. 5. Bacillus Amyloliquefaciens.
I. Título.

IGOR ALVES DA SILVA

**ASSOCIAÇÃO DE *BACILLUS SP.* NA BIORREMEDIAÇÃO DE
“ÓLEO QUEIMADO” EM SOLO TIPO ARGISSOLO VERMELHO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 06 de Dezembro de 2023

Banca examinadora:

Prof. Dr. Thiago Henrique Lugokenski
Orientador
UNIPAMPA

Prof. Dr. Mateus Guimarães da Silva
UNIPAMPA

Prof. Dra. Caroline Wagner
UNIPAMPA



Assinado eletronicamente por **MATEUS GUIMARAES DA SILVA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/12/2023, às 10:12, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **CAROLINE WAGNER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/12/2023, às 13:27, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **THIAGO HENRIQUE LUGOKENSKI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 18/12/2023, às 13:36, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1325139** e o código CRC **36618450**.

***Dedico este trabalho à minha família,
em especial meus pais Francineide
e Vidal, que possibilitaram essa
graduação, minha irmã Ingrid
e minha filha Ísis Silva.***

AGRADECIMENTO

A minha família, em especial os meus pais, Francineide Sousa e Vidal Alves, que lutaram a vida inteira para o filho se formar em uma universidade de respeito e não se submeter aos submundos que a vida paulistana tem a oferecer. Agradeço também a minha irmã, Ingrid Alves, pois me ajudou muito quando precisei e espero servir de exemplo para sua vida e tomadas de decisões. E por fim, minha pequena filha, quando crescer espero que leia e veja o mundo que você é pra mim e saiba que seu pai te ama muito.

Ao Engenheiro Ambiental e Sanitarista e Químico, Guilherme Pacheco Casa Nova, por todo apoio como co-orientador, não só no TCC, como também nas monitorias do CCTA que me ajudaram a crescer cientificamente e profissionalmente. E ainda amigo cervejeiro, pizzaiolo e parceiro de viagem que Caçapava do Sul me deu, levando assim para toda minha vida.

Ao Prof. Dr. Thiago Henrique Lugokenski por aceitar o desafio de me orientar nessa caminhada, por me encher de ideias e situações que aprimoraram o trabalho aqui presente e torcer pelo maior clube do país: São Paulo Futebol Clube (SPFC).

A todos os colegas de curso, sendo eles os que começaram comigo, os que voltaram à labuta no pós-pandemia e os que conheci na reta final de formação. Em especial Piero Bastos, Natacha Evaldt, Eduardo Sampaio, Thammy Ferreira, Emmanuel Costa, Louise Albuquerque, Rayssa Magalhães, Juan Franc's, Hanna Araujo, Lucieni Kaizer e Pedro Xavier.

Aos funcionários da instituição, sendo concursados ou terceirizados, todos têm participação direta e indireta na construção e formação dos indivíduos que por essa universidade passaram, conseqüentemente a minha formação. E também a própria instituição, pois é uma prova concreta de que universidade de qualidade e gratuita formam cidadãos preparados para a sociedade.

A todos e todas aqui citados, os meus mais sinceros agradecimentos paulistanos: “**Só agradece**”.

***“O trauma que eu carrego pra não ser
mais um preto fodido!”***

Racionais MC's

RESUMO

Dentre as possibilidades de tratamento e limpeza de contaminação ambiental por óleos, o uso de microrganismos para fazer a degradação desse contaminante tem se destacado pela eficiência, custo e praticidade. Denominada de biorremediação, essa técnica tem como objetivo a degradação do contaminante por organismos vivos não patogênicos e adicionados ao ambiente contaminado. Alguns produtos já existem com esse objetivo de remediar ou de diminuir a contaminação, principalmente na área de tratamento de esgoto, com muitos deles usando associações de duas ou mais espécies de bactérias, dentre elas *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*. Contudo, o grau de efetividade dessas associações tanto em termos de velocidade de tratamento e amplitude de compostos biodegradados pelos organismos ainda não foram plenamente demonstrados, e podem ser limitados pela fisiologia e competição das espécies em uso. Então, o objetivo deste trabalho é testar a eficiência da remediação de contaminação com óleo lubrificante das bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* sozinhas ou em associação em modelo de contaminação de solo por óleos lubrificantes. O acompanhamento da remediação foi feito através do Respirômetro de Bartha, sistema esse que serve para a solubilização do dióxido de carbono (CO_2) gerado na degradação do contaminante em uma solução de hidróxido de potássio e posteriormente foi feita a titulação dessa solução, comparando com a titulação do sistema padrão/branco para analisar a produção de CO_2 produzido. Apresentando o desempenho satisfatório do sistema de Bartha que foi uma adaptação diretamente do respirômetro comercial, possibilitando uma alternativa mais barata e acessível, em 93%, para se reproduzir pesquisas desse ramo. Para o desempenho da biodegradação foi observado que as bactérias em diferentes proporções e variáveis submetidas, apresentaram bom potencial de degradação do hidrocarboneto, individualmente e na forma de associação.

Palavras-Chave: Biorremediação, óleo lubrificante, Respirômetro de Bartha, *Bacillus Amyloliquefaciens* e *Bacillus Subtilis*.

ABSTRACT

Among the possibilities for treating and cleaning environmental contamination by oils, the use of microorganisms to degrade this contaminant has stood out due to its efficiency, cost and practicality. Called bioremediation, this technique aims to degrade the contaminant by non-pathogenic living organisms added to the contaminated environment. Some products already exist with the aim of remedying or reducing contamination, mainly in the area of sewage treatment, with many of them using associations of two or more species of bacteria, including *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. However, the degree of effectiveness of these associations, both in terms of speed of treatment and range of compounds biodegraded by organisms, has not yet been fully demonstrated, and may be limited by the physiology and competition of the species in use. Therefore, the objective of this work is to test the efficiency of remediation of contamination with lubricating oil of the bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* alone or in association in a model of soil contamination by lubricating oils. Monitoring of the remediation was carried out using the Bartha Respirometer, a system that serves to solubilize carbon dioxide (CO₂) generated in the degradation of the contaminant in a potassium hydroxide solution and subsequently the titration of this solution was carried out, comparing with the titration of the standard/blank system to analyze the production of CO₂ produced. Presenting the satisfactory performance of the Bartha system, which was a direct adaptation of the commercial respirometer, enabling a cheaper and more accessible alternative, by 93%, to reproduce research in this field. For biodegradation performance, it was observed that the bacteria in different proportions and variables submitted, presented good potential for hydrocarbon degradation, individually and in the form of an association.

Keywords: Bioremediation, lubricating oil, Bartha Respirometer, *Bacillus Amyloliquefaciens* and *Bacillus Subtilis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do respirômetro de Bartha.....	24
Figura 2 - Fluxograma metodológico.....	28
Figura 3 - Mapa de localização do município.....	29
Figura 4 - Perfil de solo.....	31
Figura 5 - Sistema do Respirômetro de Bartha.....	37
Figura 6 - Criação do Filtro.....	38
Figura 7 - Teste de estanqueidade.....	41
Figura 8 - Triângulo textural do solo.....	45
Figura 9 - Sistema de Bartha em funcionamento.....	47
Figura 10 - Gráfico de desempenho sem O ₂ a 30°C.....	51
Figura 11 - Gráfico de desempenho com O ₂ a 23, 25 e 30°C.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Distribuição de Remediadores a 30°C.....	40
Quadro 2: Distribuição de Remediadores a 23°C.....	40
Quadro 3 - Determinação de TFSA.....	42
Quadro 4 - Pesagem das Areias.....	42
Quadro 5 - Prova em Branco.....	43
Quadro 6 - Fator de Umidade.....	43
Quadro 7 - Argilas.....	43
Quadro 8 - Cálculos.....	44
Quadro 9 - Valores percentuais da Textura do Solo.....	44
Quadro 10 - Custo material.....	46
Quadro 12 - Produção de CO ₂ (em miligramas) sem oxigenação e 30°C.....	48
Quadro 13 - Produção de CO ₂ (em miligramas) com oxigenação e temperatura crescente ao longo do experimento.....	49
Quadro 14 - Comparação Orçamentária.....	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 JUSTIFICATIVA.....	19
4 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA.....	20
4.1 Definição de solo.....	20
4.2 Classificação e caracterização do solo.....	20
4.3 Óleos Lubrificantes Usados ou Contaminados (OLUC).....	21
4.4 Toxicidade do óleo.....	21
4.5 Biorremediação.....	22
4.6 Respirômetro de Bartha.....	23
4.7 Filtro absorvedor de Dióxido de Carbono.....	24
4.8 Bacillus amyloliquefaciens.....	25
4.9 Bacillus subtilis.....	25
5 METODOLOGIA.....	27
5.1 Localização e caracterização do solo.....	28
5.2 Pedologia.....	29
5.3 Análises Físicas.....	30
5.3.1 Preparo das amostras.....	31
5.3.2 Análise Granulométrica.....	32
5.3.3 Determinação do Fator de correção (f) devido a umidade residual:.....	33
5.3.4 Classificação textural.....	33
5.4 Análises Químicas.....	34
5.4.1 pH.....	34
5.4.2 FRX- Quantificação de elementos químicos no solo.....	35
5.5 Respirômetro de Bartha.....	36
5.6 Filtro para Dióxido de Carbono.....	37
5.7 Quantificação de gases ácidos.....	38
5.8 Contaminação.....	39
5.9 Teste de estanqueidade.....	40
6 RESULTADOS.....	41
6.1 Resultados de análise granulométrica.....	41
6.2 Resultado da análise do triângulo textural.....	44
6.3 Resultados pH.....	44
6.4 Resultados de custo.....	45
6.5 Resultados Sistema.....	46
6.5.1 Desempenho do sistema sem oxigenação a 30°C.....	47
6.5.2 Desempenho do sistema com oxigenação a 23°C.....	48
7 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49

7.1 Análise de custos.....	49
7.2 Análise de desempenho.....	50
7.2.1 Produção de CO2 sem oxigenação e temperatura de 30°C.....	50
7.2.2 Produção de CO2 com oxigenação e temperatura de 23°C.....	52
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICES.....	61
Apêndice A: Tabela de produtos remediadores com associação.....	61
Apêndice B: Elementos e suas proporções no solo (análise de FRX em ppm)...	63
ANEXOS.....	66

1 INTRODUÇÃO

A Constituição Federal Brasileira, em seu art. 225, declarou termos todos o direito fundamental “ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações”. Porém no Brasil, principalmente nos últimos quatro anos, tem-se visto um descaso governamental com o meio ambiente, como previsto por Bruno Carvalho na matéria “A Amazônia queimar novamente” do The New York Times Opinion de 27/05/2020. De forma a termos queimadas históricas em biomas como Pantanal e Amazônia, notícias de assassinatos e perseguição aos povos originários e a todos aqueles que de alguma forma tentavam denunciar esses crimes. Este tipo de cenário não se tem muito espaço na mídia, conseqüentemente ocorrências de incidentes ambientais menores também não chegam ao conhecimento da população, como é o caso de contaminações de solos por derivados do petróleo. Podemos perceber a superficialidade com que é tratado o tema, em um dos maiores portais de notícias nacional (G1), em noticiar o tombamento de um caminhão, que transportava óleo lubrificante na BR-262 em 30/03/2021, e em nenhum momento se comenta as condições e conseqüências do solo com essa quantidade de contaminante.

O refino de petróleo existe por muitas finalidades, dentre elas: - Automotivo, o combustível que o seu veículo usa é resultado de muita pesquisa aplicando a mais alta tecnologia e os mais rigorosos padrões de qualidade; Industriais, desenvolvemos produtos para a indústria brasileira com qualidade e tecnologia reconhecidas mundialmente; Pavimentação, pavimento é a construção com o objetivo de resistir aos esforços oriundos do tráfego e do clima. Grande parte das estradas e ruas pavimentadas no Brasil utilizam revestimento asfáltico; Aviação, os combustíveis de aviação Petrobras seguem as melhores práticas internacionais, levando nossa qualidade aos céus do mundo todo; Óleo Diesel Não Rodoviário, fornecemos também óleo diesel adequado a aplicações não rodoviárias, como geração termelétrica de energia, transporte ferroviário de carga e passageiros e algumas modalidades de mineração a céu aberto; Marítimos, Nossa marca também impulsiona barcos e navios (Petrobrás, 2021).

Para suprir esta enorme demanda, nosso parque de refino produz diversos derivados por dia, como diesel, gasolina, nafta, querosene de aviação, gás liquefeito de petróleo, lubrificantes, entre outras substâncias que servem de matéria prima para diversos outros produtos. Hoje, a produção do pré-sal, em águas ultraprofundas, já é uma realidade consolidada. Nossas atividades estão focadas em reservatórios de petróleo em águas profundas e ultraprofundas no Brasil, que representaram 95% de nossa produção total em 2021 (Petrobrás, 2021). Segundo a Petrobras, as três refinarias (Reduc, RLAM e Lubnor) capazes de produzir óleos básicos lubrificantes tem capacidade nominal de aproximadamente 800 mil m³/ano, embora a produção atual seja aproximadamente 600 mil m³/ano desde 2009. Nos próximos anos não se projetam novas unidades para produção de lubrificantes no País. Desta forma, como a demanda por óleos básicos lubrificantes não é atendida pela produção, o país se manterá importador destes derivados. (EPE, 2018). Ainda segundo a Agência Nacional de Petróleo, no Boletim de Lubrificantes 01/2019, no mercado interno foram vendidos 85.309,31 m³ de lubrificantes acabados. E 111.077,37 m³ de óleos lubrificantes acabados dispensados de coletas, sobre as quais não incide metas de coleta de óleo lubrificante usado ou contaminado, de acordo com a Resolução CONAMA nº 362/2005.

O óleo lubrificante automotivo tem a função de retardar o desgaste das peças metálicas do motor, promovendo maior vida útil para os veículos. O óleo ainda dispersa o calor presente, protege contra oxidação, reduz o atrito e consequentemente os ruídos produzidos. Em sua constituição, o óleo lubrificante possui muitos aditivos, tais como cromo, chumbo, cádmio, arsênio e entre outros que são bioacumulativos, e podem levar a doenças degenerativas e cancerígenas em seres humanos. Um óleo lubrificante novo representa um produto com certo grau de perigo, isto porque, além de ser feito basicamente a partir do petróleo, geralmente contém diversos tipos de aditivos que, em altas concentrações, são severamente tóxicos (Amarante; Alva, 2018). Devido todo esse poder de contaminação, a Norma Brasileira NBR 10.0004 (ABNT, 2004) especificamente sob o código F-130, prevê seu descarte, que deve ser o mais correto possível. Como manda a Resolução Conama nº 362, de 23 de junho de 2005 que estabelece que todo óleo lubrificante usado ou contaminado (OLUC) deverá ser recolhido, coletado

e ter destinação final de modo que não afete negativamente o meio ambiente e propicie a máxima recuperação dos seus constituintes.

Quando descartados no solo, como descreve o Guia Básico de Gerenciamento de OLUC (2011), ou quando vaza no solo, inutiliza o solo atingido, tanto para a agricultura, quanto para a edificação, matando a vegetação e os microorganismos, destruindo o húmus, causando infertilidade da área que pode se tornar uma fonte de vapores de hidrocarbonetos. Ainda segundo o Guia Básico de Gerenciamento de OLUC (2011), os efeitos dos metais presentes na composição dos óleos lubrificantes são diversos ao organismo humano como: câncer nos pulmões e traquéias, acúmulo de metais principalmente nos rins, ossos e fígado, câncer de pele e intoxicação aguda. São alguns dos principais problemas causados pela toxicidade dos óleos lubrificantes automotivos.

Neste contexto, a biorremediação é uma tecnologia ambiental utilizada para tratar contaminações locais com o uso de componentes biológicos capazes de decompor o poluente em moléculas mais simples. A biorremediação pode ocorrer de forma intrínseca ou natural, isto é, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação, mas também pode ser bioestimulada com a adição de nutrientes, oxigênio e surfactantes, ou ainda pode ser bioampliada com a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (Bisogninl et al., 2017). A biodegradação de hidrocarbonetos complexos geralmente requer a cooperação de mais de uma espécie. Isto é particularmente verdadeiro em poluentes que são constituídos de muitos compostos diferentes, tais como o petróleo bruto. Microrganismos individuais podem metabolizar apenas uma gama limitada de substratos de hidrocarbonetos. Por outro lado, grupos de microrganismos (populações mistas) com grandes capacidades enzimáticas são necessárias para viabilizar uma elevada taxa e extensão da biodegradação dos derivados de petróleo (Kronbauer et al., 2022).

No contexto ecológico, populações de *Bacillus subtilis* têm como habitat natural o solo, o mesmo que abriga uma complexa comunidade biológica, da qual microrganismos procariotos e eucariotos constituem maioria, tanto em número quanto em diversidade. No entanto, aquele procarioto pode ocupar nichos ecológicos distintos em associação com plantas, estabelecendo-se na rizosfera, rizoplano, filoplano e nos tecidos internos, onde se multiplicam, sobrevivem e se

protegem da ação antagonística do restante da microflora autóctone (Filho et al., 2010).

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram-positiva, não patogênica, sendo amplamente utilizada na produção de enzimas extracelulares em escala mundial. Quando exposta a um meio que apresenta deficiência de nutrientes, o *B. subtilis* produz um tipo de célula morfológicamente distinta, denominada de esporo. Os esporos de *B. subtilis*, apresentam propriedades de resistência, capazes de sobreviver por longos períodos de tempo sob condições extremas de estresse. Devido a sua estabilidade e segurança, o esporo é uma ferramenta biotecnológica ideal pois suporta alta temperatura, dessecação, ausência de nutrientes e exposição a solventes químicos, tais características facilitam o armazenamento e o transporte dos mesmos (Alves, 2018).

A espécie *Bacillus amyloliquefaciens* tem sido extensivamente estudada e tem afinidade filogenética com *B. subtilis*; por muito tempo foi até considerado seu subespécies. Estudos desenvolvidos com *B. amyloliquefaciens* associaram o uso dessa bactéria ao aumento defesa vegetal, apresentando resultados positivos no controle de nematóides e outros microorganismos. Além disso, há relatos de que, quando utilizado em diferentes espécies de cultivo, o benefício não se restringe apenas ao controle de doenças, mas também promove o crescimento das plantas, como observado em diversas culturas como arroz, eucalipto, trigo e tomate, entre outros (Rios et al., 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a possibilidade de potencialização da biodegradação de óleo lubrificante automotivo em solo tipo argissolo vermelho com a adição de uma associação de microrganismos *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*.

2.2 Objetivos Específicos

- Reconstruir o sistema do Respirômetro de Bartha de maneira que possa ser facilmente replicado, utilizando materiais recicláveis e de baixo custo, mantendo a eficiência e a reprodutibilidade;
- Testar a taxa de respiração das bactérias *per se* e em associação;
- Analisar, de maneira comparativa, os desempenhos gerados pelas diferentes proporções de remediadores;

3 JUSTIFICATIVA

A degradação de hidrocarbonetos segue sendo um dos grandes problemas na área ambiental e grande desafio para o ramo científico. Devido a sua estabilidade molecular, os hidrocarbonetos são poluentes persistentes no meio ambiente, resistentes a degradações químicas e biológicas. Ainda são bioacumulativos, se acumulando nos seres vivos ao longo de suas vidas podendo causar câncer, danos ao sistema nervoso e central, sistema muscular, distúrbios renais, dentre outros.

As dificuldades de se tratar um solo contaminado, como lentidão nas respostas de degradação, altos custos para procedimentos ex-situ e cuidados na seleção microbiana para não ocorrer desequilíbrio ecológico. Também são alguns fatores que dificultam a implementação e desenvolvimento da técnica de biorremediação.

Com intenção de somar mais conhecimento e uma potencial ajuda para solucionar esse problema em questão, o trabalho tentou desenvolver proporções de bactérias capazes de remediar o solo contaminado, de maneira que possa ser replicado facilmente, com mais acessibilidade econômica e possibilitar um benefício ao meio ambiente sem causar desequilíbrio ecológico.

O sucesso desta pesquisa tem a possibilidade de gerar uma via alternativa de remediação, através de associação de microrganismos conhecidos, barato e de fácil acesso aos produtores e consumidores, e de maneira ecologicamente equilibrada. Resolvendo assim um problema ambiental de escala mundial e de extrema popularidade a qualquer nação.

4 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Definição de solo

O solo é o resultado de um paciente trabalho da natureza. Partículas (minerais e orgânicas) vão sendo depositadas em camadas (horizontes) devido à ação da chuva, do vento, do calor, do frio e de organismos (fungos, bactérias, minhocas, formigas e cupins) que vão desgastando as rochas de forma lenta no relevo da terra. Para que se ter ideia de como esse processo de formação do solo é lento e paciente, saiba que são necessários cerca de 400 anos para se formar 1 cm (um centímetro) de solo. (EMBRAPA, 2023)

4.2 Classificação e caracterização do solo

A classificação de um solo é obtida a partir da avaliação dos dados morfológicos, físicos, químicos e mineralógicos do perfil que o representa. Aspectos ambientais do local do perfil, tais como clima, vegetação, relevo, material originário, condições hídricas, características externas ao solo e relações solo-paisagem, são também utilizadas.

A classificação de um solo se inicia com a descrição morfológica do perfil e coleta de material de campo, que devem ser conduzidas conforme critérios estabelecidos em manuais (IBGE, 2005; Lemos; Santos, 1996; Santos et al., 2005), observando-se o máximo de zelo, paciência e critério na descrição do perfil e da paisagem que ele ocupa no ecossistema.

As características morfológicas observadas em campo necessitam ser descritas de forma completa, conforme os referidos manuais, recomendando-se os cuidados necessários para registrar com exatidão a designação dos horizontes do perfil (EMBRAPA, 1988b; Santos et al., 2005) e todas as características morfológicas usuais e extraordinárias. São muito relevantes as anotações quanto ao fendilhamento do solo, microrrelevo (gilgai), cores indicativas de oxidação e redução, altura e flutuação do lençol freático, horizontes ou camadas coesas ou compactadas, profundidade das raízes no perfil, atividade biológica ao longo do perfil e quaisquer ocorrências pouco usuais ou extraordinárias (EMBRAPA, 2022).

4.3 Óleos Lubrificantes Usados ou Contaminados (OLUC)

OLUC é a abreviação de Óleo Lubrificante Usado ou Contaminado, após retirado do motor ou equipamento, passa a ser um resíduo perigoso chamado óleo lubrificante usado ou contaminado, conhecido popularmente como “óleo queimado”, denominação que não é correta e deve ser evitada (Gerenciamento de oluc, 2001). Como adendo ao sobredito, por mais que o termo venha a ser incorreto, é o termo popular e mais utilizado em ambientes onde tenham a presença do óleo pós uso. Assim popularizando e facilitando a linguagem do trabalho apresentado.

Os óleos básicos lubrificantes são usados na formulação dos diversos tipos de produtos, com aplicações tais como óleos para motor, sistemas hidráulicos, óleos para turbinas, mancais e compressores, além de usos em que sua função não é lubrificar, como óleos isolantes (Petrobrás, 2022).

4.4 Toxicidade do óleo

O óleo lubrificante usado ou contaminado é considerado como um resíduo perigoso de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e por isso é de extrema importância que haja um cuidado especial na coleta, armazenagem, transporte e descarte do mesmo. Ele possui produtos resultantes da sua utilização, como por exemplo metais pesados, que podem ser extremamente prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente (Schuelter, 2014).

Do ponto de vista ambiental, os óleos lubrificantes não são solúveis em água e também não são biodegradáveis, eles impedem a passagem de oxigênio através de outros meios e ainda espalham substâncias tóxicas no meio ambiente, podendo causar intoxicação na fauna aquática pela presença de compostos como o tolueno, o benzeno e o xileno, entre outros. Os compostos químicos existentes nos óleos lubrificantes usados produzem efeitos diretos sobre a saúde humana e vários deles são cancerígenos. O desperdício e a poluição pelo uso do óleo lubrificante automotivo usado podem ser evitados quando há a troca do mesmo em local especializado e licenciado para este fim. Nestes locais, o óleo é recolhido e encaminhado para o destino ambientalmente correto, conforme legislação ambiental vigente (Schuelter, 2014).

4.5 Biorremediação

A biorremediação é definida como sendo o uso de processos biológicos para degradar, transformar e/ou remover contaminantes de uma matriz ambiental, como água ou solo. A biorremediação é um processo que ocorre naturalmente pela ação de bactérias, fungos e plantas, onde os processos metabólicos destes organismos são capazes de utilizar estes contaminantes como fonte de carbono e energia. A atenuação natural monitorada é um conceito pelo qual uma área contaminada é remediada por biodegradação natural. Para a correta avaliação destes processos, uma combinação de métodos químicos e biológicos é normalmente utilizada (UNIFESP, 2022).

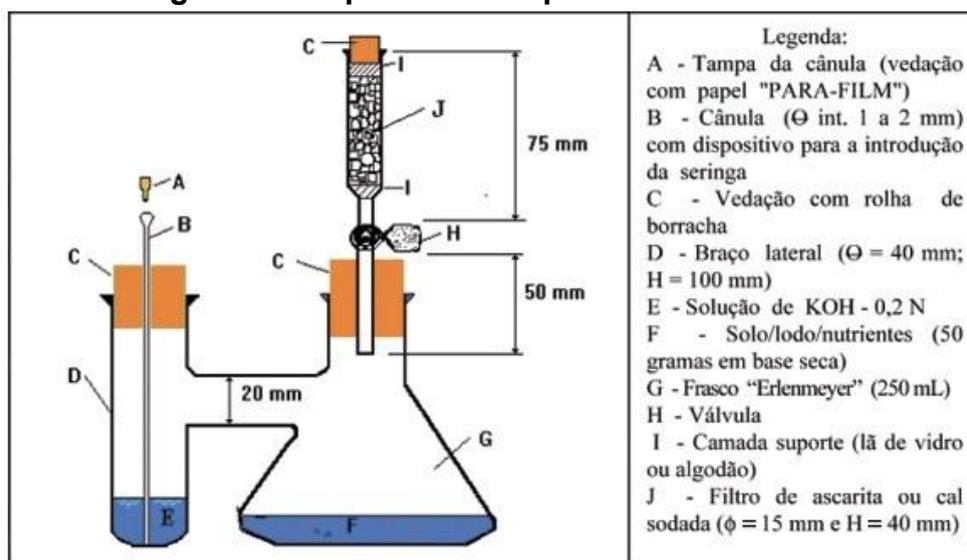
A biorremediação é entendida como um processo que envolve degradação de produtos tóxicos, transformando-os em produtos não tóxicos. A remoção ou redução destes contaminantes tóxicos no ambiente pode ser entendida também como uma forma de biorremediação (Fontes, 2018).

As estratégias de biorremediação incluem: a utilização de microrganismos autóctones, ou seja, do próprio local, sem qualquer interferência de outras tecnologias ativas de remediação, conhecida como biorremediação intrínseca ou natural; a adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e surfactantes, processo conhecido como bioestimulação e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos, denominados de bioaumentação (Kronbauer et al., 2022).

4.6 Respirômetro de Bartha

O respirômetro é um sistema fechado, constituído de duas câmaras interligadas, onde ocorrem, na primeira, a biodegradação dos compostos orgânicos por microrganismos nativos ou introduzidos no solo e a produção dos gases ácidos que é transferido para a segunda câmara, onde se dissolve numa solução de hidróxido de potássio. A quantificação dos gases ácidos é feita regularmente pela retirada e titulação da solução de hidróxido de potássio, mostrando assim o comportamento da atividade microbiana (Mello *et al.*, 2007).

Figura 1 - Esquema do respirômetro de Bartha



Fonte: (Mello *et al.*, 2007).

4.7 Filtro absorvedor de Dióxido de Carbono

Filtro é um aparelho/sistema que se faz a passagem de um fluido para retenção de corpos em suspensão os quais não são desejados. Tem como finalidade a filtragem de gases indesejados para dentro do respirômetro, filtrando-os e possibilitando a entrada, apenas, do oxigênio. Essa injeção de O₂ tem como objetivo a potencialização das bactérias na degradação do óleo lubrificante contaminado.

A cal sodada é um absorvedor de dióxido de carbono bastante utilizada nos aparelhos de anestesia, permitindo que seja utilizado um baixo fluxo de gases frescos e reduzir o consumo de anestésico (Arai; Azevedo, 2011).

Possui um tempo de vida útil limitado e deve ser trocada quando for perceptível a mudança de coloração. Uma cal sodada em boas condições possui a cor branca, enquanto que uma cal sodada saturada tem sua cor alterada para violeta/azulada/roxa, indicando a necessidade de troca (Sobecc, 2017).

4.8 *Bacillus amyloliquefaciens*

De acordo com Welker e Campbell (1967) *Bacillus amyloliquefaciens*, são bastonetes Gram-positivos, móveis por flagelos peritricos, catalase positivos e formadores de esporos. Esta bactéria possui comportamento bioquímico semelhante ao do *Bacillus subtilis*, porém com maior produção de α -amilase e maior percentual molecular das bases guanina + citosina do seu DNA. Seu perfil bioquímico se caracteriza por provocar hidrólise do amido, produzir acetimetil carbinol, fermentar carboidratos como glicose, sacarose e lactose com produção de gás, hidrolisar a gelatina e reduzir nitrato a nitrito (Petrillo, 2015).

Bacillus amyloliquefaciens produz uma diversidade de enzimas, tais como: α -amilase, galactanase, isoamilase, mananase, xilanase, metal protease, serina protease, fosfatase alcalina, ribonuclease (Priest, 1977). Já existem muitas aplicações industriais das enzimas produzidas por *B. amyloliquefaciens*: as proteases alcalinas são muito utilizadas na indústria de detergentes e as amilases são utilizadas na indústria de bebidas (Lisbôa, 2006, p. 17).

4.9 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis é uma bactéria gram-positiva não patogênica, amplamente utilizada na produção de enzimas extracelulares em escala mundial. Esta bactéria recebeu o status GRAS (*generally regarded as safe*) pelo FDA Americano (agência reguladora ligada ao departamento de saúde do governo norte-americano), é uma das mais estudadas, tendo seu genoma e características bem elucidadas. O *B. subtilis*, quando submetido a um ambiente escasso em nutrientes, produz uma célula morfológica distinta chamada esporo (Wang; Wang; Yang, 2017). Esses esporos possuem grande resistência, podendo sobreviver extremos de temperaturas (altas ou baixas), além de outras condições adversas. Ademais, *B. subtilis* tem um histórico de segurança incontestável, pois seus esporos são muito utilizados como probióticos para humanos e animais, em algumas regiões da Ásia e da África, na qual existe um grande consumo de alimentos à base de esporos (Alves et al., 2018).

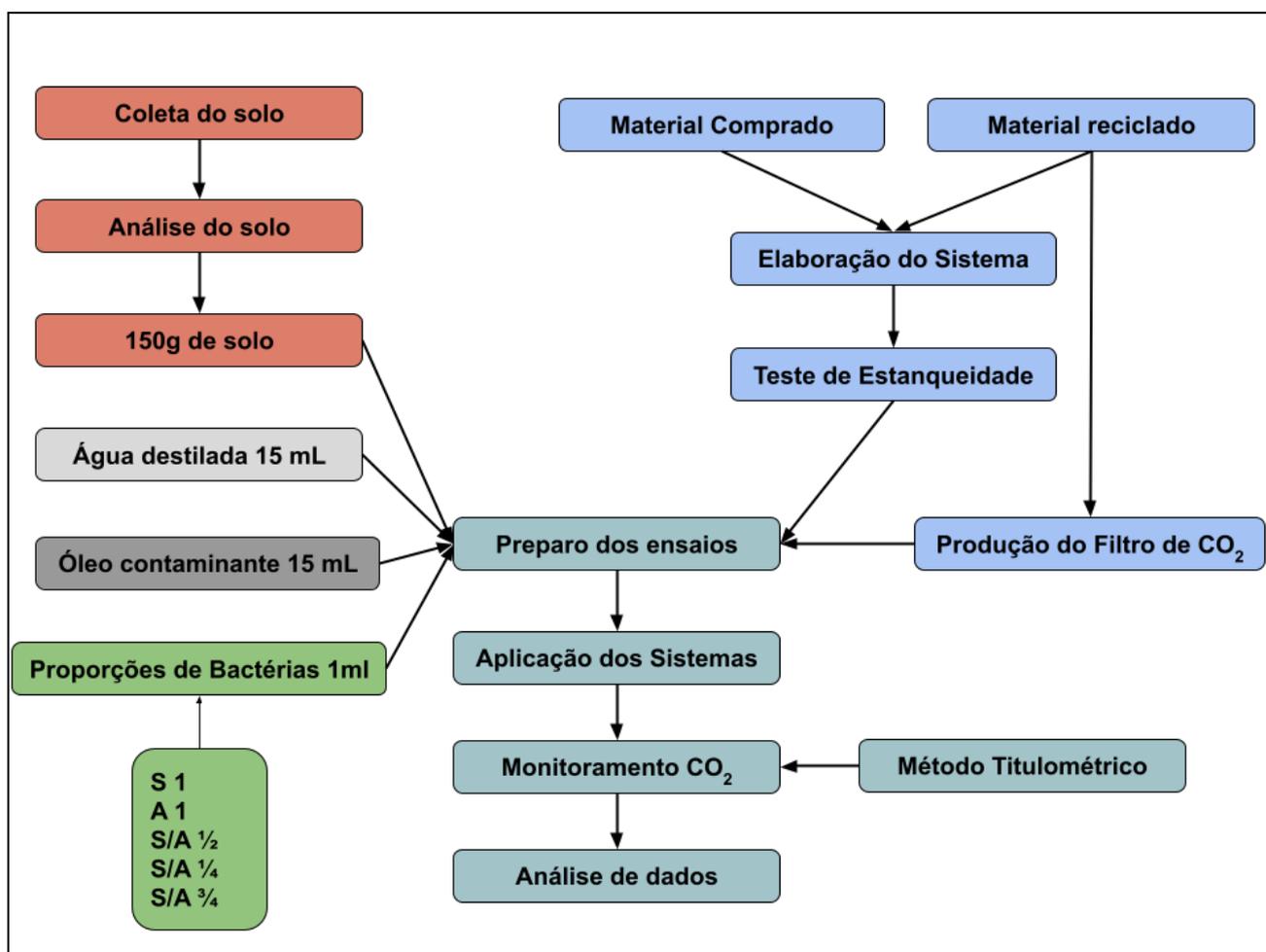
Lanna Filho et al., (2010) destacaram entre as versatilidades desta espécie, a capacidade de formar endósporo em condições desfavoráveis (temperatura, osmolaridade ou escassez de nutriente). A habilidade de bactérias formadoras de endósporos permanecerem metabolicamente dormentes por longos períodos,

aumenta sua sobrevivência na superfície foliar, possibilitando sua permanência em períodos secos, temperaturas extremas e na deficiência temporária de nutrientes (Vargas, 2020).

5 METODOLOGIA

Após estudos sobre o procedimento a ser usado como método avaliativo, foram iniciados os primeiros ensaios laboratoriais no Centro de Ciências e Tecnologias Ambientais (CCTA) da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) campus Caçapava do Sul. Buscando sempre o uso de materiais de fácil acesso, visando o reuso de material, baixo custo e simplificando o método para ampliar a reprodução do trabalho.

Figura 2 - Fluxograma metodológico

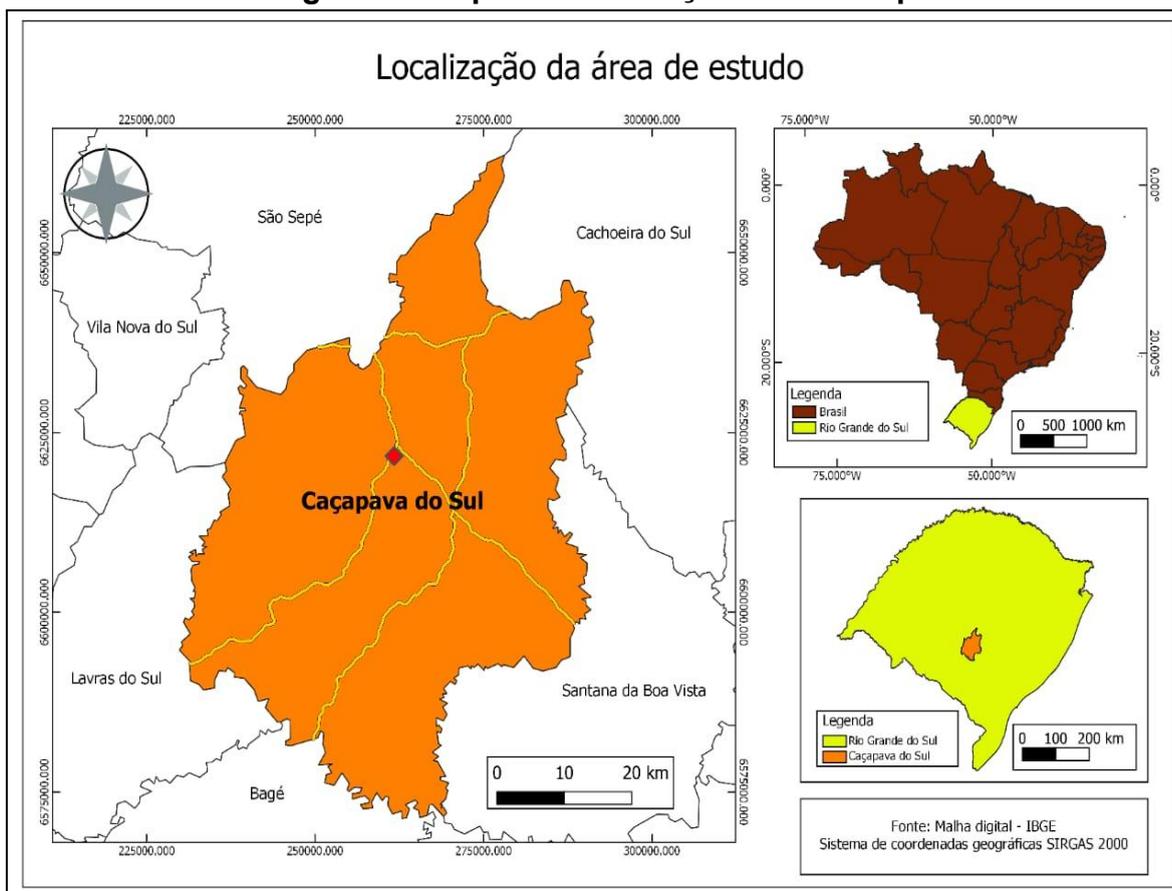


Fonte: O autor (2023)

5.1 Localização e caracterização do solo

As amostras de solo foram coletadas nas margens da Universidade, na Avenida Pedro Anunciação, 111 - Bairro Vila Batista - Caçapava do Sul, RS. Para os métodos analíticos foram usado o roteiro da EMBRAPA do Manual de Métodos de Análise de Solo para análises de solo.

Figura 3 - Mapa de localização do município



O local de retirada das amostras foi escolhido devido a sua localidade e por ser em uma beira de estrada, característica desejada por possibilitar a comparação com um derramamento acidental de um veículo qualquer parado na beira da estrada.

5.2 Pedologia

O município de Caçapava do Sul está sob quatro tipos de solo, segundo a Embrapa no mapa de solos do Brasil, sendo eles; Argissolos Vermelho-Amarelo Distróficos, Neossolos Líticos Eutróficos, Luvisolos Crômicos Órticos, Planossolos Háplicos Eutróficos e, por fim, Argissolos Vermelhos Distróficos. Vale ressaltar que trabalhamos com o horizonte A do solo, onde possui muita interação de matéria, alta atividade biológica orgânica e exposição direta com o intemperismo.

Argissolos de cores vermelhas acentuadas devido a teores mais altos e à natureza dos óxidos de ferro presentes no material originário, em ambientes bem drenados. Apresenta fertilidade natural muito variável devido à diversidade de materiais de origem. O teor de argila no horizonte subsuperficial (de cor vermelha) é bem maior do que no horizonte superficial, sendo esse incremento de argila percebido sem dificuldade quando se faz o exame de textura, no campo. (EMBRAPA, 2021)

5.3 Análises Físicas

Para as análises físicas foi utilizado o Manual de Métodos de Análise de Solo da EMBRAPA, para isso foi retirado da superfície do solo as folhas, gravetos e demais restos culturais que possam comprometer a qualidade da amostragem. Como o objetivo da análise de solo é obter um resultado representativo da área, não retira-se amostras simples próximas a casa, depósito de adubo e corretivos, cerca, brejos, voçorocas, curva de nível, árvores, sulcos de erosão, formigueiros, cupinzeiros, esterco, caminho, carreador, ou qualquer outra mancha não representativa da área (EMBRAPA, 2022).

Figura 4 - Perfil de solo



Fonte: o autor (2022)

5.3.1 Preparo das amostras

Para a determinação de TFSA (Terra Fina Seca ao Ar), Cascalho e Calhaus, foi usado o Manual de Métodos de Análise de Solo da EMBRAPA de 2017. Segue os passos adaptados para o procedimento da pesquisa:

Colocamos as amostras coletadas em bandejas para secagem, espalhamos e destorroamos os torrões existentes manualmente.

Deixamos em local ventilado e seco até completar a dessecação ao ar.

Após a secagem, pesamos e anotamos a massa da amostra (TSA) que foi preparada.

Procedemos o destorroamento do solo colocando a amostra sobre a peça de borracha separado para um lado a fração grosseira destacável. Pressionamos manualmente um rolo de madeira até desfazer os torrões maiores.

Passamos a amostra de solo destorroada pela peneira de malha 2 mm. As partículas individuais maiores que 2 mm (cascalho, calhaus e matacões) ficaram retidas na peneira. A fração que passou pela peneira é a terra fina seca ao ar (TFSA) que foi utilizada na análise granulométrica.

O material retido foi colocado em béquer com água (até cobrir a amostra), mais 10 mL de NaOH mol/L, agitado com o auxílio de um bastão várias vezes. Após, colocamos novamente este material sobre a peneira e lavamos com água.

Após a lavagem, passamos o material retido para recipiente identificado e deixamos secar em estufa, à 105 °C, por 24h. Após seco, resfriado e procedemos a separação de cada fração (cascalho, calhaus e matacões), utilizando o conjunto de peneiras montadas na ordem crescente de tamanho de abertura de malhas das peneiras: fundo, 20mm e 200mm.

A fração retida em cada peneira foi então pesada e calculada a proporção dessas frações em relação à massa total inicial da amostra descontada a umidade do solo, ou proporção da terra fina seca em estufa (TFSE) (EMBRAPA, 2017).

5.3.2 Análise Granulométrica

O procedimento seguido foi adaptado do Manual de Métodos de Análise de Solo da EMBRAPA de 2017. Para solos “normais” sem concentrações elevadas de matéria orgânica ou de sais solúveis. (EMBRAPA, 2017)

A análise granulométrica busca a quantificação da distribuição por tamanho das partículas individuais de minerais do solo, a caracterização granulométrica deve ser realizada para identificação textural das amostras com peneiramento para o material mais grosseiro e sedimentação para o material fino.

Pesamos 20,00 g de solo (TFSA).

Adicionamos aproximadamente 10 ml de água destilada e 10 ml de NaOH 1 mol/L. Agitamos com um bastão de vidro e deixamos em repouso por uma noite.

Transferimos para o copo do dispersor, adicionamos mais 150 mL de água destilada e agitamos por 15 minutos, a aproximadamente 12.000 rpm.

Ao final da dispersão transferimos a suspensão para proveta de 1000 mL, passando pela peneira número 270 (0,053 milímetros). Lavamos o material retido na peneira utilizando frasco lavador contendo água destilada. Tivemos o cuidado de não ultrapassar a marca de 1000 mL.

Transferimos as areias retidas na peneira para um recipiente previamente pesado, (utilizar balança com legibilidade de 0,01 g), e colocamos na estufa. Após 24 horas resfriado em dessecador e pesados. Separamos este material em areia grossa e fina, usando peneira número 70 (0,210mm).

Completamos o volume da proveta de até 1000 mL com água destilada e homogeneizamos o conteúdo da mesma com o bastão agitador manual por aproximadamente 1 minuto. Após, medimos a temperatura da suspensão e verificamos na tabela o tempo de espera para a pipetagem.

Preparamos os recipientes para argila: colocamos os recipientes, limpos, em estufa, por no mínimo 2 horas, resfriado em dessecador e pesados em balança com legibilidade 0,0001 gramas.

Após esperar o tempo de sedimentação, pipetamos 25 mL da suspensão contida na proveta, na profundidade de 5 cm, tendo o cuidado para não agitar a amostra durante a pipetagem. Fizemos uma sucção rápida e contínua para evitar o turbilhonamento.

Transferimos a suspensão pipetada para os recipientes previamente pesados e colocamos na estufa. Após secagem por 24 horas, transferimos em dessecador e pesamos novamente.

Fizemos uma prova em branco para calcular o peso do dispersante: colocamos 10 mL de NaOH 1 mol/L em proveta 1000 mL e completamos com água destilada. Agitamos com o bastão agitador manual, medimos a temperatura, esperamos o tempo de sedimentação. Após este tempo, pipetamos 25 mL da solução a 5 cm de profundidade e transferimos para um recipiente previamente pesado (usar balança com legibilidade 0,0001 gramas). Levamos o recipiente para a estufa, e após a secagem, resfriado em dessecador e pesado (EMBRAPA, 2017).

5.3.3 Determinação do Fator de correção (f) devido a umidade residual:

Passamos aproximadamente 20 g de TFSA e registramos o peso na planilha.

Colocamos a amostra em estufa (105°C) por um período de 24 horas.

Após seca, resfriamos a amostra em um dessecador e pesamos.

Calculamos “f” pelas seguintes fórmulas

A) $f = TSFA / TSFE$

B) $UR\% = (TFSA - TFSE) / TFSA$

5.3.4 Classificação textural

A classificação textural será realizada com base no triângulo textural, essa classificação leva em conta os teores de partículas tamanho argila, silte e areia presentes na amostra.

Essa etapa da análise visa quantificar a distribuição pelo tamanho da partícula dos minerais presente no solo, é necessário que se conheça a distribuição dos tamanhos das partículas pois somente a partir disso faz-se a identificação textural da amostra (EMBRAPA, 2017).

5.4 Análises Químicas

5.4.1 pH

O pH do solo é uma determinação da concentração de íons H^+ na solução do solo, que tem influência na disponibilidade de nutrientes. A medição do potencial hidrogeniônico por meio de eletrodo combinado imerso em suspensão solo:líquido (EMBRAPA, 2017).

Procedimento experimental:

Pesamos 10 g de solo (TFSA) e adicionamos em um copo plástico de 100 mL.

Adicionamos 25 mL de água destilada ou 25 mL de solução salina (KCl 1 mol L^{-1} ou $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}).

Agitamos a amostra com bastão de vidro individual por cerca de 60 segundos e deixamos em repouso 1 hora. Após, agitar ligeiramente cada amostra, mergulhamos os eletrodos na suspensão homogeneizada e procedemos a leitura do pH.

5.4.2 FRX- Quantificação de elementos químicos no solo

Para termos conhecimento dos elementos químicos presentes no solo, foram feitas triplicatas da amostra e pesadas em balanças de precisão, sendo 10 gramas cada uma.

As amostras foram colocadas em grandes bacias para secarem ao longo do dia em exposição solar, durante dois dias. Em seguidas foram peneiradas nas peneiras de malha 2 mm, esse material é denominado de Terra Fina Seca ao Ar (TFSA). O mesmo foi levado para ser analisado no Espectrômetro de Fluorescência de Raio X da marca BRUKER, modelo S1 TURBO SD, com tempo médio de 120 segundos. Os resultados foram obtidos por meio de uma planilha de porcentagem e em partes por milhão (ppm).

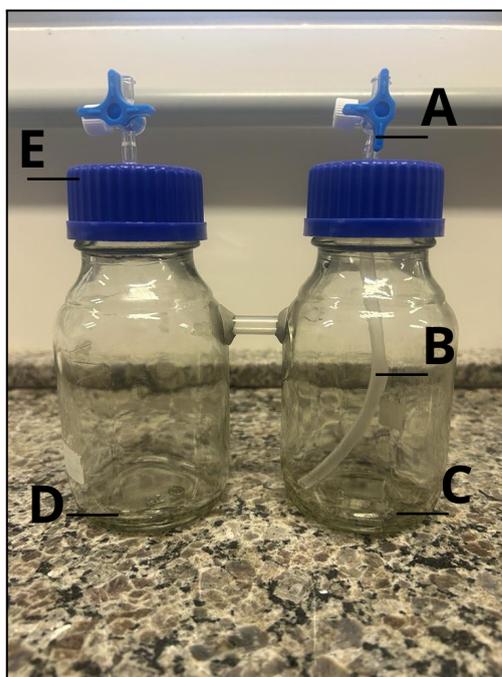
Os elementos encontrados e suas respectivas porcentagens de presença no solo encontram-se nos anexos com identificação de **Apêndice B**.

5.5 Respirômetro de Bartha

Para a recriação dos respirômetros foi utilizado frascos de vidro autoclavável de 250 ml, devido ao grande número empregado nas amostras foram utilizadas as garrafas que seriam descartadas da universidade, também pelo seu ótimo desempenho na contenção do gás. As mesmas eram de um único modelo visando equalizar uma possível interferência do material em questão.

Para montagem desse sistema foi utilizado frascos de vidro como as câmaras, tubos de vidro 8 mm para fazer o interligamento entre elas, massa epóxi bicomponente (Loctite Durepoxi) para a vedação dessa ligação e fita veda rosca (Liege) para não haver vazamento pela tampa. Para a retirada da alíquota a ser titulada e injeção de oxigênio foram instaladas torneirinhas de 3 vias (Harsoria). Esse sistema tem o intuito de facilitar o acesso a esse tipo de análise, reutilizar materiais e dar mais reprodutibilidade a esse estudo. Por fim, todas as componentes do sistemas foram lavados com sabão neutro e posteriormente com água destilada sem CO_2 para completa esterilização.

Figura 5 - Sistema do Respirômetro de Bartha



Fonte: o autor (2023)

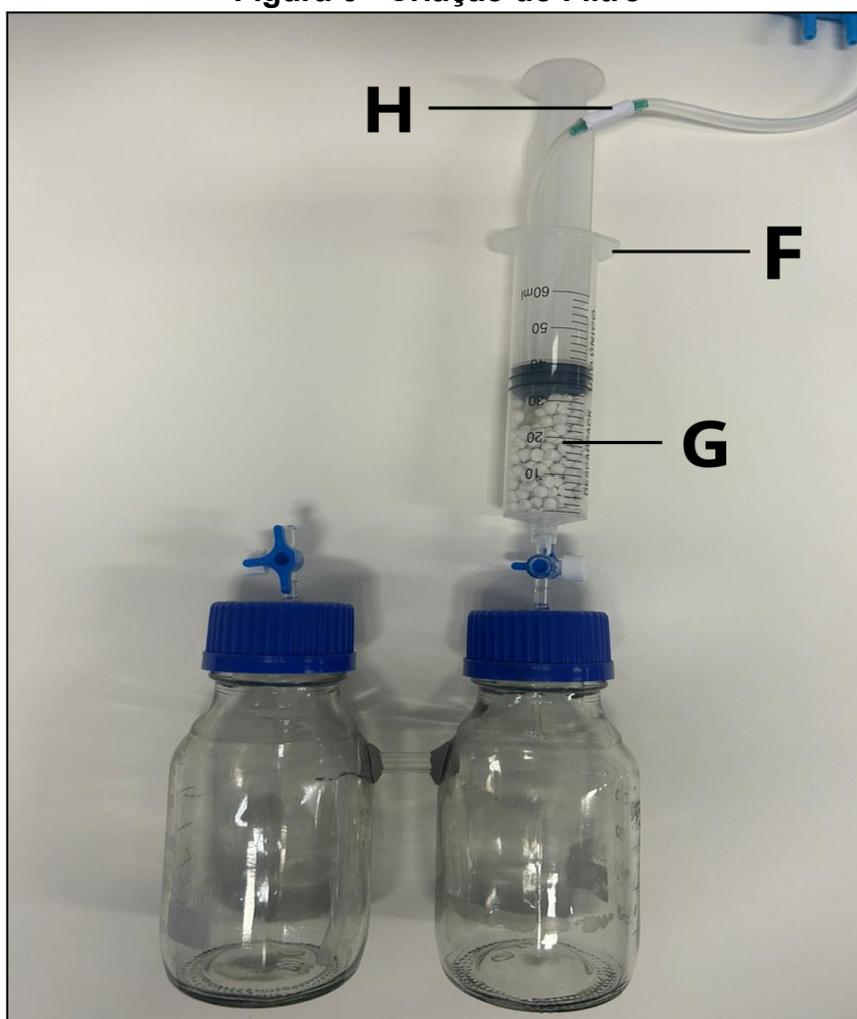
Legenda:

- A - Válvula de 3 vias (vedação via pressão pela diferença de diâmetro)
- B - Cânula de borracha (retirada da alíquota)
- C - Local do material (solo + contaminante + bactérias)
- D - Local do KOH (15 ml)
- E - Tampa de vedação (própria do recipiente)

5.6 Filtro para Dióxido de Carbono

Para o filtro foram utilizadas quatro seringas, de 60 mL, como câmaras de filtragem, em que foram furados seus êmbolos com uma parafusadeira e bruca de 4 milímetros. Passando a mangueira pela perfuração, os diâmetros em contato geraram pressão suficiente para conter o ar pressurizado dentro do sistema, por fim foi preenchida com um volume aproximado de 50 mL de Cal Sodada. Para a pressurização do ar, foi usada uma bomba de aquário comum.

Figura 6 - Criação do Filtro



Fonte: Acervo pessoal (2023)

Legenda:

F - Seringa padrão (60 ml)

G - Cal sodada

H - Cânula de condução de ar

5.7 Quantificação de gases ácidos

A quantificação da produção de gases ácidos foi realizada através da titulação da solução de hidróxido de potássio (KOH), onde o CO_2 estava dissolvido, com solução de ácido clorídrico (HCl). Para a titulação, foram adicionadas 2 gotas de fenolftaleína e 1 mL de solução de cloreto de bário ($BaCl_2$) 0,1 M em béquer. A solução contendo CO_2 dissolvida foi destinada a um erlenmeyer para a titulação e substituída por outra garrafa contendo KOH para continuar o monitoramento da biorremediação. A solução de KOH foi introduzida no béquer contendo a fenolftaleína e a solução de cloreto de bário. Foram realizadas três lavagens nos béqueres com 10 mL de água destilada isenta de CO_2 imediatamente após as titulações, foi feita a titulação da solução de KOH com a de HCl (0,1 M). A quantidade de ácido necessária para a viragem da coloração rosa para incolor era anotada e uma nova solução de KOH era posta imediatamente no respirômetro de Bartha. Para cada ensaio, foi realizada a prova em branco em um béquer contendo 10 mL de solução de KOH (0,1 M), 2 gotas de fenolftaleína, 1 mL de solução de cloreto de bário (1 M) e 30 mL de água destilada isenta de CO_2 . A produção de gás ácido no respirômetro foi calculada pela seguinte expressão (Mello *et al.*, 2007):

$$mgCO_2\text{ solo residual} = (A - B) * 50 * 0,044 * f_{HCl}$$

onde:

A= volume de solução de HCl 0,1 M gasto para titular a solução do KOH da prova em branco, em mL

B= volume de solução de HCl 0,1 M gasto para titular a solução de KOH do respirômetro com o solo, em mL

50*= fator para transformar equivalente em um mol de CO_2

0,044 = fator para transformar um mol de CO_2 em mg de CO_2

f_{HCl} = fator de solução de HCl 0,1 M.

5.8 Contaminação

O experimento metodológico foi dividido em situações, tendo em todas as mesmas etapas e o mesmo procedimento aplicado, os diferenciando apenas na concentração de remediadores no solo empregado em cada ensaio e temperatura. De forma a simular em escala laboratorial uma contaminação acidental, foi realizada a adição do óleo lubrificante ao solo coletado na proporção de 10% em relação ao peso/volume.

Quadro 1: Distribuição de Remediadores a 30°C

Amostras	Solo (g)	Amyloliuefaciens (1 ml) +/- 10000U	Subtilis (1 ml) +/- 10000U	contaminante (ml)
Branco	150	0	0	0
Controle	150	0	0	15
1	150	1	0	15
2	150	0	1	15
3	150	1/2	1/2	15
4	150	3/4	1/4	15
5	150	1/4	3/4	15

Quadro 2: Distribuição de Remediadores a 23°C

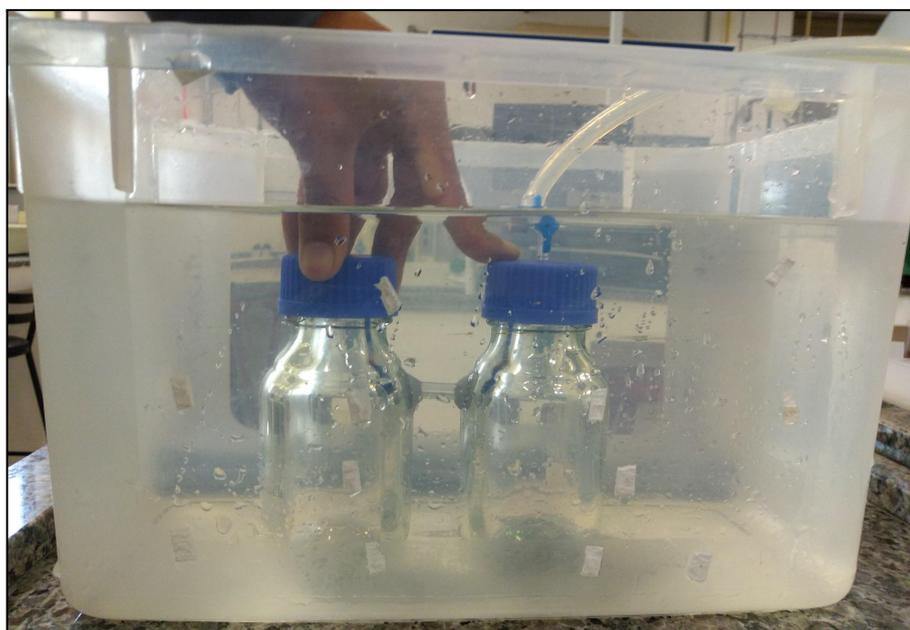
Amostras	Solo (g)	Amyloliuefaciens (1 ml) +/- 10000U	Subtilis (1 ml) +/- 10000U	contaminante (ml)
Branco	150	0	0	0
Controle	150	0	0	15
1	150	1	0	15
2	150	0	1	15
3	150	1/2	1/2	15

5.9 Teste de estanqueidade

Para o teste de estanqueidade foi utilizado um recipiente grande com água, em que era afundado o sistema de Bartha e feita a circulação de ar com pressão de maneira manual. Quando apresentava vazamento, sempre na parte superior de rosqueamento da tampa, era feito mais uso de fita veda rosca e testado novamente.

Para as válvulas (torneirinhas de 3 vias) foi feito furos nas tampas de plásticos com broca de madeira tamanho 4 mm, que coincidiu com o diâmetro das válvulas gerando pressão suficiente apenas no encaixe com as tampas.

Figura 7 - Teste de estanqueidade



Fonte: o autor (2023)

6 RESULTADOS

Confirmada a estanqueidade do sistema de Bartha, foram adicionados o sistema de Bartha (vidraria apenas) com o solo na autoclave, com o intuito de eliminar todo microrganismo que possa interferir no desempenho das bactérias escolhidas e mantidos em estufa a 25°C. E assim, posteriormente, foi descrito de maneira numérica os resultados obtidos para todas as análises citadas anteriormente.

6.1 Resultados de análise granulométrica

A análise granulométrica do solo em questão foi feita através da ficha analítica de análise granulométrica método da pipeta. Com esse resultado podemos calcular qual a porcentagem de argila, silte e areia, para fazer a classificação textural (EMBRAPA, 2023). Os solos arenosos, têm teores de areia superiores a 70%, são solos com boa aeração, e baixa capacidade de reter água. Solos arenosos e constituídos de granulação grossa e área superficial menor, o que significa que não apresentam capacidade de reter os contaminantes (EMBRAPA, 2018).

Quadro 3 - Determinação de TFSA

Identificação do Recipiente (I_1)	Massa (g)
Peso do Recipiente	100,6570
Peso do Recipiente + TFSA	128,0363
Peso da TFSA	27,3793

TFSA= Terra Fina Seca ao Ar

Quadro 4 - Pesagem das Areias

Identificação do Recipiente (I_2)	Massa (g)
Peso do Recipiente	101,7847
Peso do Recipiente + Areias	108,5238
Peso da Areia (PDA)	6,7391
Peso da Areia Grossa	4,9008
Peso da Areia Fina (PAF)	1,8106

Quadro 5 - Prova em Branco

Identificação do Recipiente da prova em branco (PB)	Massa (g)
Peso do Recipiente	99,1688
Peso do Recipiente + Dispersante (D)	99,2159
Peso do Dispersante (PD)	0,0471

Quadro 6 - Fator de Umidade

Identificação do Recipiente (I_3)	Massa (g)
Peso do Recipiente	30,7553
Número do Recipiente + TFSA	50,7644
Número do Recipiente + TFSE	49,4749
TFSA	20,0091
TFSE	19,7196
Fator Umidade (f)	1,0688

TFSE= Terra Fina Seca em Estufa

Quadro 7 - Argilas

Identificação do Recipiente (I_4)	Massa (g)
Peso do Recipiente	143,7636
Peso do Recipiente + Argila + D	144,0243
Peso da Argila (PA) + PD	0,2607
Peso da Argila	0,2136

Quadro 8 - Cálculos

Identificação	Operação
AG, % de areia grossa	$(PDA - PAF) \times 5 \times f$
AF, % de areia fina	$PAF \times 5 \times f$
% de argila	$PA \times 100 \times f$
% de silte	$100 - (\% \text{ de areia} + \% \text{ de argila})$
Fator de correção (f) devido a umidade residual	TFSA/TFSE

PA = peso da argila; **PD** = peso do dispersante; **PDA** = peso das areias; **PAF** = peso da areia fina; **AF** = areia fina; **AG** = areia grossa; **f** = fator de umidade residual; **TFSA** = terra fina seca ao ar; **TFSE** = terra fina seca em estufa.

Quadro 9 - Valores percentuais da Textura do Solo

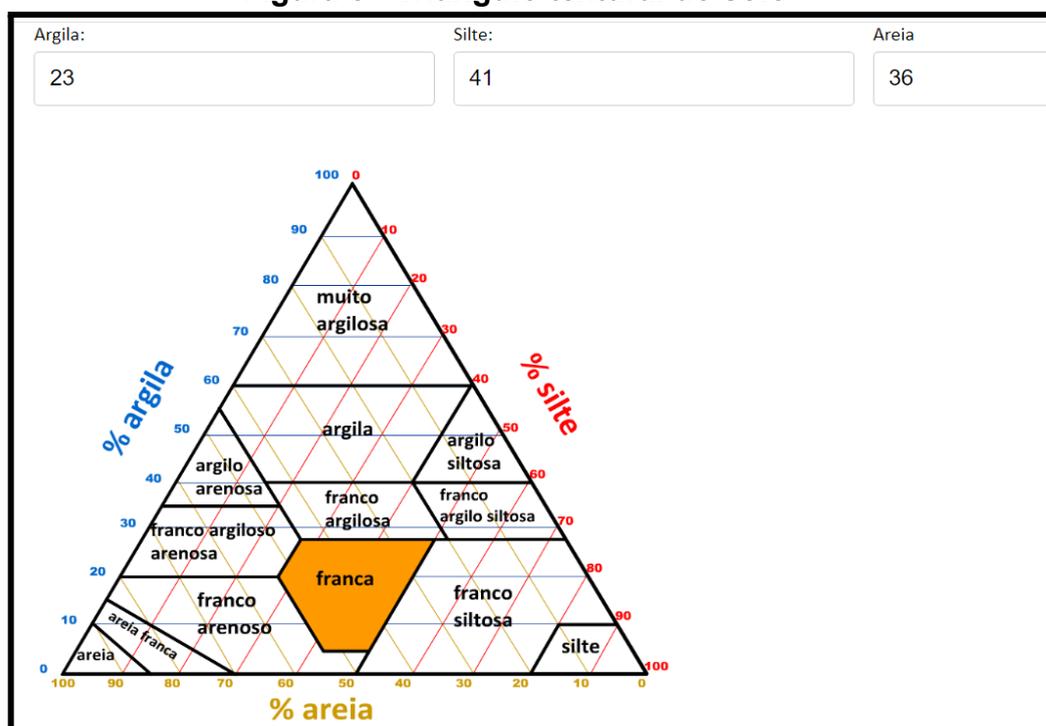
Composição	Percentual na amostra (%)
Areia Grossa	26,3379
Areia Fina	9,6758
Areia Total	36,0137
Argila	22,8295
Silte	41,2568
Classe Textural	Franca

6.2 Resultado da análise do triângulo textural

As tabelas anteriores, nos apresentam as porcentagem após cálculos, de 23% de argila, 41% de silte e 36% de areia. Textura média (franca): material com menos de 350 g kg⁻¹ de argila e mais de 150 g kg⁻¹ de areia, excluídas as classes texturais areia e areia franca.

Visto que o argissolo deve apresentar porcentagem de argila maiores que as outras composições, ressaltamos o fato de trabalharmos com o horizonte A do solo, fazendo com que os resultados se apresentassem um pouco diferente do esperado. Como está exposto diretamente a interação com o ambiente, apresenta leve tendência a arenoso devido a atividade biológica e intemperismo.

Figura 8 - Triângulo textural do solo



Fonte: (o autor, 2022)

6.3 Resultados pH

Com base no procedimento experimental da EMBRAPA, a análise de pH de um solo indica a capacidade dos metais, presentes no solo, que possuem para se solubilizar. O valor médio do pH entre as repetições de triplicatas é de 5,61.

6.4 Resultados de custo

A seguir foi feita uma tabela relacionando todo o material usado na produção dos respirômetros de Bartha adaptado, com a quantidade, forma de obtenção e o custo específico de cada item.

Quadro 10 - Custo material

Material	Quantidade	Obtenção	Custo (R\$)
Garrafa de vidro	30	Reaproveitado	0,00
Tubo de vidro	1 metro	Universidade	0,00
Furo nos vidros	30 unidades	Vidraria local	155,00
Durepox (vedação entre as garrafas)	1 (100 gramas)	Casa de construção	13,00
Cal sodada	1 kg	Magazine Medicine (site)	59,00
Seringas	4 unidades (60ml)	Universidade	0,00
Torneirinhas 3 vias	caixa com 50 uni.	Magazine Medicine (site)	52,00
Fita veda rosca	6 (25 metros x 12 mm)	Loja de construção (local)	48,00
Bacillus Subtilis	100 ml	doutoragronomo (site)	44,97
Bacillus Amyloliquefaciens	100 ml	doutoragronomo (site)	101,97
TOTAL			474,00

Fonte: Autor, 2023.

6.5 Resultados Sistema

Depois de confirmado a funcionalidade do sistema criado, foi feita a titulação do KOH em duas situações, sendo elas: sem oxigenação e temperatura de 30°C em estufa, e na outra oxigenando o sistema com O₂ filtrando pela cal sodada e temperatura constante de 23°C em estufa.

Figura 9 - Sistema de Bartha em funcionamento.



Fonte: Acervo pessoal

Foi notado que o sistema de Bartha possuía pressão interna quando era aberta as válvulas para a retirada das alíquotas de KOH destinadas à titulação. Outra ocasião que foi notada a mesma situação foi quando se fazia a injeção de oxigênio no sistema pela válvula do solo, que implicava em uma pressão interna grande a ponto de fazer o KOH sair pela válvula contrária.

Assim, provando que o Respirômetro de Bartha adaptado possuía os requisitos necessários para a contenção e isolamento do ambiente externo, sendo assim um êxito da pesquisa.

6.5.1 Desempenho do sistema sem oxigenação a 30°C

Neste caso, a única fonte de oxigênio era a que continha dentro das próprias garrafas antes de serem lacradas. As análises foram feitas em duplicatas para cada sistema de Bartha e feito a média entre elas. Segue, no quadro abaixo, a consumação de CO₂ (em mg) de cada situação e seus respectivos dias de análises. Foram feitas duas medidas basicamente, sete dias após a inoculação das bactérias no solo e dezesseis dias após a inoculação.

Quadro 12 - Produção de CO₂ (em miligramas) sem oxigenação e 30°C

	7 dias	16 dias
Controle	3,386 mg	4,389 mg
Amyloliqefaciens (1)	3,386 mg	5,016 mg
Subtilis (2)	4,201 mg	6,521 mg
A 50% + S 50% (3)	3,825 mg	2,884 mg
A 75% + S 25% (4)	4,453 mg	4,641 mg
A 25% + S 75% (5)	3,386 mg	4,326 mg

6.5.2 Desempenho do sistema com oxigenação a 23°C

Com a experiência anterior do surgimento dos fungos depois de 16 dias, nesta segunda situação foi colocado o sistema, junto com o solo, na autoclave. Para evitar a interferência de qualquer outro microrganismo que não fosse os estudados. Outra mudança foi a retirada de duas proporções, sendo elas a de $\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{4}$ da associação de *Bacillus* devido não se mostrar vantajosa comparada às outras situações.

Quadro 13 - Produção de CO₂ (em miligramas) com oxigenação e temperatura crescente ao longo do experimento

	7 dias (23° C)	16 dias (23° C)	24 dias (25° C)	37 dias (30° C)
Controle	7,27 mg	14,71 mg	22,45 mg	33,50
Amylolyticifaci ens (1)	6,07 mg	2,486 mg	7,93 mg	26,51
Subtilis (2)	5,51 mg	13,82 mg	12,63 mg	11,42
A 50% + S 50% (3)	2,10 mg	8,50 mg	22,55 mg	33,52

Para essa última situação, os resultados obtidos mostraram que a temperatura de 23°C é pouco efetiva para potencializar o processo de degradação, ainda que aliada com a injeção de oxigênio no sistema.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 Análise de custos

Os resultados relacionados aos custos de reprodução desse sistema foram comparados com o custo de obtenção dos Respirômetros de Bartha de uma empresa produtora do mesmo via e-commerce. Foi feito um pedido orçamentário para a empresa em questão, para fins comparativos e são descritos na tabela a seguir:

Quadro 14 - Comparação Orçamentária

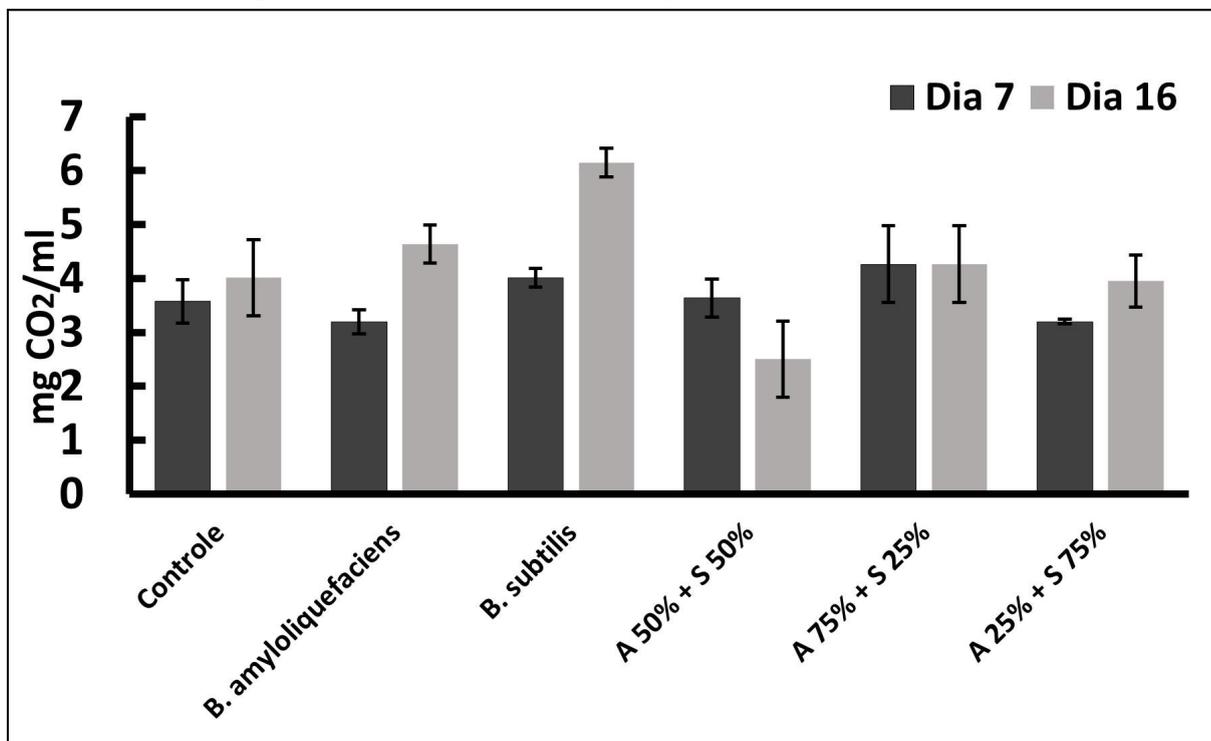
Respirômetro de Bartha	Quantidade necessária	Unidade	Total
Comercial	15	270,00	4050,00
Adaptação	15	17,90	268,50

Valores relacionados apenas à produção do sistema, supondo que os gastos com as bactérias e com a cal sodada sejam os mesmos, então conseguimos reduzir o custo em aproximadamente 93,4% quando comparado ao valor de um respirômetro comercial.

7.2 Análise de desempenho

7.2.1 Produção de CO₂ sem oxigenação e temperatura de 30°C.

Figura 10 - Gráfico de desempenho sem O₂ a 30°C.



A geração de dióxido de carbono foi calculada em dois momentos, sendo eles: sete dias e dezesseis dias após o sistema estar pronto. Pudemos perceber que a situação controle houve um aumento na produção de CO₂ de 3,5 mg para 4,0 mg do dia 7 ao dia 16 do experimento, respectivamente. Indicando que no solo, ou o próprio óleo contaminado, possuía microrganismos com a capacidade de degradação do óleo lubrificante, correspondendo a um aumento aproximado de 15% no total de CO₂ produzido ao longo do período.

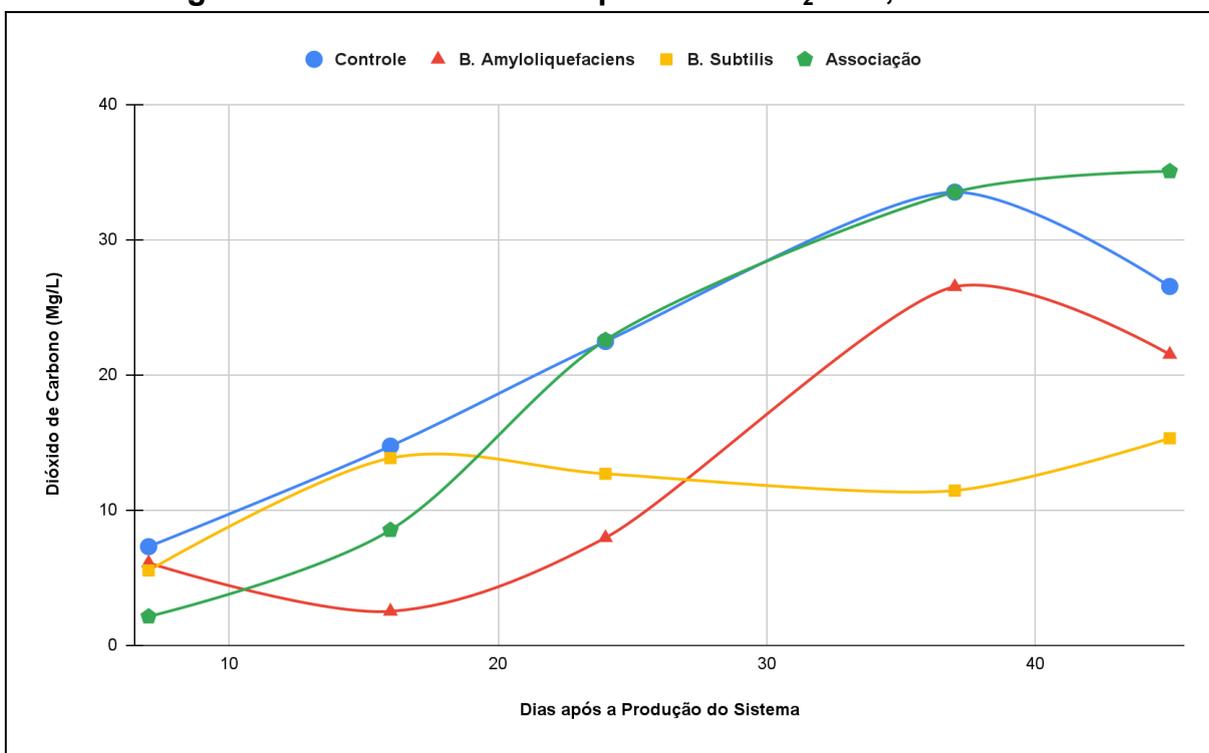
Na situação em que havia o *Bacillus amyloliquefaciens*, foi calculado um aumento de 3,3 mg para 4,8 mg de CO₂ do dia 7 ao dia 16, respectivamente, com um incremento de 1,5 mg de CO₂. Assim apresentando uma maior atividade respiratória no sistema e possivelmente aumento significativo na degradação do óleo queimado, este incremento corresponde a um aumento de 300% na produção de CO₂ quando comparado a produção de CO₂ no mesmo período do grupo controle.

Já a próxima situação era a que se encontrava o *Bacillus subtilis* como remediador. A produção de CO₂ foi de 4,2 mg no dia 7 para 6,1 mg no dia 16. Esses dados sinalizam um aumento da produção de CO₂ já no dia 7 do experimento, e uma acentuada taxa de respiração ao longo do período, resultando num incremento de CO₂ no sistema de 1,8 mg no período entre os experimentos, o equivalente a 360% da taxa de respiração quando comparado ao controle. Michiko Nakano et al. (1997), demonstrou que *Bacillus subtilis* é capaz de respiração anaeróbica por duas vias possíveis, fermentação e usando nitrato como aceptor final de elétrons. Estes dados estão em consonância com nossos resultados que demonstraram grande produção de CO₂ em situação de hipóxia.

Para as associações entre os bacillus que consistiam em diferentes proporções de cada indivíduo (A 50 + S 50%, A 75% + S 25% e A 25% e S 75%), houve uma diminuição da taxa de respiração na situação 50-50% de cada bacilo quando comparado ao grupo controle, enquanto que nas situações 75-25 e 25-75 os resultados foram semelhantes ao grupo controle. Em conjunto, nossos dados demonstram a eficiência de ambos os bacilos aqui testados em degradar resíduos derivados de óleo automotivo, bem como demonstra um efeito deletério das associações entre as duas espécies de bactérias quando testadas na situação aqui colocada.

7.2.2 Produção de CO₂ com oxigenação e temperatura de 23°C.

Figura 11 - Gráfico de desempenho com O₂ a 23, 25 e 30°C.



Foram feitas quatro leituras de produção de CO₂, para a situação controle houve um comportamento muito próximo de uma linearidade. Podendo indicar que os microrganismos ainda presentes no solo, ou no óleo, possivelmente conseguem operar uma degradação do contaminante, ou mesmo o decaimento espontâneo do óleo queimado. Lembrando que as inserções de oxigênio eram feitas por uma bomba de aquário comum, passando pelo filtro de cal sodada e assim oxigenando os respirômetros.

Para a situação 1, que especificamente é a presença exclusiva do *Bacillus amyloliquefaciens*, nos mostrou que possivelmente tenha ocorrido uma seleção artificial. Onde houve uma queda na produção do dióxido de carbono e em seguida um aumento quase que exponencialmente. Devido a muito baixa taxa respiratória nas duas primeiras análises, foi aumentado a temperatura gradativamente, primeiro para 25 e depois para 30°C. O grupo com o *Bacillus amyloliquefaciens* respondeu fortemente ao incremento da temperatura, aumentando a taxa de respiração, tendo entre os dias 24 e 37 do experimento uma produção de CO₂ duas vezes maior que

a do grupo controle. Indicando que esta espécie responde favoravelmente a alta temperatura e situação de normoxia.

Para a situação 2, presença apenas do *Bacillus subtilis*, houve um crescimento na produção CO₂ durante os 9 dias iniciais, ainda que no mesmo nível do controle. Do décimo sexto dia em diante foi notado que o comportamento apresentado se assemelha a uma linha estável. Aparentemente a população da bactéria colapsou em todos os sistemas, não tendo mais incremento algum na taxa de CO₂ produzido do 16 em diante, não respondendo a maior temperatura.

A situação 3, que consistia na associação entre ambas as espécies, houve um crescimento aparentemente linear e mais próximo do grupo controle. Ainda na última leitura, a temperatura da estufa foi mudada de 23°C para 30°C nos dois últimos dias antes da titulação, e foi justamente nesta leitura que o desempenho da associação ultrapassou o desempenho do controle. O que provavelmente pode estar relacionado com o aumento de temperatura, onde os microrganismos ainda presentes no controle melhor desempenhavam em 23°C, enquanto que a associação de *Bacillus* aparentemente melhor desempenha em 30°C.

De modo geral, nossos resultados apontam para uma maior atividade da *Bacillus subtilis* em situação de hipóxia, enquanto que *Bacillus amyloliquefaciens* apresentou alta atividade em temperaturas mais elevadas e na situação de normoxia. Em todas as situações e proporções aqui testadas, a associação das bactérias tiveram atividade menor que a bactéria por si só, e essas diferenças na atividade em ambientes opostos pode explicar porque a associação foi inferior às bactérias *per se* na degradação do óleo lubrificante queimado.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados obtidos concluímos que a produção do sistema de Bartha adaptado foi de extremo êxito, visto que o objetivo de dar acessibilidade e reprodutibilidade a pesquisa foi alcançado com redução de custo em 93%.

A primeira situação da pesquisa nos mostrou que as bactérias trabalharam de maneira mais efetiva quando separadas individualmente. Enquanto que a associação não apresentou o desempenho esperado. Nossos dados indicam o uso de *Bacillus amyloliquefaciens* em situações de normóxia e *Bacillus subtilis* em situações com baixos teores de oxigênio, evitando a associação de ambos.

Apesar de necessitar mais tempo de pesquisa e mais análises para elaboração dos resultados, as bactérias conseguiram apresentar potencial de biodegradação do hidrocarboneto e a adaptação do Respirômetro de Bartha foi adequado para a obtenção de respostas.

Por fim, fica de sugestão para trabalhos futuros: o crescimento e identificação de bactérias, em placas de petri, já presentes no solo. Os microrganismos também presentes no próprio óleo contaminado e por fim a identificação dos fungos e outros microrganismos que se proliferaram muito bem na primeira situação de análise.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL . Ano 4 / nº 24 / Janeiro 2019. **Boletim de Lubrificantes** , [S. l.], 01 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins-anp/bl/24/2019-01-boletim-lubrificantes.pdf> . Acesso em: 21 nov. 2022.

ALVES, Kessia Caroline Souza *et al.* **Bacillus subtilis: uma versátil ferramenta biotecnológica**: Biotecnologia. Scientia Amazonia, [S. l.], p. B15-B23, 21 mar. 2018. Disponível em: <https://scientia-amazonia.org/wp-content/uploads/2018/05/v7-n2-b15-b23-2018.pdf> . Acesso em: 14 nov. 2022.

AMARANTE, Ingrid Carin de Souza; ALVA, Juan Carlos Rossi. O caminho invisível do óleo, os impactos na saúde humana e os aspectos legais afetos aos direitos fundamentais. **Os impactos na saúde humana e no meio ambiente decorrentes do manejo e descarte indevidos dos resíduos de óleos lubrificantes** , [s. l.], 2018. Disponível em: <http://ri.ucsal.br:8080/jspui/bitstream/prefix/1218/1/Os%20impactos%20na%20sa%C3%BAde%20humana%20e%20no%20meio%20ambiente%20decorrentes%20do%20manejo%20e%20descarte%20indevidos%20dos%20res%C3%ADduos%20de%20%C3%B3leos%20lubrificantes.pdf> . Acesso em: 15 jun. 2022.

ARAI, L.A.C.; AZEVEDO, R.B. **Contaminação do aparelho de anestesia por agentes patógenos**. Revista Brasileira de Anestesiologia Vol. 61, No 1, Janeiro-Fevereiro, 2011.

BISOGNIN, Ramiro Pereira *et al.* **Análise do potencial microbiano de uma biopilha na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo**. SciELO, [S. l.], p. 517-526, 8 mar. 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/esa/a/yycGJ6XbhTLXbt dsfK9Tvgx/?lang=pt> . Acesso em: 16 nov. 2022.

CARVALHO, Bruno. **A Amazônia queimar novamente**. The New York Times Opinion, [S. l.], p. 1-1, 27 maio de 2020. Disponível em: <https://www.nytimes.com/pt/2020/05/27/opinion/international-world/amazonia-bolsonaro-quemas.html> . Acesso em: 4 nov. 2021.

CONSTITUIÇÃO FEDERAL BRASILEIRA. **Artigo nº 225, de 5 de outubro de 1988. CAPÍTULO VI DO MEIO AMBIENTE**. [S. l.], 2022. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm . Acesso em: 3 nov. 2022.

EMBRAPA. Argissolos Vermelhos. **Solos Tropicais**, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/solos-tropicais/sibcs/chave-do-sibcs/argissolos/argissolos-vermelhos> . Acesso em: 28 abr. 2023.

EMBRAPA. **Classificação de solos**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/solos/sibcs/classificacao-de-solos#:~:text=A%20classifica%C3%A7%C3%A3o%20de%20um%20solo,do%20perfil%20que%20o%20representa> m . Acesso em: 22 nov. 2022.

EMBRAPA, Solos. **O que é solo**, 2023. Disponível em: https://www.embrapa.br/contando-ciencia/solos/-/asset_publisher/1ZCT5VQ5Hj1S/content/o-que-e-e-como-se-forma-o-solo-/1355746?inheritRedirect=false#:~:text=O%20solo%20%C3%A9%20o%20resultado,lenta%20no%20relevo%20da%20terra . Acesso em: 16 jun. 2023.

EMBRAPA, Outros Atributos. **Grupamento Textural**, 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/solos/sibcs/atributos-do-solo/outros-atributos#:~:text=%C3%89%20a%20concentra%C3%A7%C3%A3o%20de%20material,aspecto%20lustroso%20e%20brilho%20graxo> . Acesso em: 21 jun. 2023.

EMBRAPA, **Manual de métodos de análise de solo** / Paulo César Teixeira ... [et al.], editores técnicos. – 3. ed. rev. e ampl. – Brasília, DF : Embrapa, 2017

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Panorama do Refino e da Petroquímica no Brasil**. [S. l.], 1 nov. 2018. Disponível em: https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-/topico-412/NT%20Refino%20e%20Petroqu%C3%ADmica_2018.11.01.pdf . Acesso em: 29 nov. 2022.

FILHO, Gerson Felipe da Costa. **Biodegradação de óleos derivados do petróleo e de origem vegetal estimulada por biossurfactantes em meio aquoso e monitoramento de sua toxicidade**. 2011. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ecologia) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro - SP, 2011.

FILHO, Roberto Lanna *et al.* **Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis***. Ciências Agrárias e Biológicas, [s. l.], 2010. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/233140814.pdf> . Acesso em: 23 jan. 2023.

FONTES, Livia de Carvalho. **Biorremediação**. [S. l.], 18 set. 2018. Disponível em: <https://microbiologia.icb.usp.br/cultura-e-extensao/textos-de-divulgacao/bacteriologia/microbiologia-ambiental/biorremediacao/> . Acesso em: 2 nov. 2022.

GIACOMOLLI, Maurício Angelo. **Aplicação de técnica de biorremediação em solo contaminado com derivado de petróleo monitorando a atividade microbiológica (diacetato de fluoresceína) e índice de gás carbônico produzido (Respirômetro de Bartha)**. 2015. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) - Universidade do Vale do Itajaí, [S. l.], 2015.

G1 . **Caminhão carregado com óleo lubrificante tomba e causa incêndio na BR-262, em Araújos**. G1, [S. l.], p. 1-1, 30 mar. 2021. Disponível em: <https://g1.globo.com/mg/centro-oeste/noticia/2021/03/30/caminhao-carregado-com-oleo-lubrificante-tomba-e-caoa-incendio-na-br-262-em-araujos.ghtml> . Acesso em: 23 out. 2022.

KOMESU, Andrea *et al.* **Biorremediação**. [S. l.], 25 set. 2014. Disponível em: <https://www.unifesp.br/campus/san7/ppgbb-linhas-de-pesquisa/579-ppgbb-biorremediacao#:~:text=A%20biorremedia%C3%A7%C3%A3o%20%C3%A9%20definida%20como,ambiental%2C%20como%20%C3%A1gua%20ou%20solo>. Acesso em: 13 out. 2022.

KRONBAUER, Marcelo Luís *et al.* **Uso da Bioaugmentação para Remediação de Solos Contaminados Por Óleo Diesel**. Congresso ABES, [S. l.], p. 1-8, 2 out. 2022. Disponível em: <https://saneamentobasico.com.br/wp-content/uploads/2019/03/VI-164.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2022.

LISBÔA, Márcia Pagno. **Caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por linhagem de Bacillus amyloliquefaciens isolada de solo**. 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul., [S. l.], 2006.

MACHADO, E. B. **Análise do sistema de recolhimento de óleo lubrificante usado ou contaminado no município de Cachoeirinha**. Trabalho de conclusão de curso de graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em Administração. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2011.

MELLO, Gabriela Sá Leitão de *et al.* **Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos**. SciELO, [s. l.], 12 mar. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/esa/a/wpFF68MCQypDBtXZjpk56Yh/?lang=pt>. Acesso em: 15 out. 2022

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Gerenciamento de Óleos Lubrificantes Usados ou Contaminados: guia básico**. *Nome do Site*. 2011. Disponível em : https://www.mprs.mp.br/media/areas/ambiente/arquivos/oleos_lubrificantes/manuais/gestao_oleos_lubrificantes.pdf. Acesso em: 20 set. 2023.

NAKANO, Michiko M *et al.* **Characterization of Anaerobic Fermentative Growth of *Bacillus subtilis*: Identification of Fermentation EndProducts and Genes Required for Growth.** Journal of Bacteriology, 1997. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/jb.179.21.6749-6755.1997>. Acesso em: 26 nov. 2023.

PETRILLO , Thalita Regina. **Efeito Probiótico do *Bacillus amyloliquefaciens* na aerocistite aguda em Tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).** 2015. Trabalho de conclusão de curso (Doutorado em medicina veterinária) - Universidade Estadual Paulista - UNESP Câmpus de Jaboticabal, [S. l.], 2015.

PETROBRAS. **Exploração e Produção de Petróleo e Gás.** [S. l.], 2021. Disponível em: <https://petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/areas-de-atuacao/exploracao-e-producao-de-petroleo-e-gas/#:~:text=Hoje%2C%20a%20produ%C3%A7%C3%A3o%20do%20pr%C3%A9,nossa%20produ%C3%A7%C3%A3o%20total%20em%202021> . Acesso em: 3 nov. 2022.

PETROBRAS, **Refino.** [S. l.], 2021. Disponível em: <https://petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/areas-de-atuacao/refino/> . Acesso em: 3 nov. 2022.

PETROBRÁS, **Produtos.** [S. l.], 2021. Disponível em: <https://petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/produtos/>. Acesso em: 3 nov. 2022.

PRADO, Cleiton Dias do. **Óleos lubrificantes automotivos: Minerais e Sintéticos.** 2010. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, [S. l.], 2010.

RIOS, Fabiano Aparecido *et al.* **Agronomic performance of soybean treated with *Bacillus amyloliquefaciens*.** African Journal of Microbiology Research, [s. l.], 28 nov. 2018. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/C25369259463> . Acesso em: 23 jan. 2023.

SCHUELTER, L. M. **Logística reversa de óleos lubrificantes automotivos usados ou contaminados**. Artigo apresentado como requisito para conclusão do curso de Bacharelado Interdisciplinar em Mobilidade – Ênfase em Transportes, da Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

SOBECC. Associação Brasileira de Enfermeiros de Centro Cirúrgico, **recuperação anestésica e Centro de material e esterilização**. Diretrizes de práticas em enfermagem cirúrgica e processamento de produtos para a saúde. 7a ed. São Paulo: SOBECC, 2017.

TEIXEIRA, Paulo César. **Manual de métodos de análise de solos**. 3. ed. rev. e aum. Brasília, DF: EMBRAPA, 2017. Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1087262/1/Pt1Cap10A_nalisegranulometrica.pdf . Acesso em: 15 out. 2022.

VARGAS, Lúcia Rosane Bertholdo-. **“A versatilidade de *Bacillus subtilis*”**- Solubio Tecnologias Agrícolas LTDA. (<https://www.solubio.agr.br/post/a-versatilidade-de-bacillus-subtilis>). Publicado em 01/12/2020.

APÊNDICES

Abaixo têm-se informações de algumas empresas e seus produtos que são responsáveis por fazer a degradação dos hidrocarbonetos. Percebe-se que em alguns há a presença do *Bacillus Subtilis* e do *Bacillus amyloliquefaciens*, porém, sempre acompanhados de muitos outros ativos.

Apêndice A: Tabela de produtos remediadores com associação

EMPRESA	PRODUTO	INDICAÇÃO DE USO	INGREDIENTES ATIVOS
BIO-BRASIL LIMPEZA BIOLÓGICA LTDA	ADITIVO B-350	Biorremediador para Estações de Tratamento de Efluentes de indústrias químicas e petroquímicas, para degradar matéria orgânica (hidrocarbonetos, fenóis, proteínas, açúcares).	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus megaterium</i>
LEVOR AMBIENTAL LTDA	MICROPAN PETROL	Biorremediador para solos e compostagem, com a finalidade de degradar hidrocarbonetos.	<i>Bacillus subtilis</i>
Millenniun Tecnologia Ambiental	ENZILIMP IN	Biorremediador para tratar estações de tratamento de efluentes industriais, tais como reatores/tanques e filtros biológicos, lagoas de estabilização, caixas de gordura e fossas sépticas e em composteiras de resíduos sólidos orgânicos, com o objetivo de biodegradação	<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus licheniformis</i>

		de efluentes de indústrias de processamento de alimentos (laticínios, abatedouros, frigoríficos, doces, bebidas e conservantes); agroindústrias; indústrias têxteis, químicas, petroquímicas, farmacêuticas, metalúrgicas, curtumes e papel/celulose;	
SUPER BAC PROTEÇÃO AMBIENTAL S.A.	BIO CUBO WT	Biorremediador para efluentes em caixas de gordura industriais, lagoas de estabilização e Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs).	Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus pasteurii, Bacillus polymyxa e Bacillus subtilis
SUPER BAC PROTEÇÃO AMBIENTAL S.A.	BIO GRAN WTA	Biorremediação para efluentes que contêm resíduos provenientes de criação e abatedouros de animais em lagoas de estabilização, tanques de equalização, Estação de tratamento de Efluentes de laticínios e indústrias alimentícias.	Bacillus licheniformis, Bacillus coagulans, Streptomyces badius, Bacillus subtilis, Bacillus pasteurii e Bacillus amyloliquefaciens
SUPER BAC PROTEÇÃO AMBIENTAL S.A.	WT NO ODOR	Biorremediador para ambiente industrial externo, com finalidade de degradação de compostos orgânicos.	Bacillus amyloliquefacies, Bacillus megaterium,

Apêndice B: Elementos e suas proporções no solo (análise de FRX em ppm)

Element Concentration	[ppm]
Magnesium Oxide MgO	69600,00
Aluminium Oxide Al ₂ O ₃	126000,00
Silicon Oxide SiO ₂	295000,00
Phosphorus Oxide P ₂ O ₅	0,00
Sulfur S	392,00
Chlorine Cl	991,00
Potassium Oxide K ₂ O	6110,00
Calcium Oxide CaO	5390,00
Titanium Oxide TiO ₂	5390,00
Vanadium V	0,00
Chromium Cr	0,00
Manganese Oxide MnO	205,00
Iron Oxide Fe ₂ O ₃	34400,00
Cobalt Co	1490,00
Molybdenum Mo	0,00
Nickel Ni	0,00
Copper Cu	0,00
Zinc Zn	0,00
Arsenic As	0,00

Selenium Se	0,00
Rubidium Rb	0,00
Strontium Sr	0,00
Yttrium Y	0,00
Niobium Nb	0,00
Zirconium Zr	0,00
Rhodium Rh	3090,00
Cerium Ce	2130,00
Hafnium Hf	275,00
Thorium Th	0,00
Palladium Pd	0,00
Silver Ag	0,00
Cadmium Cd	0,00
Tin Sn	0,00
Antimony Sb	0,00
Tantalum Ta	0,00
Tungsten W	0,00
Platinum Pt	0,00
Gold Au	0,00
Mercury Hg	0,00
Lead Pb	0,00

Bismuth Bi	0,00
Uranium U	0,00

Fonte: (o Autor 2022).

ANEXOS

Anexo A: Imagens de vazamento de óleo que despertaram a criação da pesquisa.

