

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E TECNOLOGIAS
SUSTENTÁVEIS

ISABELA KARINA DELLA-FLORA

REMEDIÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM UMA MISTURA
COMERCIAL DE DIESEL-BIODIESEL (B12): UMA AVALIAÇÃO EM
MICROCOSMOS DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE COMPOSTOS
(IN)ORGÂNICOS

CERRO LARGO

2021

ISABELA KARINA DELLA-FLORA

**REMEDIÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM UMA MISTURA
COMERCIAL DE DIESEL-BIODIESEL (B12): UMA AVALIAÇÃO EM
MICROCOSMOS DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE COMPOSTOS
(IN)ORGÂNICOS**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de Processos e Tecnologias.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

CERRO LARGO

2021

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Dell-Flora, Isabela Karina

Remediação de solo contaminado com uma mistura comercial de diesel-biodiesel (b12): uma avaliação em microcosmos dos efeitos da adição de compostos (in)orgânicos / Isabela Karina Dell-Flora. -- 2021. 114 f.:il.

Orientador: Doutor Daniel Joner Daroit

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, Cerro Largo, RS, 2021.

1. Biorremediação. 2. Bioestimulação. 3. Atenuação Natural. 4. Aditivos orgânicos. 5. Aditivos inorgânicos. I. Daroit, Daniel Joner, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

ISABELA KARINA DELLA-FLORA

**REMEDIÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM UMA MISTURA
COMERCIAL DE DIESEL-BIODIESEL (B12): UMA AVALIAÇÃO EM
MICROCOSMOS DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE COMPOSTOS
(IN)ORGÂNICOS**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Área de Concentração: Monitoramento, Controle e Gestão Ambiental

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de Processos e Tecnologias.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

Esta Dissertação foi defendida e aprovada pela banca em: 03/03/2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniel Joner Daroit – UFFS



Profª. Dr. Fátima Menezes Bento - UFRGS



Prof. Dr. Douglas Rodrigo Kaiser - UFFS

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Daniel Joner Daroit, por te aceitado me orientar durante o mestrado, e me auxiliado a desenvolver essa pesquisa, desde os passos iniciais de planejamento até a discussão dos resultados.

À Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), por me proporcionar desde a graduação um ensino de qualidade, e ao Programa de Pós-Graduação em Ambienta e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), incluindo todos os professores e funcionários que contribuem para o PPGATS.

Aos colegas de trabalho que tive durante esses dois anos de mestrado, especialmente aos colegas da Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Santo Ângelo/RS, que sempre me apoiaram e ajudaram desde o início do mestrado. E nessa reta final, agradeço o apoio dos colegas da DS Engenharia.

Aos meus colegas de mestrado, pela companhia durante essa trajetória, e as gurias do Lab 112, que foram indispensáveis para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço a minha família, que sempre foi minha base e me apoiaram em qualquer situação.

Por fim, agradeço a banca por ter aceito o convite, por dispor de seu tempo e pelas contribuições a esse trabalho.

RESUMO

Os combustíveis fósseis têm sido protagonistas na poluição de solos, especialmente as misturas de diesel-biodiesel, combustível mais utilizado no Brasil. Um das alternativas para tratamento de solos contaminados com combustíveis são os processos de biorremediação, que podem ser aprimorados pelas técnicas de bioestimulação. Neste estudo foi investigada a dinâmica da degradação de diesel S10 comercial com 12% de biodiesel (B12) em solo, suplementado com compostos orgânicos e inorgânicos, buscando determinar os efeitos sobre indicadores da microbiota autóctone e alcançar melhores índices de atenuação do contaminante. Três tratamentos foram avaliados ao longo de 93 dias: atenuação natural (controle), adição de composto orgânico (COB), adição de casca de soja (SHB) e adição de NPK (IB). Durante o experimento foram mensuradas a respiração basal do solo, as variações no número de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de B12, o pH do solo, as concentrações de carbono e nitrogênio (total, inorgânico e orgânico), e por fim, a eficiência na remoção de hidrocarbonetos de petróleo na faixa do diesel (THP-DRO) em cada tratamento. A respiração basal do solo mostrou as maiores liberações cumulativas de C-CO₂ na seguinte ordem: COB > SHB > Controle > IB, sendo que todos foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). Os números de bactérias heterotróficas totais e de bactérias degradadoras aumentou ao longo dos tratamentos. O pH do solo aumentou após a adição do B12 em relação ao solo sem contaminação, e houve variações ao longo do experimento para todos os tratamentos, exceto COB. A fitotoxicidade do solo indicou que apenas o tratamento SHB atingiu níveis satisfatórios de redução da toxicidade, seguido pelo controle. O nitrogênio e o carbono do solo tiveram variações significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo e entre os tratamentos, com os tratamentos bioestimulados apresentando mais N-total do que o controle. O carbono orgânico tendeu a diminuir ao longo do tempo, exceto para o tratamento SHB, onde não houve variação ($p > 0,05$). Ao contrário do esperado, a bioestimulação não foi capaz de melhorar a atenuação do contaminante. A análise de TPH DRO mostrou que o tratamento Controle apresentou a maior remoção do contaminante (96,12%), seguido pelo COB (87,25%), IB (84,21%) e SHB (68,05%), após 93 dias.

Palavras-chave: Biorremediação. Bioestimulação. Atenuação Natural. Aditivos orgânicos. Aditivos inorgânicos.

ABSTRACT

Fossil fuels have been protagonists in soil pollution, especially diesel-biodiesel blends, the most used fuel in Brazil. One of the alternatives for treating soils contaminated with fuels is the bioremediation processes, which can be improved by biostimulation techniques. In this study, the dynamics of the degradation of commercial S10 diesel with 12% biodiesel (B12) in soil was investigated, supplemented with organic and inorganic compounds, seeking to determine the effects on indigenous microbiota indicators and to achieve better levels of contaminant attenuation. Three treatments were evaluated over 93 days: natural attenuation (control), addition of organic compound (COB), addition of soybean hulls (SHB) and addition of NPK (IB). During the experiment, basal soil respiration, variations in the number of total heterotrophic and degrading B12 bacteria, soil pH, carbon and nitrogen concentrations (total, inorganic and organic), and finally, efficiency in removal of petroleum hydrocarbons in the diesel range (THP-DRO) in each treatment. Basal soil respiration showed the highest cumulative C-CO₂ releases in the following order: COB > SHB > Control > IB, all of which were significantly different ($p < 0.05$). The numbers of total heterotrophic bacteria and degrading bacteria increased over the course of treatments. The soil pH increased after the addition of B12 in relation to the soil without contamination, and there were variations throughout the experiment for all treatments, except COB. The phytotoxicity of the soil indicated that only the SHB treatment reached satisfactory levels of toxicity reduction, followed by the control. Nitrogen and soil carbon had significant variations ($p < 0.05$) over time and between treatments, with biostimulated treatments showing more N-total than the control. Organic carbon tended to decrease over time, except for the SHB treatment, where there was no variation ($p > 0.05$). Contrary to expectations, biostimulation was not able to improve the attenuation of the contaminant. The analysis of TPH DRO showed that the Control treatment showed the greatest removal of the contaminant (96.12%), followed by COB (87.25%), IB (84.21%) and SHB (68.05%), after 93 days.

Keywords: Bioremediation. Bioestimulation. Natural attenuation. Organic amendments. Inorganic amendments.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Classes e características dos hidrocarbonetos de petróleo bruto .. | 17 |
| Tabela 2 – Aplicação de técnicas de bioestimulação orgânica para remediação de solos e sedimentos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo | 33 |

RESULTADOS I

| | |
|---|----|
| Table 1 – Chemical and physical properties of the soil used in the study | 45 |
| Table 2 –Chemical properties of organic amendments used in this study..... | 46 |
| Table 3 –Chemical properties of inorganic amendment used in this study..... | 47 |
| Table 4 – Design of the bioremediation experiment. ^a | 47 |
| Table 5 – Soil total, inorganic and organic nitrogen from control, COB, SHB and IB, during 93 days of microcosm incubation..... | 60 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Estrutura dos assuntos abordados..... | 15 |
| Figura 2 – Percentual da produção de derivados energéticos de petróleo no Brasil em 2019 | 18 |
| Figura 3 – Classificação dos hidrocarbonetos no diesel. | 19 |
| Figura 4 – Opções de abordagens mais comuns para contenção dos danos e remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo..... | 25 |
| Figura 5 – Fatores que influenciam na eficiência da biorremediação..... | 29 |
| Figura 6 – Benefícios do uso de aditivos orgânicos no processo de biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo | 39 |

RESULTADOS I

| | |
|--|----|
| Figure 1 – Organic amendments: (a) soybean hull collected from air filtration systems; (b) composting row of Ecocitrus waste..... | 46 |
| Figure 2 – Cumulative C-CO ₂ release from Control (◇), COB (□), SHB (△), and IB (○) treatments, during 93 days of incubation. Distinct letters indicate significant differences ($p < 0.05$) in the final cumulative respiration between treatments. . | 53 |
| Figure 3 – Most probable number of heterotrophic in Control (◇), COB (□), SHB (△), and IB (○) treatments, during 93 days of incubation..... | 54 |
| Figure 4 – Most probable number of (A) heterotrophic, and (B) B12-utilizing bacteria in Control (◇), COB (□), SHB (△), and IB (○) treatments, during 93 days of incubation. | 55 |
| Figure 5 – Soil pH in control (▨), COB (▩), SHB (▧) and IB (▦) treatments during 93 days of incubation. Distinct lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between incubation times for the same treatment; distinct uppercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments at the same incubation time. | 56 |
| Figure 6 – Relative Germination in soil from control (▨), COB (▩), SHB (▧) and IB (▦) treatments at 0 and 93 days of incubation. Distinct lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) within each treatment at different incubation times; distinct uppercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments at a particular incubation time. | 58 |

| | |
|--|----|
| Figure 7 – Index of Germination in soil from control (▣), COB (▤), SHB (▥) and IB (▦) treatments at 0 and 93 days of incubation. Distinct lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) within each treatment at different incubation times; distinct uppercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments at a particular incubation time. | 59 |
| Figure 8 – Organic carbon content evaluated in Control (◇), COB (□), SHB (△), and IB (○) treatments, as a function of incubation time. Distinct lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) within each treatment at different incubation times; distinct uppercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments at a particular incubation time. | 61 |
| Figure 9 – Attenuation of TPH-DRO evaluated after 20 and 93 days of incubation in Control (◇), COB (□), SHB (△), and IB (○) treatments. | 63 |
| Figure 10 – TPH DRO degradation from control treatment, COB treatment, SHB treatment and IB treatment divided into short (▣), medium (▤) and long (▥) number of C, during 93 days of incubation. The B12 represent the initial percentage of each carbon range group in B12 applied to soil. | 64 |

ANEXO I

| | |
|---|-----|
| Figura 7 – Cromatograma Controle Tempo 0..... | 98 |
| Figura 8 – Cromatograma Controle Tempo 21..... | 99 |
| Figura 9 – Cromatograma Controle Tempo 55..... | 100 |
| Figura 10 – Cromatograma Controle Tempo 93..... | 101 |
| Figura 11 – Cromatograma COB Tempo 0..... | 102 |
| Figura 12 – Cromatograma COB Tempo 21..... | 103 |
| Figura 13 – Cromatograma COB Tempo 55..... | 104 |
| Figura 14 – Cromatograma COB Tempo 93..... | 105 |
| Figura 15 – Cromatograma SHB Tempo 0..... | 106 |
| Figura 16 – Cromatograma SHB Tempo 21..... | 107 |
| Figura 17 – Cromatograma SHB Tempo 55..... | 108 |
| Figura 18 – Cromatograma SHB Tempo 93..... | 109 |
| Figura 19 – Cromatograma IB Tempo 0..... | 110 |
| Figura 20 – Cromatograma IB Tempo 21..... | 111 |
| Figura 21 – Cromatograma IB Tempo 55..... | 112 |

| | |
|---|-----|
| Figura 22 – Cromatograma IB Tempo 93..... | 113 |
| Figura 23 – Cromatograma padrão | 114 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 2.1 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO | 16 |
| 2.1.1 Caracterização do petróleo bruto..... | 16 |
| 2.1.2 Caracterização do combustível..... | 18 |
| 2.2 IMPACTOS AMBIENTAIS EM ÁREAS CONTAMINADAS POR HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO | 21 |
| 2.3 ESTRATÉGIAS DE REMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS POR HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO | 24 |
| 2.4 USO DE COMPOSTOS (IN)ORGÂNICOS NA BIOREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO..... | 32 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| 3.1 RESULTADOS I | 41 |
| 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS | 84 |
| REFERÊNCIAS..... | 85 |
| ANEXO I..... | 98 |

1 INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis são um dos responsáveis pelo desenvolvimento tecnológico e a expansão econômica da sociedade nas últimas décadas. Porém, o uso desses combustíveis tem trazido consequências preocupantes. Grandes acidentes com vazamento de combustíveis têm comprometido recursos ambientais indispensáveis ao homem, como o solo e a água (NWANKWEGU; ORJI; ONWOSI, 2016a).

No Brasil, desde o início da extração petrolífera, há relatos de diversos acidentes, como o ocorrido em 2019, onde 70% dos 3.300 quilômetros de litoral nordeste do Brasil foram atingidos por um derramamento de petróleo, que ficou conhecida como a maior tragédia ambiental por derramamento de petróleo já ocorrida no país, afetando o ambiente marinho e costeiro (ARAÚJO; RAMALHO; MELO, 2020). Além dos grandes acidentes, pequenos vazamentos de petróleo e combustíveis são comuns nas atividades de refino, transporte, armazenamento e distribuição para o consumidor final.

O diesel é um produto da refinação de petróleo bruto e é o principal combustível comercializado no mercado brasileiro (43,6%) (ANP, 2020). Por ser o combustível mais distribuído e consumido, é de se presumir que caracteriza a maior parte dos pequenos vazamentos durante atividades de transporte e armazenamento.

O biodiesel é um combustível renovável composto por ésteres e ácidos graxos. O Brasil é pioneiro no uso de biocombustíveis em larga escala. Em 2020, todo diesel foi comercializado com 12% de biodiesel, seguindo o cronograma de aumento do percentual de adição do biodiesel no diesel comercial (CNPE, 2018).

Os hidrocarbonetos de petróleo têm características hidrofóbicas e são capazes de se associar as partículas do solo ou matéria orgânica, o que dificulta processos de degradação no ambiente (CHEN; LIU; WHANG, 2019; SOWANI; KULKARNI; ZINJARDE, 2020; YOUSEFI et al., 2009). Essas substâncias são tóxicas para microrganismos, animais e plantas e, quando em contato com ambientes como solo e água, podem modificar as dinâmicas do ecossistema e causar graves danos ambientais (ADAM; DUNCAN, 2002; EZE; GEORGE; HOSE, 2021). Por outro lado, o biodiesel é mais suscetível a biodegradação e são geralmente menos tóxicos do que os hidrocarbonetos derivados de petróleo (THOMAS et al., 2017).

Diante desse cenário, alternativas de remediação, visando minimizar os danos a áreas afetadas pela contaminação com combustíveis, devem ser desenvolvidas. Técnicas físicas e químicas são amplamente estudadas para remediação de solos contaminados, porém esbarram em altos custos de aplicação e geração de resíduos que necessitam de tratamento posterior. Em contrapartida, técnicas biológicas como a biorremediação, vêm destacando-se pelo baixo custo de implementação de resultados satisfatórios na remoção de combustíveis em solos contaminados (KUPPUSAMY et al., 2017)).

A biorremediação é um processo que ocorre naturalmente no solo, onde microrganismos são capazes de atacar e destruir moléculas de contaminantes orgânicos, utilizando-o como substrato para seu crescimento e obtenção de energia (DAS; CHANDRAN, 2011; LAHEL et al., 2016). Uma das desvantagens desse processo é sua sensibilidade a fatores ambientais, como pH do solo, e disponibilidade de nutrientes limitantes (N, P e K), número de microrganismos e a presença espécies com maquinaria enzimática capaz de degradar o contaminante. Logo, a eficiência do processo de biodegradação é extremamente dependente destas propriedades, que definem cinéticas do crescimento populacional microbiano e, com isso, as taxas de degradação dos contaminantes (IMAM et al., 2019).

Para superar essas barreiras, surgem as tecnologias como a bioestimulação, que consiste na melhoria das condições ambientais do solo, através da adição de oxigênio, água, correção do pH e, principalmente, adição de nutrientes.

A adição de nutrientes como N e P é essencial para sustentar o processo de biorremediação e garantir uma relação C:N:P balanceada. Diversos estudos têm demonstrado os bons resultados na remoção de hidrocarbonetos de petróleo pela adição de N e P em forma inorgânica. Porém há relatos de efeitos adversos, como lixiviação de N e P, e consequente contaminação ambiental em ambientes aquáticos, além de desregulação do pH do solo (HOREL; MORTAZAVI; SOBECKY, 2015). Uma alternativa, ainda que pouco explorada, é a adição de matéria orgânica rica em N aos solos contaminados, capaz de fornecer os nutrientes necessários para os microrganismos de forma eficaz e segura ao meio ambiente.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a dinâmica da degradação de diesel S10 comercial com 12% de biodiesel (B12), em solo da região de Santo Ângelo/RS, suplementado com compostos orgânicos e inorgânicos,

buscando determinar os efeitos sobre indicadores da microbiota autóctone e alcançar melhores índices de atenuação do contaminante.

De forma específica, esse estudo buscou investigar, ao longo de 93 dias, a respiração basal do solo, as variações no número de bactérias heterotróficas totais e degradadoras, o pH do solo, as concentrações de carbono e nitrogênio (total, orgânicos e inorgânico), e por fim, a eficiência na remoção de TPH em cada tratamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este item busca aprofundar a discussão sobre a problemática da contaminação ambiental por hidrocarbonetos de petróleo, aponta quais os impactos desses contaminantes no ambiente, apresenta alternativas para conduzir a remediação de áreas contaminadas e por fim traz estudos que demonstram as eficiências de diferentes estratégias de biorremediação em solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo (Figura 1).

Este referencial teórico foi a base para a escrita do artigo de revisão intitulado “uma revisão das tecnologias de bioestimulação orgânica de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo”, publicado no periódico *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 9, p. 72256-72269, 2020.

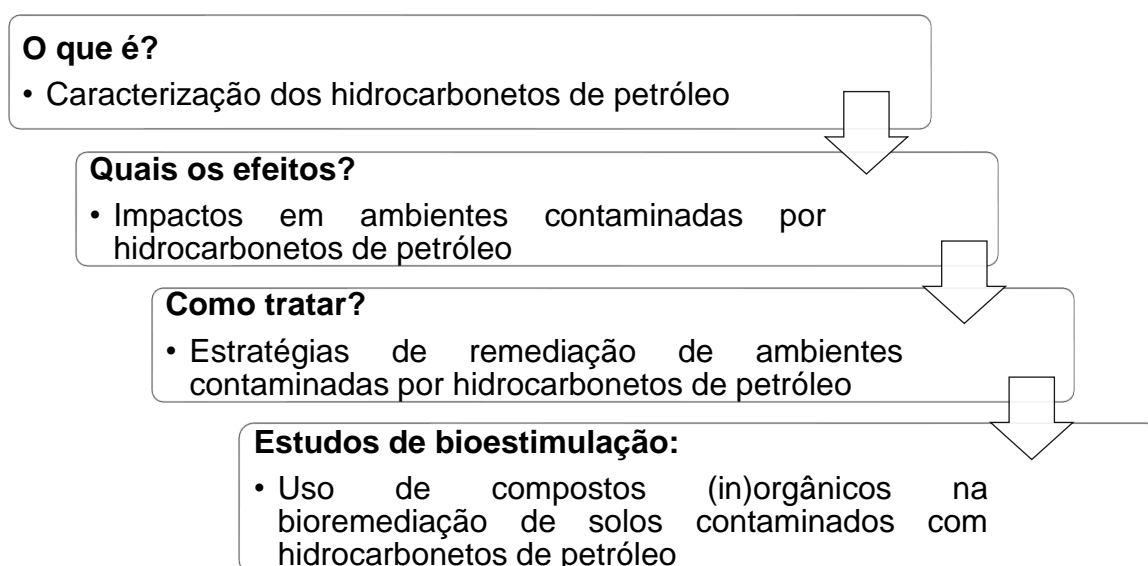


Figura 1 – Estrutura dos assuntos abordados

2.1 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

2.1.1 Caracterização do petróleo bruto

Conforme dados da ANP (Agencia nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível), no ano de 2019 foram produzidos diariamente cerca de 95,2 milhões de barris de petróleo em todo o mundo. A produção brasileira representa cerca de 3% do total, com uma média diária de 2,87 milhões de barris de petróleo (ANP, 2020).

Entre os países com maior consumo estão os Estados Unidos, a China e a Índia, respectivamente. O Brasil alcançou o nono lugar em consumo de petróleo, com de cerca de 2,4 milhões de barris/dia (2,4% do total mundial) (ANP, 2020).

O petróleo ocorre naturalmente pela decomposição térmica de material orgânico enterrado ao longo de milhões de anos (VARJANI, 2017). Consiste principalmente em proporções variáveis de carbono (C) e hidrogênio (H), que contém fase líquida (chamada de petróleo bruto), fase gasosa (gás natural) e hidrocarbonetos sólidos (alcatrão, por exemplo) (BEHRENBRUCH; DEDIGAMA, 2007).

O petróleo bruto é formado por uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Além de C e H, essas moléculas podem incluir heteroátomos, como compostos de enxofre (sulfuretos, tióis, sulfuretos cíclicos, dissulfuretos, dibenzotiofeno, benzotiofeno e naftobenzotiofeno), compostos de oxigênio (álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres, éteres, cetonas e furanos), compostos de nitrogenados (pirrol, piridina, indol, benzo (a) carbazol, carbazol, benzo (f) quinolona, nitrilos, indolina). Esses heterocompostos estão contidos principalmente nas porções não voláteis dos hidrocarbonetos de petróleo (MONTAGNOLLI; LOPES; BIDOIA, 2015; OSSAI et al., 2020; VARJANI, 2017).

Os hidrocarbonetos são apolares e, portanto, não são solúveis em água, exceto quando têm um grupo funcional ionizado ligado, como o grupo carboxila. A hidrofobicidade dos hidrocarbonetos tende a aumentar quanto mais complexa forem as ligações entre os átomos e quanto menor o ponto de ebulição (IMRON et al., 2020). A Tabela 1 mostra algumas características de grupos de hidrocarbonetos de petróleo bruto, separados conforme suas características químicas estruturais.

Tabela 1 – Classes e características dos hidrocarbonetos de petróleo bruto

| Hidrocarbonetos | Características | Exemplos |
|---|---|--|
| Alifáticos: cadeia aberta ou fechada, porém não aromática | <ul style="list-style-type: none"> • Menos denso que a água • O tamanho da molécula é inversamente proporcional à sua volatilidade e solubilidade em água • Cicloalcanos são mais resistentes a degradação microbiana do que os hidrocarbonetos de cadeia aberta | Metano, propano, butano (gás à temperatura ambiente); hexano, octano hexadecano (líquido à temperatura ambiente); eicosano, triacontano, pentacontano (sólido à temperatura ambiente); Ciclohexano, metil ciclohexano, metilciclopentano, 1,2-dimetilciclopentano. |
| Aromáticos: BTEXs e HPAs | <ul style="list-style-type: none"> • Ter anel de benzeno • Muito volátil e relativamente solúvel em água • São altamente tóxicos e resistentes à degradação microbiana | Benzeno, etilbenzeno, naftaleno, tolueno, xileno e fenantreno |

Fonte: Adaptado de (OSSAI et al., 2020).

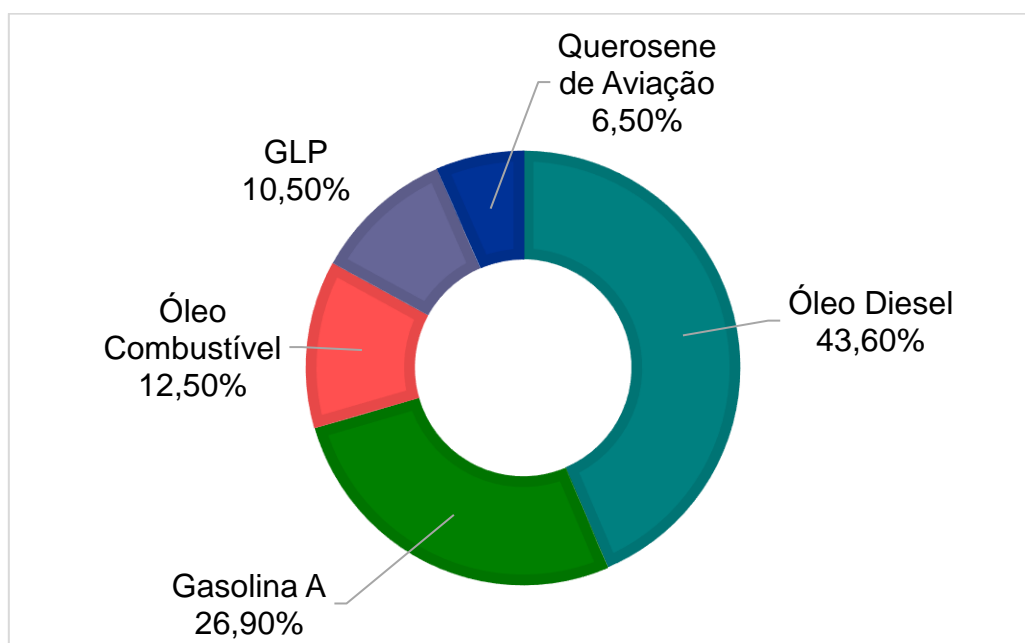
Do petróleo bruto diversas frações são separadas e utilizadas em diversos segmentos industriais. Através do processo de refino, o petróleo da origem aos combustíveis fósseis, como a gasolina, o querosene e o diesel, importantes fontes de energia para a sustentação da nossa sociedade.

Cabe destacar que, além de sua importância energética, os hidrocarbonetos de petróleo são caracterizados como poluentes ambientais prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos devido a sua persistência no ambiente e suas características recalcitrantes. São poluentes duráveis e estáveis no ambiente, o que agrava os impactos ambientais e sobre a saúde humana (OSSAI et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Quando no ambiente algumas frações dos hidrocarbonetos de petróleo,

aquelas de cadeias mais simples e mais leves, como os alifáticos, podem sofrer rápida degradação por ação microbiana. Os compostos como PAHs e BTEXs, neste sentido, tendem a serem mais persistentes e mais tóxicos no ambiente (LIU et al., 2019a; YANTO; TACHIBANA, 2013).

2.1.2 Caracterização do combustível

O diesel é um produto da refinação de petróleo bruto e é o principal combustível comercializado no mercado brasileiro (43,6%), conforme Figura 2. A produção de óleo diesel no Brasil em 2019 atingiu mais de 40 milhões m³.



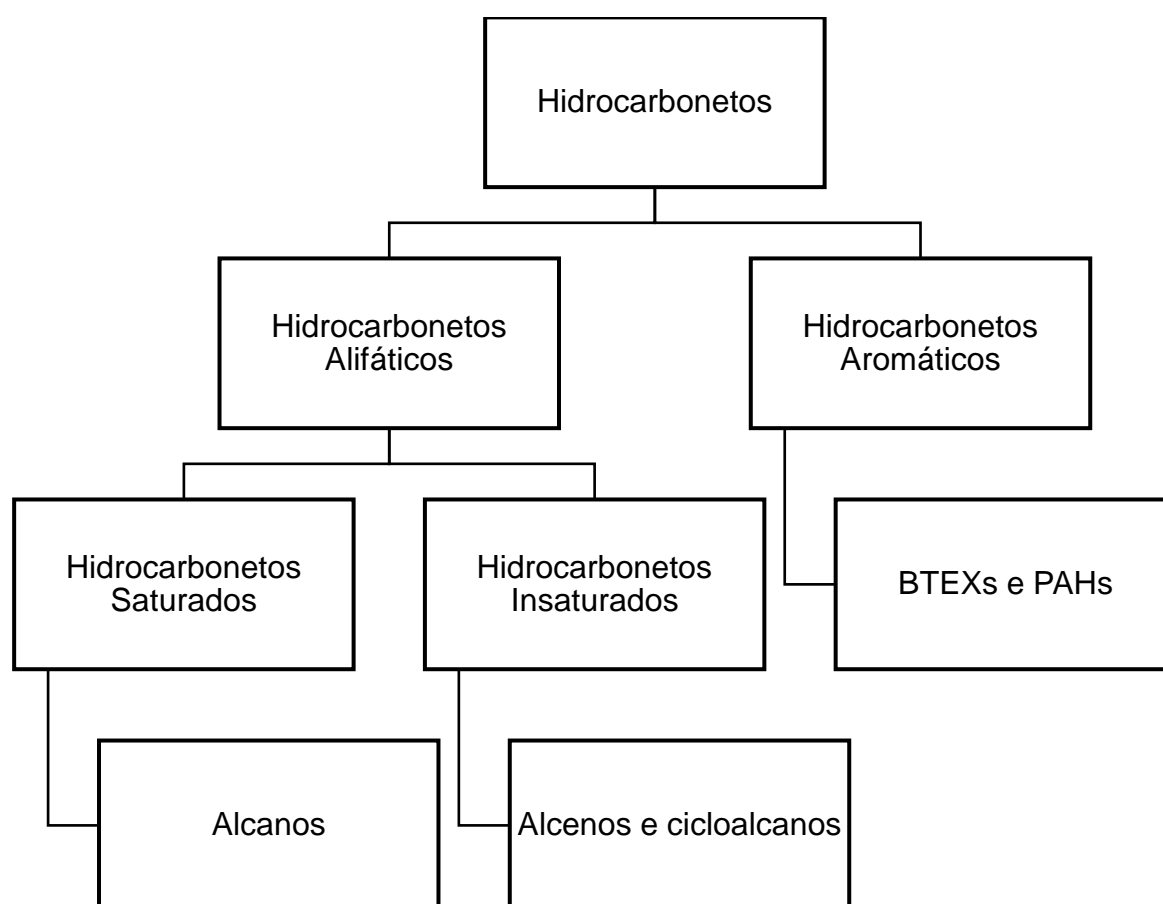
Fonte: Adaptado de ANP (2020).

Figura 2 – Percentual da produção de derivados energéticos de petróleo no Brasil em 2019

O diesel S10, produzido no Brasil desde 2013, se diferencia dos demais tipos de diesel comercial pelo baixo teor de enxofre, no máximo 10 ppm. Essa diferença faz com que a combustão do diesel S10 produza menores teores de material particulado e NOx, diminuindo a poluição atmosférica (PETROBRÁS, 2014).

Os componentes do óleo diesel podem ser divididos em duas categorias de acordo com sua estrutura molecular, os alifáticos (cadeias abertas e cíclicas, porém

não aromáticas) e os aromáticos (apresentam obrigatoriamente ciclo ou ciclos hexagonais contendo três ligações duplas alternadas) (Figura 3). Os hidrocarbonetos alifáticos podem ser subdivididos em saturados e insaturados. O diesel contém de 2.000 a 4.000 hidrocarbonetos com aproximadamente 74% de hidrocarbonetos alifáticos, 24% de hidrocarbonetos aromáticos e 2% de outros compostos (IMRON et al., 2020). O diesel contém hidrocarbonetos de cadeia curta (cadeias com até 16 carbonos), cadeia média (cadeias com até 22 carbonos) ou de cadeia longa (cadeias com até 30 carbonos), mas é majoritariamente composto por hidrocarbonetos C12 – C18 (ABDULLAH et al., 2020; BARRUTIA et al., 2011).



Fonte: Adaptado de (IMRON et al., 2020)

Figura 3 – Classificação dos hidrocarbonetos no diesel.

Os alcanos são estruturas simples com ligações C-C e são encontrados em abundância no diesel. Os alcenos têm uma ou mais ligações duplas entre os átomos de carbono, enquanto os cicloalcanos são alcanos nos quais os átomos de carbono

formam um anel. Alcenos e cicloalcanos são encontrados em pequenas quantidades no diesel. Os Aromáticos são aqueles que possuem um ou mais anel de benzeno em sua estrutura.

A combinação de *n*-alcanos e alcanos ramificados com pequenas quantidades de aromáticos configura ao diesel moderada solubilidade em água, estabilidade das cadeias aromáticas e alta adsorção em partículas como solo e matéria orgânica. A soma dessas características faz do diesel um poluente ambiental agressivo e considerado prioritário, com capacidade de se dispersar facilmente pelo ambiente ao mesmo tempo que se torna estável e resistente a degradação (SOWANI; KULKARNI; ZINJARDE, 2020; YOUSEFI KEBRIA et al., 2009).

De maneira geral, hidrocarbonetos mais complexos (existência de ramificações e/ou ciclos fechados) e/ou de maior número de carbonos) são usualmente mais resistentes à biodegradação; assim, pode-se assumir que a biodegradabilidade dos hidrocarbonetos alifáticos é maior em relação aos aromáticos (CHEN et al., 2020). Alcanos e aromáticos de baixo peso molecular (benzeno, tolueno, naftaleno e metilnaftaleno) podem ser biodegradados por microrganismos, porém aromáticos de maior peso molecular e polinucleares são altamente recalcitrantes, podendo ser apenas parcialmente degradados por microrganismos (ABDULLAH et al., 2020).

Os biocombustíveis vêm se tornando uma alternativa sustentável ao uso de combustíveis fósseis, e são geralmente menos tóxicos do que combustíveis como o diesel. O Brasil é pioneiro no setor de biocombustíveis através de políticas que impulsionam o uso de biodiesel em misturas com diesel de origem fóssil (BADZINSKI et al., 2021; CHEN et al., 2019) .

No mercado de biocombustíveis, a produção de biodiesel foi 10,3% superior ao ano anterior em decorrência, principalmente, do aumento do teor de mistura no óleo diesel, de 10% para 11%, conforme Resolução CNPE nº 16 de 2018 que dispõe sobre a evolução da adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final (ANP, 2020). A partir de março de 2020, o diesel passou a ser comercializado com 12% de biodiesel (B12), seguindo o cronograma de aumento do percentual de adição do biodiesel no diesel comercial.

2.2 IMPACTOS AMBIENTAIS EM ÁREAS CONTAMINADAS POR HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

O uso de hidrocarbonetos de petróleo é essencial para o desenvolvimento econômico e tecnológico da sociedade atual. No entanto, quando acidentes de derramamentos desses compostos ocorrem, representam um risco para o meio ambiente e a saúde humana (OSSAI et al., 2020).

As fontes de contaminação de hidrocarbonetos de petróleo no ambiente são inúmeras, podem ser tanto difusas (queima de combustíveis em veículos e embarcações) como pontuais (vazamentos acidentais de tanques e tubulações). A grande maioria das contaminações ocorrem devido a derramamentos acidentais durante o transporte, descargas de águas residuais oleosas, vazamento durante a extração de petróleo e ruptura/fissura dos tanques de armazenamento subterrâneo (CHEN et al., 2019; OSSAI et al., 2020; ZHANG et al., 2020).

Grandes derramamentos de petróleo têm como principal fonte as atividades de exploração de petróleo offshore e o transporte em navios-tanque. Esses acidentes podem ocasionar o derramamento de milhões de galões de petróleo em um curto espaço de tempo, que atinge os ambientes marítimos e áreas costeiras e causam danos muitas vezes irreversíveis ao ambiente, além da complexidade dos processos de remoção do óleo que pode persistir e contaminar o ambiente marinho por décadas após o acidente, causando bilhões de dólares em danos e ações de recuperação (YE et al., 2019; ZHANG; LU; YANG, 2021).

No Brasil, em 2019, 70% dos 3.300 quilômetros de litoral nordeste do Brasil foi atingido por um derramamento de petróleo, que ficou conhecida como a maior tragédia ambiental desta natureza já ocorrida no país. O derramamento ocorreu em alto mar e as correntes marítimas teriam sido responsáveis pela dispersão do material até a costa brasileira (ARAÚJO; RAMALHO; MELO, 2020).

Os grandes derramamentos de petróleo são amplamente divulgados e estudados, porém outros impactos causados pelo derramamento de petróleo e seus derivados passam despercebidos e são negligenciados, como é o caso dos vazamentos em postos de abastecimento combustíveis e durante o transporte terrestre. Nesses casos a contaminação pode ocorrer com a liberação de pequenas quantidades de combustíveis, mas por um longo período de tempo, atingindo o solo e

água subterrânea, e só é detectado após danos ambientais irreversíveis (ALAYÓN et al., 2020).

Quaisquer que sejam as fontes de contaminação, o petróleo e seus derivados quando em contato com o solo podem afetar os componentes bióticos em micro a macro escala (KHAN et al., 2018). A natureza dessa influência precisa ser investigada para avaliar os impactos negativos sobre o solo e quais respostas podem ser aplicadas para remediação da área afetada.

O óleo diesel é mais resistente à decomposição microbiana do que o combustível biodiesel, isso ocorre devido a composição química do biodiesel que inclui metil ésteres e ácidos graxos mais suscetíveis a oxidação (BAMGBOSE; ANDERSON, 2020).

Apesar disso, autores alertam o biodiesel apresenta taxas de biodegradação semelhantes aos alcanos do diesel e, em altas concentrações, pode ser tão tóxico aos componentes bióticos do solo quanto o diesel (BADZINSKI et al., 2021a; DEMELLO et al., 2007; OWSIANIAK et al., 2009; PRINCE; HAITMANEK; LEE, 2008), sendo importante avaliar investigar os impactos da contaminação desses materiais sob o ambiente e, conseqüentemente, a saúde humana.

Sendo a saúde do solo responsável pela manutenção dos ecossistemas terrestres, e considerando a atividade de microrganismos crítica para processos de decomposição e ciclagem de nutrientes, distúrbios sobre a microbiota do solo podem gerar efeitos em cadeia que, por sua vez, pode resultar no colapso de todo o micro e macro ecossistema (DORAN; ZEISS, 2000; LAPINSKIENE; MARTINKUS; REBŽDAITE, 2006).

Um dos efeitos adversos do diesel no ambiente é a potencial supressão das atividades enzimáticas do solo. De origem majoritariamente microbiana, estas enzimas participam, por exemplo, da dinâmica da matéria orgânica nos solos. Andreoni et al. (2004) relatam que quanto maior a contaminação menor a atividade enzimática do solo, que podem ser um reflexo da quantidade e variedade de microrganismos.

Outros estudos mostram que a atividade enzimática do solo pode aumentar na presença de diesel; entretanto isso não reflete um aumento no número ou na diversidade de microrganismos, mas sim a perturbação causada pela entrada abrupta compostos orgânicos contaminantes no sistema, que resulta na seleção de alguns organismos capazes de tolerar a contaminação e mesmo usar os contaminantes

como novos substratos (MARGESIN; ZIMMERBAUER; SCHINNER, 2000; MORALES-GUZMÁN et al., 2017; RAMADASS et al., 2017)

Além dos efeitos sobre os microrganismos a contaminação do solo por petróleo e seus derivados pode afetar as plantas. Algumas espécies de plantas podem ser altamente sensíveis aos hidrocarbonetos e perderem completamente sua capacidade de germinação e crescimento, enquanto outras são capazes de tolerar a presença da contaminação, mas podem retardar o processo de germinação e comprometer o desenvolvimento de biomassa da planta, isso está ligado principalmente a presença de compostos altamente tóxicos como os PAHs (ADAM; DUNCAN, 2002; EZE; GEORGE; HOSE, 2021; UMEH; VÁZQUEZ-CUEVAS; SEMPLE, 2018).

Os invertebrados do solo são um grupo extremamente importante para a manutenção da saúde do solo, devido as funções que desempenham na ciclagem de nutrientes (WASLEY; MOONEY; KING, 2016). Estudos mostram que combustíveis podem ser extremamente tóxicos para a macrofauna do solo, como minhocas e ácaros, especialmente em solo com baixos níveis de C orgânico (GAINER et al., 2019; RAMADASS et al., 2017).

Não somente os componentes bióticos do solo podem ser afetados diante de uma contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, componentes físico-químicos do solo, como pH, textura, compactação, condutividade hidráulica e disponibilidade de sais e metais do solo podem ser afetados pela presença de contaminantes (BADZINSKI et al., 2021a; OSSAI et al., 2020), o que intensifica os efeitos adversos sobre o meio biótico.

Por fim, a contaminação do solo representa um risco para a saúde humana. Além do preocupante impacto que a contaminação por hidrocarbonetos de petróleo pode causar ao solo e a consequente perda de funções do solo, como produtividade agrícola, vias de contaminação direta com os contaminantes podem oferecer risco ao ser humano. Autores relatam risco carcinogênico para populações expostas por via dérmica ou ingestão de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, sendo as crianças o grupo mais sensível a exposição (QU et al., 2020; SHI et al., 2020). A exposição a essas substâncias durante a infância está associada a um risco maior de desenvolver câncer ao longo da idade adulta (DREIJ et al., 2020).

2.3 ESTRATÉGIAS DE REMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS POR HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

O gerenciamento de uma área suspeita de contaminação começa pela investigação preliminar, onde busca-se averiguar a existência ou não da contaminação. Em seguida, em caso de confirmação, inicia-se uma investigação para conhecer a fundo as características e a natureza da contaminação e do ambiente atingido, para que, com base nesses dados, seja proposta estratégias de contenção, remediação e monitoramento da área (KUPPUSAMY et al., 2017).

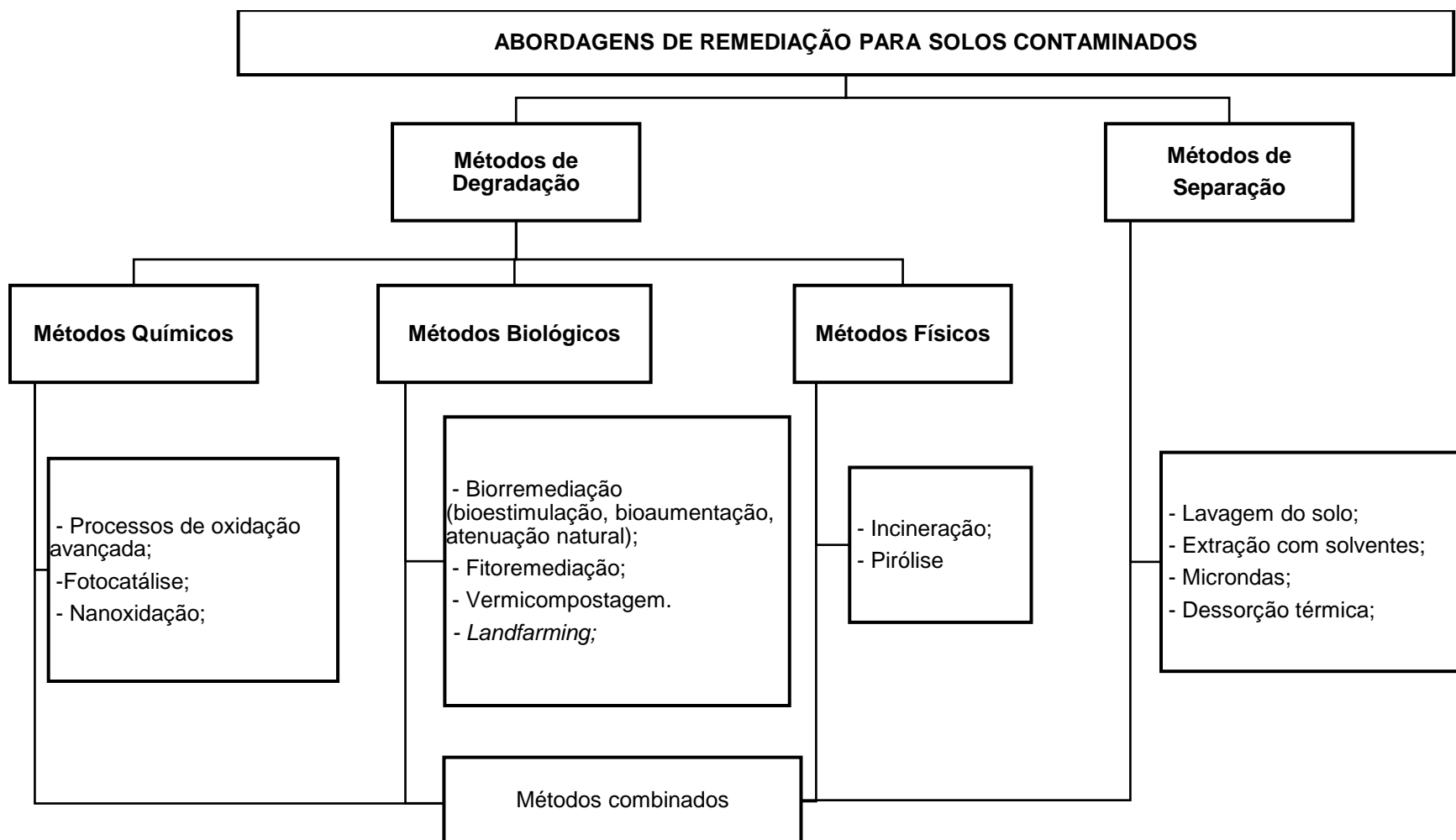
A contaminação do solo tem sido um desafio para profissionais da área ambiental. Diferentemente da contaminação em outros ambientes, como na água por exemplo, que pode ser facilmente conduzida através de tubulações para estações de tratamento e depois devolvida ao corpo hídrico, o solo requer tratamento no local (*in situ*), ou envolve altos custos para sua remoção (tratamento *ex situ*), nesse último caso, o retorno do solo para o local de origem dificilmente ocorre, causando um impacto que vai além da contaminação inicial.

Atualmente diversas tecnologias são estudadas e aplicadas para remediação de hidrocarbonetos de petróleo em solo. Estas incluem técnicas físicas, químicas e biológicas. Quando aplicadas, essas técnicas podem resultar na separação/remoção do contaminante do solo ou na destruição das substâncias alvo (Figura 4Fonte: Adaptado de Ossai et al. (2020)

Figura 4).

Uma alternativa para remoção do contaminante do solo são métodos físicos de separação. Esses métodos são capazes de extrair o contaminante do solo, porém não de destruí-los. Por isso, requerem um tratamento secundário do resíduo de extração. Um exemplo é a aplicação de micro-ondas, capazes de promover a dessorção de compostos orgânicos ligados a partículas do solo (GOMES; DIAS-FERREIRA; RIBEIRO, 2013).

A dessorção térmica é um método de aquecimento do solo para promover a evaporação de compostos orgânicos. Temperaturas acima de 400 °C já são capazes de remover contaminantes como os derivados de petróleo, porém há um alto custo energético e, conseqüentemente, financeiro para viabilização dessa alternativa de remediação (GOMES; DIAS-FERREIRA; RIBEIRO, 2013).



Fonte: Adaptado de Ossai et al. (2020)

Figura 4 – Opções de abordagens mais comuns para contenção dos danos e remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo

A lavagem do solo e o uso de solventes para extração são técnicas de remediação *ex situ* que utilizam substâncias extratoras (compostos orgânicos, ácidos, tensoativos, etc.), para remover os poluentes do solo. As substâncias extratoras são capazes de solubilizar o composto alvo e assim separá-lo do solo através de um processo de lavagem. O uso de solventes e substâncias de lavagem têm a desvantagem de serem tóxicos para a população microbiana. Uma alternativa para a toxicidade dos solventes é o uso de biossurfactantes, substâncias produzidas naturalmente por microrganismos, capazes de desorver e dissolver compostos orgânicos hidrofóbicos, como o diesel, e permitir a separação dos contaminantes do solo. Além disso, ao aumentar a solubilidade dos contaminantes, os biossurfactantes aumentam a biodisponibilidade dessas substâncias e potencializam os processos de biodegradação. Apesar disso, o uso *in situ* dessa tecnologia pode ocasionar a dispersão da pluma de contaminação (MORILLO; VILLAVERDE, 2017).

Ainda que eficientes, os métodos de separação podem comprometer as características físicas e biológicas do solo, e requerem estruturas e operações complexas para sua execução, resultando em um custo relativamente alto (LI; LI; ZHOU, 2020).

Os métodos de degradação físicos são métodos *ex situ* que fazem o uso de calor para a destruição das moléculas do contaminante. A incineração, por exemplo, é o contato direto dos resíduos com a chama. Neste método, os contaminantes são volatilizados e destruídos a 600 - 1200 ° C em um ambiente aeróbio. A pirólise é outro método físico de degradação, onde solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo são degradados pelo calor (500 ° C) em ambiente aeróbico. Os resíduos resultantes desses processos podem ser utilizados como aditivos em solo ou coprocessados para fabricação de cimento, por exemplo (DING et al., 2019).

Os métodos físicos de destruição são eficientes na degradação de compostos de hidrocarbonetos de petróleo, mas também causam a destruição de toda a massa de solo (matéria orgânica, microrganismos, minerais) (DING et al., 2019).

Processos oxidativos avançados (POA) são tecnologias químicas consolidadas para o tratamento de águas residuárias que contêm contaminantes recalcitrantes, e atualmente vêm sendo estudados para aplicação em solos

contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. Essas técnicas fazem uso de substâncias altamente oxidantes que são capazes de destruir ou quebrar as moléculas do contaminante em moléculas menores e menos tóxicas. Dentre as técnicas mais usadas em solo estão os processos de Fenton e fotocatalise de TiO_2 (MORILLO; VILLAVERDE, 2017).

A rapidez da reação pode ser um dos fatores que limita a tecnologia para aplicação *in situ* em grandes massas de solo, pois o alcance de cada ponto de injeção do oxidante é pequena (BESHA et al., 2018). Por outro lado, os POAs não solubilizam o contaminante, mas sim os mineralizam completamente, evitando a geração de lodos ou águas residuárias contaminadas.

As nanopartículas, como o ferro zero-valente em escala nanométrica, é outro processo de oxidação aplicado a solos. Essa tecnologia pode ser aplicada simultaneamente a processos de biorremediação para obtenção de melhores eficiências de remoção. No entanto, propriedades como o pequeno tamanho e alta reatividade redox das nanopartículas, que são o ponto chave para uma eficiente remediação, também os tornam tóxicos às populações microbianas, plantas e animais (MORILLO; VILLAVERDE, 2017; SONG et al., 2017).

As tecnologias de remediação química são frequentemente acompanhadas de poluição secundária, que poderá destruir a estrutura e reduzir a fertilidade do solo, e pode poluir águas subterrâneas, devido à não seletividade ao contaminante, oxidando também a matéria orgânica do solo e alguns minerais (MORILLO; VILLAVERDE, 2017; SONG et al., 2017).

As tecnologias de remediação que utilizam métodos biológicos *in situ*, como a fitorremediação, a biorremediação e a vermirremediação, são alternativas atrativas para o tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo pelo seu menor impacto ambiental e menor custo (SHI et al., 2019), aliado a altas eficiência alcançadas (>90%) na remoção dos contaminantes (LIU et al., 2019b; SARKAR et al., 2005).

A fitorremediação faz o uso de plantas para extrair contaminantes do solo e bioacumular em seu tecido vegetal (fitoextração) ou degradar os contaminantes (fitodegradação). Além disso, a ação das raízes das plantas em solos contaminados pode trazer outros benefícios, como a estabilização do contaminante, impedindo a sua percolação, a aeração do solo, e a interação sinérgica com a microbiota, pela liberação de metabólitos secundários que

melhoram a biodegradação dos contaminantes (rizorremediação). Um dos principais desafios da fitorremediação é a destinação final da biomassa vegetal contaminada após a fitoextração (ABDULLAH et al., 2020; GOMES; DIAS-FERREIRA; RIBEIRO, 2013; KUPPUSAMY et al., 2017).

A vermirremediação consiste no uso de minhocas para extrair, acumular ou degradar contaminantes no solo. De forma semelhante às plantas, as minhocas são capazes de adsorver poluentes orgânicos como o diesel em seus corpos, reduzindo a concentração no ambiente. Dentro do intestino das minhocas, contaminantes orgânicos podem ser degradados pela ação enzimática do processo de digestão ou por microrganismos intestinais (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2014; SHI et al., 2019). Além disso, o uso de minhocas traz benefícios físicos (estrutura e aeração do solo) e químicos (produção de húmus) para o solo, que por sua vez podem estimular a eficiência de microrganismos e plantas em degradar os contaminantes. Dessa forma, a vermirremediação pode ser usada concomitantemente a outras biotecnologias de remediação de hidrocarbonetos de petróleo (KUPPUSAMY et al., 2017; SHI et al., 2019).

O *Landfarming* é uma biotecnologia *ex situ* de tratamento de solos contaminados, onde o solo é removido do local, espalhado em uma fina camada (< 10 cm) e incorporado ao solo de uma célula de tratamento. Essa camada de solo é revolvida periodicamente para aumentar as taxas de oxigenação do solo, e promover a degradação do contaminante pelos microrganismos. Esta abordagem tem sido empregada com sucesso para o tratamento de solos contaminados por diferentes poluentes orgânicos, como hidrocarbonetos de petróleo (MORILLO; VILLAVARDE, 2017). Ainda, pode ser aliada a outras como bioaugmentação e bioestimulação para melhores resultados.

A biorremediação faz uso das capacidades metabólicas dos microrganismos do solo para degradar agentes poluidores. A biorremediação é um dos tratamentos mais indicados para solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, pois é segura, ecologicamente correta, econômica, e não faz a simples transferência do contaminante de um meio para outro, mas o mineraliza (KUPPUSAMY et al., 2017).

A microbiota do solo é comprovadamente capaz de assimilar e degradar hidrocarbonetos de petróleo, aproveitando esses compostos como fonte de

carbono e energia. Porém, as condições ambientais desempenham um papel significativo na biorremediação, em parte por afetar os microrganismos responsáveis pela biodegradação do contaminante (Figura 5). O processo de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo é sensível a diversas variáveis ambientais, como a temperatura, umidade, pH, concentração da contaminação, presença de microrganismos degradadores, e nutrientes em quantidades ótimas para sustentar o processo microbiológico (HOREL; MORTAZAVI; SOBECKY, 2015; IMAM et al., 2019).

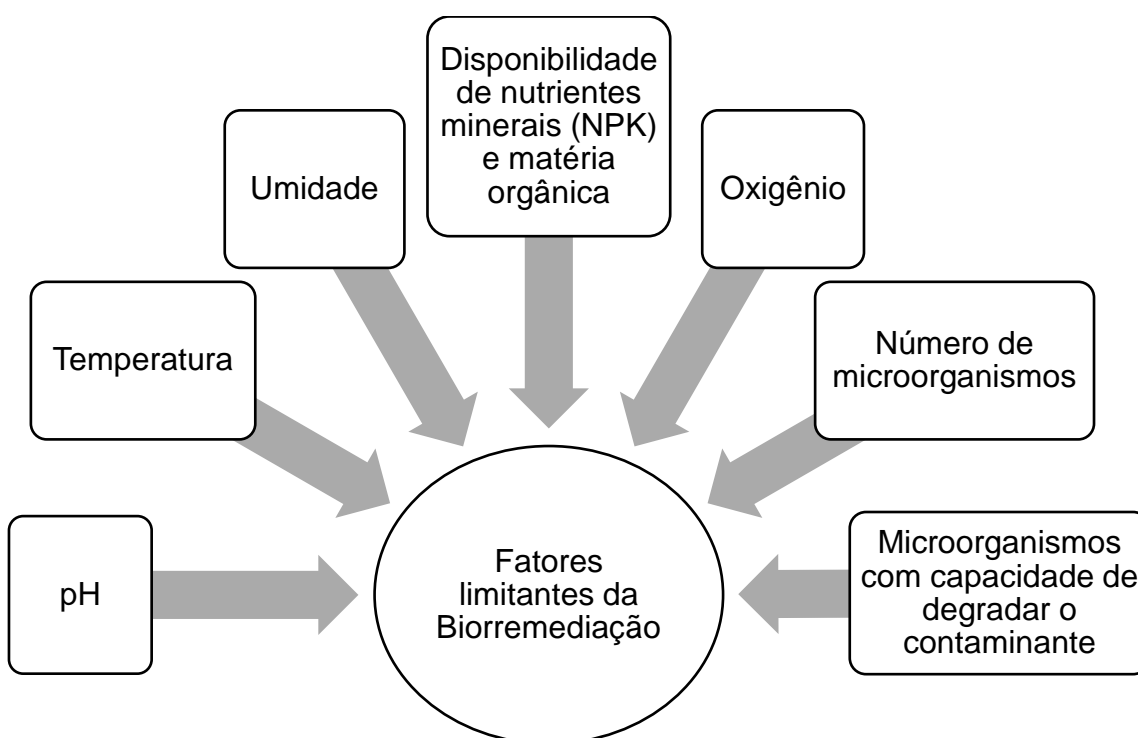


Figura 5 – Fatores que influenciam na eficiência da biorremediação

A biodisponibilidade do contaminante, especificamente os hidrocarbonetos de petróleo, é um fator importante, e depende das características de toxicidade, hidrofobicidade e natureza multifásica desses compostos. Uma importante estratégia biológica para o incremento da biodisponibilidade do contaminante é a produção de biossurfactantes, que desempenham um papel vital na absorção dos hidrocarbonetos de petróleo tendo como resultado um aumento no catabolismo geral dessas substâncias (SINGH et al., 2017).

O pH é outro fator capaz de influenciar o desenvolvimento microbiano do solo, e com isso afetar as taxas de degradação do contaminante. Alterações bruscas de pH podem desestabilizar as populações microbianas e colapsar o processo (BADZINSKI et al., 2021a). A biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo é geralmente favorecida em ambientes neutros (pH \approx 7). Da mesma forma, as concentrações de oxigênio e umidade do solo afetam o processo de biorremediação, visto que em condições aeróbicas os processos metabólicos de degradação de hidrocarbonetos de petróleo são mais eficientes (ABDULLAH et al., 2020; SINGH et al., 2017).

Os hidrocarbonetos de petróleo são uma abundante fonte de carbono para os microrganismos do solo, porém pobre em nutrientes minerais como N, P e K. O desequilíbrio entre as quantidades de carbono no sistema contaminado e as fontes de nutrientes inorgânicos pode limitar o processo de biorremediação. A suplementação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo através da adição de NPK representa uma estratégia amplamente difundida; no entanto, concentrações excessivas de nutrientes também podem inibir a atividade microbiana (SINGH et al., 2017).

A capacidade intrínseca da microbiota em assimilar e degradar o contaminante é o fator biótico mais importante para o sucesso da biodegradação, juntamente com a densidade desses microrganismos, que costuma ser diretamente proporcional as taxas de degradação.

Muitas comunidades microbianas do solo são capazes de se adaptar a contaminação e promover a remediação do local. Estudos mostram ainda que o processo de biodegradação é favorecido quando um conjunto de microrganismos são aplicados para degradação de hidrocarbonetos de petróleo (OKAFOR et al., 2021; PHULPOTO et al., 2021). De fato, dificilmente uma única linhagem microbiana será capaz de degradar toda a gama de compostos que correspondem aos hidrocarbonetos de petróleo, ou mesmo mineralizar completamente uma molécula desse grupo. Desta forma, comumente, é necessário um consórcio de microrganismos capazes de atuar de maneira simbiótica/complementar para promover a mineralização dos hidrocarbonetos de petróleo (OKAFOR et al., 2021)

Quando nenhum mecanismo de aprimoramento é aplicado à biorremediação, e o avanço da degradação e da pluma são apenas monitorados,

em um método denominado de atenuação natural monitorada. No entanto, para superar potenciais limitações, métodos de aprimoramento da biorremediação vêm sendo desenvolvidos. Para as limitações abióticas são aplicados métodos de bioestimulação, que visam estimular os microrganismos por meio de adição de nutrientes, irrigação do solo, revolvimento para aeração, dentre outros. Para as limitações bióticas são aplicados métodos de bioaumentação, com o objetivo de aumentar o número de microrganismos autóctones, ou inserir microrganismos (preferencialmente autóctones) com reconhecida capacidade de degradar as moléculas alvo.

A estimulação das atividades microbiológicas do solo pela entrada de uma grande quantidade de carbono orgânico desprovida de nutrientes inorgânicos, característico de contaminações por hidrocarbonetos de petróleo, pode resultar em um rápido esgotamento dos nutrientes limitantes, como nitrogênio e fósforo (MARGESIN; ZIMMERBAUER; SCHINNER, 2000) que limitará o metabolismo microbiano e as taxas de degradação do contaminante.

A adição de nutrientes na forma de matéria orgânica tem inúmeras vantagens. A adição de compostos orgânicos ricos em N, P e K é uma fonte importante de nutrientes para manter os níveis de atividade metabólica do solo durante o processo de biodegradação, o carbono orgânico facilmente acessível também aumenta diretamente a densidade dos microrganismos que são responsáveis pela decomposição e biotransformação dos poluentes nos solos (CHEN et al., 2015). Uma interessante fonte de nutrientes e matéria orgânica biodegradável são resíduos orgânicos como resíduos de colheita, resíduos alimentares, produtos de compostagem, dentre outros.

De modo geral, todo método tem seus prós e contras. Os tratamentos em grande escala de derramamento de óleo usando métodos físicos ou químicos geralmente precisam de um alto preço unitário e grande mão de obra, já a biorremediação requer muito tempo (OSSAI et al., 2020), e o efeito de remoção é facilmente influenciado pelo ambiente externo.

2.4 USO DE COMPOSTOS (IN)ORGÂNICOS NA BIOREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

Nesse item são apresentadas e discutidas investigações onde materiais orgânicos foram aplicados como forma de melhorar a eficiência dos processos de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo, frente a outras abordagens como a bioestimulação inorgânica, bioaugmentação e a atenuação natural (Tabela 2).

Alguns solos apresentam uma grande habilidade para degradação de hidrocarbonetos de petróleo, não sendo necessária nenhuma alteração nas variáveis ambientais. Nesses casos é viável a aplicação da atenuação natural, o que significa menores custos para a remediação da área. O estudo realizado por Sarkar et al. (2005) é um exemplo de ambiente com alto potencial de atenuação natural de diesel (~ 93% de redução do contaminante). Os resultados revelaram que a atenuação natural teve um desempenho extremamente satisfatório em paralelo aos solos com aditivos, com apenas pequenas diferenças nas taxas de reação e degradação total. Diante desses resultados, não seriam justificados os gastos com a suplementação de nutrientes nesse solo.

Em contraste, a investigação realizada por Molina-Barahona et al. (2004) apresentou um solo com baixa capacidade de atenuação natural, removendo menos de 5% do HTP (hidrocarbonetos totais de petróleo). Neste estudo, a bioestimulação orgânica, através da adição de resíduos de colheita, propiciou um aumento de até 13,4 vezes na remoção do contaminante.

Os tipos de solo diferem significativamente em relação a textura, composição, população microbiana, entre outros, mesmo em regiões próximas. Alguns solos serão maus candidatos à atenuação natural, enquanto outros serão excelentes candidatos (SARKAR et al., 2005). Isso faz com que sejam necessários estudos preliminares antes da escolha da tecnologia mais vantajosa para remediação da contaminação.

Tabela 2 – Aplicação de técnicas de bioestimulação orgânica para remediação de solos e sedimentos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo

| Condições experimentais | Estratégia de Bioestimulação | Remoção do Contaminante | Referência |
|--|---|-------------------------|----------------------------------|
| Solo contaminado com hidrocarbonetos (6.220 mg de kg ⁻¹ massa seca do solo). Incubação por 210 dias. | Controle: Solo contaminado sem aditivos e com intervenção mínima. | 82,5 % | Mair; Schinner; Margesin (2013) |
| | Bioestimulação inorgânica: solo contaminado + fertilizante comercial NPK, adicionado a uma concentração de 2.230 mg N kg ⁻¹ solo (razão N:P = 2,3: 1 e razão K:P = 1,8: 1). | 92,7 % | |
| | Bioestimulação com aditivo orgânico comercial 1: solo contaminado + fertilizante oleofílico Inipol EAP22® adicionado ao solo a uma razão de 10:1 (p / p) (razão C: N: P de 62: 7,4: 0,7). | 87,5 % | |
| | Bioestimulação com aditivo orgânico comercial 2: solo contaminado + Terramend® hidrocarbonetos adicionado a uma concentração de 1% (p / p) (35 a 45% de fosfato monoamônico, 20 a 25% de carbonato de cálcio, 0 a 2% de nitrato de amônio, 0 a 2% de fosfato de amônio monobásico, 0 a 2% de nitrato de potássio, 20 a 30% alteração orgânica não especificada). | 88,6 % | |
| Solo contaminado com Óleo Lubrificante a 10% (p/p). Incubação por 98 dias. | Controle: Solo contaminado sem aditivos e com intervenção mínima. | 56% | Agamuthu; Tan; Fauziah, (2013) |
| | Bioestimulação orgânica 1: solo contaminado + lodo de esgoto (10% p/p); | 82% | |
| | Bioestimulação orgânica 2: solo contaminado + dejetos bovinos (10% p/p) | 94% | |
| Solo contaminado com Óleo bruto (16.389 mg kg ⁻¹ de solo). Incubação por 70 dias. | Controle: Solo contaminado sem aditivos e com intervenção mínima. | 8,5% | Chikere; Obieze; Chikere, (2020) |
| | Bioestimulação inorgânica: solo contaminado + 25% de pó de granito | 86,3% | |
| | Bioestimulação orgânica: solo contaminado + 25% de fezes de aves | 93,7% | |
| | Bioestimulação combinada: solo contaminado + 25% de aditivo, incluindo fezes de aves, cinzas de cachos de palmas e poeira de granito (proporção = 2: 1: 1) | 96,7% | |

| Condições experimentais | Estratégia de Bioestimulação | Remoção do Contaminante | Referência |
|---|--|-------------------------|----------------------------------|
| Solo contaminado com Diesel (200 mL de diesel em 800g de solo). Incubação por 56 dias. | Controle: Solo contaminado sem aditivos e com intervenção mínima. | 57,9 % | Nwankwegu; Orji; Onwosi, (2016a) |
| | Bioestimulação orgânica: solo contaminado + 80 g de esterco esterilizado | 93,31 % | |
| | Bioestimulação inorgânica: solo contaminado + 80 g de fertilizante NPK (15:15:15). | 71,4 % | |
| Solo (900 g) contaminado com hidrocarboneto de querosene (300 mL). Incubação por 24 dias. | Controle: Solo contaminado sem aditivos e com intervenção mínima. | 63,6 % | Nwankwegu et al., (2016b) |
| | Bioestimulação orgânica: solo contaminado + Alteração com serragem (2:1 solo/serragem) | 95,2 % | |
| Solo contaminado com Diesel (40 g kg ⁻¹). Incubação por 109 dias. | Controle: Solo contaminado sem aditivos e com intervenção mínima. | < 5% | Molina-Barahona et al., (2004) |
| | Bioestimulação orgânica 1: Solo contaminado + resíduos de colheita (RC) de milho, a níveis de 2 e 3% p/p + controle de umidade (30 e 20% p/p) + Controle da relação C/N (100:30 e 100:10); | 67% | |
| | Bioestimulação orgânica 2: Solo contaminado + resíduos de colheita (RC) de de cana de açúcar, a níveis de 2 e 3% p/p + controle de umidade (30 e 20% p/p) + Controle da relação C/N (100:30 e 100:10); | 59% | |
| Solo contaminado com Diesel (4000 mg kg ⁻¹ de solo). Incubação por 56 dias. | Controle da bioestimulação orgânica: Solo contaminado sem aditivos e com intervenção mínima. | 93,8% | Sarkar et al., (2005) |
| | Bioestimulação orgânica 1: solo contaminado + biossólidos de estação de tratamento de esgoto a baixa taxa (5% m/m) | 96,2% | |
| | Bioestimulação orgânica 2: solo contaminado + biossólidos de estação de tratamento de esgoto a alta taxa (10% m/m) | 96,2% | |
| | Controle da bioestimulação inorgânica: Solo contaminado sem aditivos e com intervenção mínima. | 94,5% | |
| | Bioestimulação inorgânica 1: solo contaminado + mistura de NH ₄ NO ₃ e Hi-Yield® Triple Superphosphate a baixas taxas de P e N semelhantes as do biossólido a baixas taxas | 95,5% | |

| Condições experimentais | Estratégia de Bioestimulação | Remoção do Contaminante | Referência |
|---|---|-------------------------|--|
| | Bioestimulação inorgânica 2: solo contaminado + mistura de NH ₄ NO ₃ e Hi-Yield® Triple Superphosphate a altas taxas de P e N semelhantes as do biossólido a alta taxa | 96,8% | |
| Solo contaminado com óleo diesel (1.200 a 1.600 mg kg ⁻¹ de solo). | Controle: Solo contaminado sem aditivos e com intervenção mínima. | 38 % | Williams; Grimes; Mikkelsen, (1999) |
| | Bioestimulação inorgânica 1: solo contaminado + mistura comercial de nutrientes de biorremediação | 29 % | |
| | Bioestimulação inorgânica 2: solo contaminado + fertilizante comercial (NPK) | 62 % | |
| | Bioestimulação orgânica 1: solo contaminado + resíduo de cama aves (3,65% de N e 1,89% de P) (1% em volume) | 46 % | |
| | Bioestimulação orgânica 2: solo contaminado + resíduo de cama de aves(3,65% de N e 1,89% de P) (10% em volume); | 73% | |
| | Bioestimulação orgânica 3: solo contaminado + resíduo de cama de aves granuladas (3,65% de N e 1,89% de P) (10% em volume) | 84% | |
| Solo contaminado com óleo diesel (9000 mg kg ⁻¹ de solo). Incubação por 99 dias. | Controle: Solo contaminado sem aditivos e com intervenção mínima. | 80% | Liu et al., (2019b) |
| | Bioestimulação orgânica: solo contaminado + farinha de carne e ossos (2% p/p) | 91,2% | |
| | Bioestimulação inorgânica: solo contaminado + uréia comercial, adicionada para se obter uma razão C: N de 100:1. | Entre 91,2 e 95% | |
| Solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo (18.966 mg kg ⁻¹ de solo seco). Incubação por 84 dias. | Controle: Solo contaminado sem aditivos e com intervenção mínima. | 76,15 % | Koshlaf et al., (2016) |
| | Bioaumentação: solo contaminado + consórcio <i>Bacillus</i> (1,8 x 10 ⁶ CFU g ⁻¹ solo seco | 79,04 % | |
| | Bioestimulação orgânica: solo contaminado + palha de ervilha (3% p/p) | 96,1% | |
| | Bioestimulação orgânica + Bioaumentação: solo contaminado + consórcio <i>Bacillus</i> (1,8 x 10 ⁶ CFU g ⁻¹ solo seco + palha de ervilha (3% p/p) | 95% | |
| Solo contaminado com hidrocarbonetos alifáticos (10.000 mg kg ⁻¹ solo). Incubação por 90 dias. | Controle: Solo contaminado sem aditivos e com intervenção mínima. | 57% | Shahsavari et al., (2013) |
| | Bioestimulação orgânica: solo contaminado + palha de ervilha (2,5% p/p) | 83% | |

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos visando otimizar o processo de biorremediação para obter a melhor eficiência na remoção de hidrocarbonetos de petróleo (DIAS et al., 2012; HOREL; MORTAZAVI; SOBECKY, 2015; MOLINA-BARAHONA et al., 2004). A bioestimulação é uma forma de aprimorar a eficiência do processo de biorremediação, otimizando condições ambientais para estimular a microbiota a degradar o poluente. Na bioestimulação, a abordagem mais utilizada é a suplementação de nutrientes limitantes, principalmente N, P e K.

Embora a aplicação desses nutrientes na sua forma inorgânica seja comprovadamente eficiente para biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, alguns estudos apontam que a fertilização excessiva pode afetar negativamente o ambiente (HOREL; MORTAZAVI; SOBECKY, 2014). O alto aporte de fertilizantes inorgânicos pode inclusive inibir o processo de degradação de hidrocarbonetos. Conforme relatado por Walworth et al. (2007) os fertilizantes inorgânicos nitrogenados são compostos por nitrato altamente solúvel em água, ou sais de amônio que se dissolvem rapidamente na água presente nos poros do solo. Isso aumenta a concentração de sal da solução e diminui o potencial osmótico do solo, inibindo a atividade microbiana. A facilidade de difusão desses compostos em água pode não só comprometer a atividade microbiana dos organismos envolvidos no processo de biorremediação, como afetar toda a diversidade de organismos do solo e da água, causando degradação ambiental e efeitos como a eutrofização (BOSSA et al., 2012).

A adição de materiais orgânicos, como resíduos da agricultura e pecuária, surge como uma proposta para suplementação de nutrientes ao solo com menos possibilidade de causar impactos negativos ao ambiente. A razão para a eficácia em potencial da suplementação orgânica reside no fato de esta pode atuar melhorando a estrutura do solo e fornecer nutrientes limitantes e energia, através do aporte de carbono, o que estimularia o crescimento microbiano e, conseqüentemente, melhoraria a degradação dos contaminantes (LIU et al., 2019b; NWINYI; OLAWORE, 2017).

O estudo desenvolvido por Williams et al. (1999) mostrou que o uso de resíduos de cama de aves em sua forma granulada foi mais eficiente (84% de remoção de HTP) do que a estimulação inorgânica (29-62 % de remoção de

HTP). Os fertilizantes inorgânicos comerciais foram usados em quantidades muito pequenas para atingir a razão C:N:P ideal do solo, o que dificultou a homogeneização desse fertilizante no solo e pode ter afetado o processo de biorremediação. O efeito de uma mistura ruim ilustra mais uma desvantagem do uso de fertilizantes inorgânicos.

Nwankwegu et al. (2016a) compararam a bioestimulação orgânica com esterco e a bioestimulação inorgânica com NPK comercial, tendo constatado que a bioestimulação orgânica foi 1,3 vezes mais eficiente do que a inorgânica.

Resíduos orgânicos, como estercos e resíduos de colheita, pode melhorar a estrutura e densidade do solo e, portanto, melhorar a oxigenação, a retenção de umidade e favorecer a volatilização dos hidrocarbonetos de petróleo (KONG et al., 2018; WILLIAMS; GRIMES; MIKKELSEN, 1999). Um exemplo é o trabalho de Nwankwegu et al. (2016b), que usou serragem como aditivo orgânico e agente de volume, e alcançou uma redução de 95,2% do HTP do solo, sem a adição da serragem, o solo era capaz de remover apenas 63,6 % do contaminante.

Agamuthu, Tan e Fauziah, (2013) mostraram que a adição de lodo de esgoto representou uma melhora de 1,46 vezes na remoção do contaminante em relação ao tratamento controle (atenuação natural), e o tratamento com adição de esterco bovino foi 1,68 vezes melhor na remoção do contaminante em relação ao controle (atenuação natural).

Por outro lado, o estudo realizado por Mair, Schinner e Margesin (2013) indicou que a estimulação por aditivos inorgânicos se sobressaiu em relação ao orgânico (produtos comerciais: EAP22® e Terramend®). O tratamento com fertilizante inorgânico foi 1,12 vezes superior na degradação de HTP do que o controle (atenuação natural), sendo este o tratamento mais eficiente. Os tratamentos com aditivo orgânico comercial não foram significativamente diferentes entre si, mas alcançaram uma degradação 1,07 vezes melhor em relação ao controle (atenuação natural).

Chikere, Obieze e Chikere, (2020) demonstraram que a combinação de suplementação orgânica e inorgânica pode ser vantajosa para a biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos. Neste estudo o tratamento com maior remoção de HTP foi a bioestimulação combinada, sendo 11,38 vezes mais eficiente que o controle (atenuação natural), seguido pelo tratamento de

bioestimulação orgânica (11,02 vezes mais eficiente que o controle), e o tratamento com fertilização inorgânica (10,15 vezes mais eficiente que o controle).

No experimento conduzido por Liu et al. (2019b) a adição de aditivo orgânico (farinha de ossos e carne) não foi significativamente diferente do tratamento com ureia, visto que ambos resultaram em níveis de degradação acima de 90% para o diesel. Uma das desvantagens da fertilização inorgânica é a rápida liberação desses nutrientes no solo, que pode acarretar em bruscas alterações do pH. Por outro lado, os aditivos orgânicos adicionam nutrientes como N, P e K em formas lentamente solúveis, mantendo o pH estável próximo a neutralidade. No mesmo estudo, os autores observaram que a adição de ureia aumentou o pH intensivamente, variando de 7,08 para 8,69, mas no tratamento com aditivo orgânico o pH do solo permaneceu mais estável na faixa neutra (LIU et al., 2019b).

Koshlaf et al. (2016) testaram a suplementação orgânica com resíduo de palha de ervilha, frente à atenuação natural, à bioaugmentação e à combinação da bioaugmentação com a estimulação por palha de ervilha. A bioaugmentação quando aplicada separadamente teve efeito ao controle (atenuação natural), removendo 79,04% de HTP enquanto o controle removeu 76,15%. O tratamento de bioestimulação mostrou-se mais eficiente do que a bioaugmentação e o controle, e igualmente eficiente ao tratamento combinado de bioestimulação + bioaugmentação, atingindo níveis de 96% de remoção dos HTP. Este estudo mostra que o uso de um resíduo por si só pode ser eficiente e menos custoso do que técnicas de bioaugmentação. Shahsavari et al. (2013) em um estudo semelhante, indicaram que a palha de ervilha pode estimular a biorremediação de hidrocarbonetos alifáticos, atingindo 83% de remoção.

Como apresentado no texto e na Tabela 2, o uso de aditivos orgânicos é uma estratégia promissora para remediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos de petróleo. A Figura 6 resume alguns dos efeitos benéficos de sua adição nas taxas de biorremediação. Assim, o uso de aditivos orgânicos para bioestimulação de solos melhora as características físico-químicas e microbiológicas do solo para melhorar a eficiência do processo de degradação.

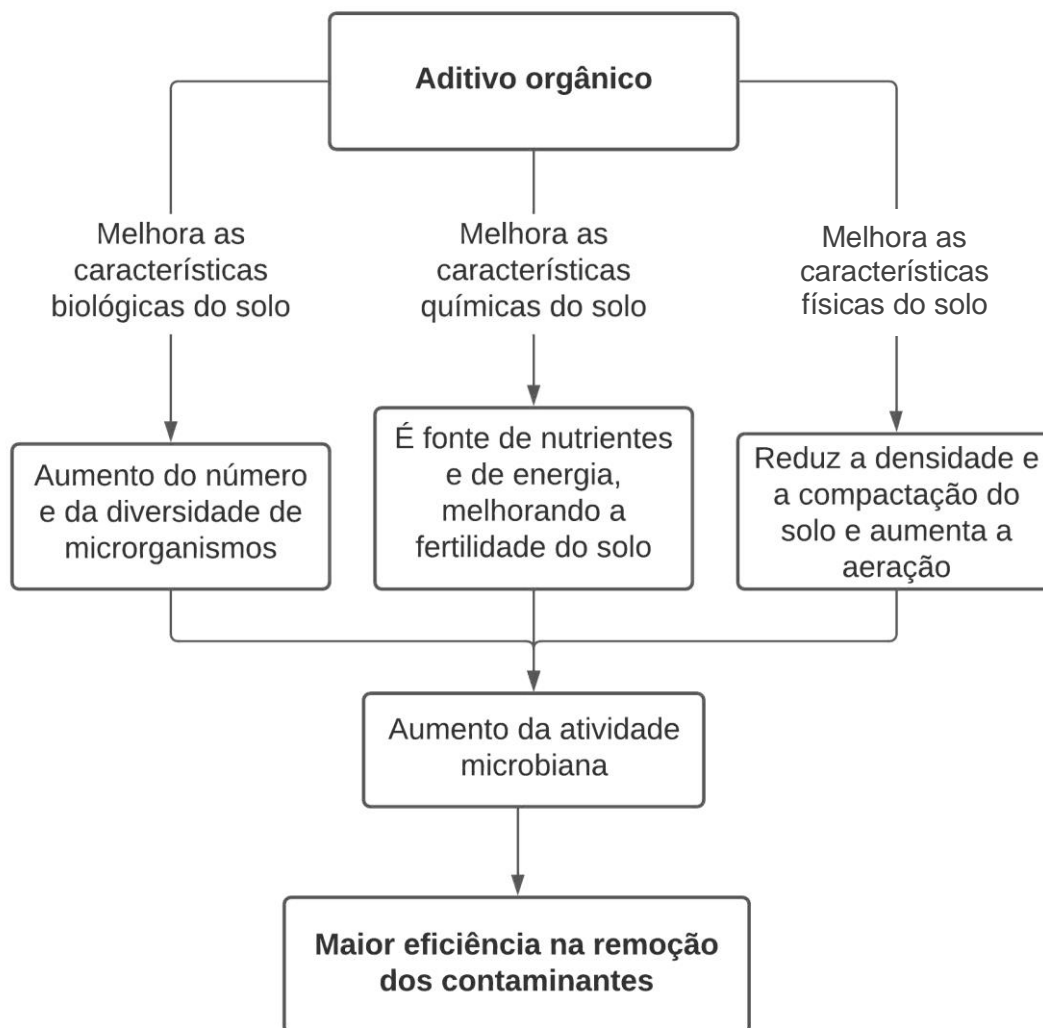


Figura 6 – Benefícios do uso de aditivos orgânicos no processo de biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo

Esta revisão bibliográfica evidenciou a potencialidade do uso de materiais de origem orgânica como aditivos para bioestimular solos contaminados com combustíveis. Inúmeros materiais podem ser empregados como aditivos orgânicos para processos de biorremediação, desde resíduos de culturas agrícolas (KOSHLAF et al., 2016; MOLINA-BARAHONA et al., 2004), resíduos alimentares, lodos de estações de tratamento de efluentes (AGAMUTHU; TAN; FAUZIAH, 2013; SARKAR et al., 2005) e dejetos animais (NWANKWEGU; ORJI; ONWOSI, 2016a; WILLIAMS; GRIMES; MIKKELSEN, 1999). A ampla gama de materiais orgânicos passíveis de aplicação possibilita

que a bioestimulação seja aplicada com aditivos disponíveis regionalmente, o que simplifica o processo de aplicação da técnica.

A adição de matéria orgânica, especialmente resíduos da agricultura e agropecuária, poderia contribuir para aumentar a difusão de oxigênio e demais trocas gasosas do solo, pois funciona como um agente de volume, além de ser fonte de nutrientes minerais limitantes (MOLINA-BARAHONA et al., 2004).

Cabe reforçar que aditivos orgânicos também são responsáveis pela adição de matéria orgânica mais facilmente degradável, sendo uma fonte acessível de carbono e energia para a microbiota. Apesar de estudos relatarem que a microbiota pode preferencialmente atacar essas fontes acessíveis de carbono ao invés do contaminante alvo, isso também pode contribuir para um melhor resultado da biorremediação. Por esta linha a população microbiana pode aumentar através da degradação do aditivo orgânico e, após consumir toda essa fonte de preferencial, mais fortalecida em número e em biodiversidade, pode atacar o contaminante (SHAHSAVARI et al., 2013; ZHANG et al., 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo estão apresentados sob a forma de artigo científico, apresentado na Seção 3.1, identificada como Resultados I. O artigo (Seção 3.1) tem como título “Remediation of soil contaminated with a commercial diesel-biodiesel blend (B12): a microcosm evaluation of the effects of adding (in)organic amendments”.

3.1 RESULTADOS I

REMEDIATION OF SOIL CONTAMINATED WITH A COMMERCIAL DIESEL-BIODIESEL BLEND (B12): A MICROCOSM EVALUATION OF THE EFFECTS OF ADDING (IN)ORGANIC AMENDMENTS

Isabela Karina Della-Flora ^a, Naiara Jacinta Clerici ^b, Gabriele Kuhn Dupont ^a, Carolina Grings Serafini ^b, Daniel Joner Daroit ^{a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Cerro Largo, 97900-000 Cerro Largo, RS, Brasil

^b Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Cerro Largo, 97900-000 Cerro Largo, RS, Brazil

ABSTRACT

Fossil fuels have been protagonists in soil pollution, especially diesel-biodiesel blends, the most used fuel in Brazil. One of the alternatives for treating soils contaminated with fuels is the bioremediation processes, which can be improved by biostimulation techniques. In this study, the dynamics of the degradation of commercial S10 diesel with 12% biodiesel (B12) in soil was investigated, supplemented with organic and inorganic compounds, seeking to determine the effects on indigenous microbiota indicators and to achieve better levels of contaminant attenuation. Three treatments were evaluated over 93 days: natural attenuation (control), addition of organic compound (COB), addition of soybean hulls (SHB) and addition of NPK (IB). During the experiment, basal soil respiration, variations in the number of total heterotrophic and degrading B12 bacteria, soil pH, carbon and nitrogen concentrations (total, inorganic and organic), and finally, efficiency in removal of petroleum hydrocarbons in the diesel range (THP-DRO) in each treatment. Basal soil respiration showed the highest cumulative C-CO₂ releases in the following order: COB > SHB > Control > IB, all of which were significantly different ($p < 0.05$). The numbers of total heterotrophic bacteria and degrading bacteria increased over the course of treatments. The soil pH increased after the addition of B12 in relation to the soil without contamination,

and there were variations throughout the experiment for all treatments, except COB. The phytotoxicity of the soil indicated that only the SHB treatment reached satisfactory levels of toxicity reduction, followed by the control. Nitrogen and soil carbon had significant variations ($p < 0.05$) over time and between treatments, with biostimulated treatments showing more N-total than the control. Organic carbon tended to decrease over time, except for the SHB treatment, where there was no variation ($p > 0.05$). Contrary to expectations, biostimulation was not able to improve the attenuation of the contaminant. The analysis of TPH DRO showed that the Control treatment showed the greatest removal of the contaminant (96.12%), followed by COB (87.25%), IB (84.21%) and SHB (68.05%), after 93 days.

Keywords: Bioremediation. Bioestimulation. Natural attenuation. Organic amendments. Inorganic amendments.

INTRODUCTION

Fossil fuels are responsible for the technological development and economic expansion of our society. However, the use of these fuels has brought consequences, such as problems related to soil pollution (NWANKWEGU; ORJI; ONWOSI, 2016a).

Diesel is a product of crude oil refining and is the main fuel sold in the Brazilian market (43.6%) (ANP, 2020). As it is the most widely distributed and consumed fuel, it is assumed that it characterizes most of the small leaks during transport and storage activities. Biodiesel is a renewable fuel composed of fatty acid esters. Brazil is a pioneer in the use of biofuels on a large scale. In 2020, all diesel fuel was sold as a mixture with 12% biodiesel, following the schedule for increasing the percentage of biodiesel addition in commercial diesel (CNPE, 2018).

Petroleum hydrocarbons have hydrophobic characteristics and are capable of associating with soil particles and organic matter, which hinders degradation processes in the environment (CHEN; LIU; WHANG, 2019; SOWANI; KULKARNI; ZINJARDE, 2020; YOUSEFI et al., 2009). These substances are toxic to microorganisms, animals and plants and, when in contact with environments such as soil and water, they can modify the dynamics of the ecosystem and cause serious environmental damages (ADAM; DUNCAN, 2002;

EZE; GEORGE; HOSE, 2021). On the other hand, biodiesel is more susceptible to biodegradation and is generally less toxic than petroleum-derived hydrocarbons (THOMAS et al., 2017).

Given this scenario, alternatives are needed in order to minimize the damage to areas affected by contamination with fuels. Physical and chemical techniques are widely studied for the remediation of contaminated soils; however, they are associated with high costs of application, and the generation of residues requiring further treatment. Conversely, biological techniques such as bioremediation have been highlighted as low-cost strategies with satisfactory results in removing fuels from contaminated soils (KUPPUSAMY et al., 2017).

Bioremediation is a process that might occur naturally in soils, where microorganisms are able to attack organic contaminants, using them as a substrates for growth and energy production (DAS; CHANDRAN, 2011; LAHEL et al., 2016). Among the disadvantages of this process are its sensitivity to environmental factors, such as soil pH, the availability of limiting nutrients (N, P and K), and the number of microorganisms capable of surviving contamination and degrading the contaminant. Therefore, the efficiency of the biodegradation process is extremely dependent on these factors, which define the kinetics of microbial growth and, therefore, the degradation rate of contaminants (IMAM et al., 2019).

To overcome these drawbacks, biostimulation technologies are investigated to modify the environmental conditions aiming to improve microbial activity. In soils, pH adjustments, addition of oxygen, water and, specially, the addition of nutrients, are major biostimulation approaches.

The addition of nutrients, such as N and P, is essential to support the bioremediation process and ensure a balanced C:N:P ratio. Several studies have demonstrated that the addition of inorganic N and P resulted in the successful removal of petroleum hydrocarbons from soils. However, there are reports of adverse effects, such as the leaching of N and P, with the consequent contamination of aquatic environments, in addition to a deregulation of soil pH (HOREL; MORTAZAVI; SOBECKY, 2015). An alternative, although limitedly explored, is the addition of organic matter to contaminated soils, capable of providing the necessary nutrients for microorganisms in an efficient and safe way to the environment.

In this context, the objective of this work was to determine, in a pristine soil, the effects of organic and inorganic amendments on the degradation of commercial S10 diesel with 12% biodiesel (B12). Specifically, basal soil respiration, total and degrading heterotrophic bacteria, soil pH, carbon and nitrogen concentrations, and the efficiency of fuel removal were evaluated in soil microcosms during 93 days.

MATERIAL AND METHODS

SOIL, FUEL, AND (IN)ORGANIC AMENDMENTS

Soil

The soil used in this study was collected from an area covered by native vegetation in the Santo Ângelo municipality, Rio Grande do Sul state, Brazil (coordinates: 28°17'30.24"S and 54°22'56.94"W). The area had no recorded history of fuel/hydrocarbon contamination. To remove coarse organic matter, the topsoil (0-5 cm) was withdrawn and soil was sampled at the 5-10 cm depth. The collected soil was thoroughly mixed to ensure homogeneity and transported to the laboratory (NWANKWEGU et al., 2016). This soil sample was dried at room temperature for two days and then sieved, using a 2 mm mesh sieve (COLLA et al., 2014). The physicochemical properties of the soil prior to contamination with the diesel-biodiesel blend are presented in Table 1.

Table 1 – Chemical and physical properties of the soil used in the study

| Parameters | Value |
|---|-------|
| Clay (%) | 42 |
| pH (in H ₂ O) | 5.9 |
| P (mg.dm ⁻³) | 5.5 |
| K (mg.dm ⁻³) | 237 |
| Organic Matter (%) | 4.2 |
| Al (cmolc dm ⁻³) | 0.0 |
| Ca (cmolc dm ⁻³) | 10.6 |
| Mg (cmolc dm ⁻³) | 3.0 |
| H + Al (cmolc dm ⁻³) | 2.6 |
| CEC effective (cmolc dm ⁻³) | 14.2 |
| CEC pH 7,0 (cmolc dm ⁻³) | 16.8 |
| S (mg dm ⁻³) | 23.3 |
| Zn (mg dm ⁻³) | 11.2 |
| Cu (mg dm ⁻³) | 5.1 |
| B (mg dm ⁻³) | 1.96 |
| Mn (mg dm ⁻³) | 82 |
| Field capacity (%) | 0.50 |

Fuel

Commercial S10 diesel oil containing 12% biodiesel (B12) was acquired from a local fuel station. The fuel was filtered through 0.22 μm membranes and maintained in hermetically sealed and sterile glass bottles, protected from light to avoid photo-oxidation.

(In)organic amendments

In this study, we carried out four treatment options to evaluate the efficiency of diesel oil degradation in soils, including two organic amendments and one inorganic amendment. The first organic amendment was an organic compost, kindly donated by Ecocitrus (Cooperative of Ecological Citrus Growers of Vale do Caí, Brazil), (Figure 1a). It is produced through the composting of various residues, including pruning residues, urban solid residues, pulp, bagasse

and citrus fruit juice, sludges from the effluent treatment stations of beverage, dairy and cellulose industries.



Figure 1 – Organic amendments: (a) soybean hull collected from air filtration systems; (b) composting row of Ecocitrus waste.

The second organic amendment was soybean hull (Figure 1b), a residue generated during drying of soybeans, which is retained by the air filtration systems installed in a grain drying company (Santo Ângelo, Brazil). Both organic materials were crushed in a blender to ensure similar granulometry, and then sterilized in an autoclave (2 h, 121 °C; procedure repeated twice), to avoid microbiological influences. The chemical properties of the organic amendments were determined before setting up the microcosm experiment (Table 2).

Table 2 –Chemical properties of organic amendments used in this study

| Parameters | Compost | Soybean Hull |
|--|---------|--------------|
| pH (in H ₂ O 1:2.5) | 7.00 | 7.01 |
| Organic carbon (% w w ⁻¹ dry basis) | 30.00 | 38.51 |
| Nitrogen TKN (% w w ⁻¹ dry basis) | 3.10 | 2.05 |
| C/N ratio | 9.68 | 18.78 |

The inorganic amendment used in this study was a commercial NPK 10:10:10 formulation (Vitaplan, Brazil), purchased from a local market. Chemical properties are displayed in Table 3.

Table 3 –Chemical properties of inorganic amendment used in this study

| Parameters | inorganic fertilizer (NPK) |
|--|----------------------------|
| pH (in H ₂ O 1:2.5) | 4.95 |
| Organic carbon (% w w ⁻¹ dry basis) | 0 |
| Nitrogen TKN (% w w ⁻¹ dry basis) | 10 |
| Phosphor (% w w ⁻¹ dry basis) | 10 |
| Potassium (% w w ⁻¹ dry basis) | 10 |

EXPERIMENTAL DESIGN

Experiments were conducted in microcosms consisting of 3.2 L sterile airtight glass flasks. Soil was contaminated with 5% (w w⁻¹) of the commercial fuel (B12), and four different treatments were set to evaluate the efficiency of fuel attenuation, as described in Table 4. The treatments included were: (a) Remediation by natural attenuation (control; without any amendments); (b) Organic biostimulation with soybean hull amendment (SHB); (c) Organic bioestimulation with compost amendment (COB); (d) Inorganic biostimulation with NPK amendment (IB). The mass of each amendment added to soil was adjusted to achieve equal nitrogen amounts. In all treatments, the initial soil moisture was adjusted to 60% of the field capacity.

Table 4 – Design of the bioremediation experiment. ^a

| Experimental set | Description |
|------------------|--|
| Control | 700 g of pristine soil + no amendments + 35 g of B12 |
| COB | 700 g of pristine soil + 48.5 g of organic compost + 35 g of B12 |
| SHB | 700 g of pristine soil + 73.41 g of soybean hulls + 35 g of B12 |
| IB | 700 g of pristine soil + 15.05 g of inorganic NPK fertilizer + 35 of B12 |

^a Each experimental set was run in three replicates.

All amendments were sterilized before use. The soybean hull and the organic compost were crushed to make the particle sizes uniform. NPK was dissolved in sterile water for better homogenization in the soil.

Monitoring

The experimental sets were incubated at room temperature, in the dark, for 93 days. Aeration was conducted by manual soil mixing, and soil moisture was kept at around 60% of field capacity by the addition of sterile distilled water. The parameters monitored throughout the experiment are described in the following section

ANALYTICAL METHODS

Basal soil respiration

The respiratory activity of soils was evaluated through the cumulative release of CO₂ (ALEF, 1995). According to Cerqueira et al. (2014), the released CO₂ was captured using 20 mL of a NaOH solution (0.5 mol L⁻¹) contained in plastic cups inside the microcosms. Microcosms without soil were used as blanks for this analysis. The NaOH solution in the microcosms was replaced periodically for the basal respiration determination. The residual amount of NaOH was titrated with HCl (0.5 mol L⁻¹) after the addition of 1 mL BaCl₂ (30%, m v⁻¹). The indicator used for titration was 1% phenolphthalein.

The release of C-CO₂ from the soil was calculated by the equation (1):

$$C - CO_2(mg\ kg\ soil^{-1}) = \frac{(V_B - V_T).eq.M_{HCl}.FC}{m} \quad (1)$$

where: V_B is volume (mL) of HCl (0.5 mol L⁻¹) used to titrate the blank proof; V_T is volume (mL) of HCl (0.5 mol L⁻¹) used to titrate residual NaOH in microcosm treatments; eq is the carbon equivalent-gram (equal to 6); M_{HCl} is the concentration (mol L⁻¹) of the standardized HCl solution; FC is the correction factor for the molarity (mol L⁻¹ HCl/mol L⁻¹ NaOH), and m is the mass (kg) of dry soil in the microcosms (kg).

Quantification of total heterotrophic bacteria

The population of total heterotrophic bacteria was determined using the Most Probable Number (MPN) method, according to Bento et al. (2005), with modifications. Briefly, soil samples from each treatment (1 g) were mixed with 9 mL of sterile saline (8.5 g L⁻¹), vortexed for 30 min. Decimal serial dilutions were prepared in sterile saline up to 10⁻¹⁰. Sterile Tryptic Soy Broth (TSB) was dispensed (250 µL) into 96-well microtitre plates and wells were inoculated with 10 µL of the respective dilutions. The microbial growth was determined by medium turbidity, after 10 days of incubation at 30 °C. The number estimative of total heterotrophic bacteria microbial population was then determined using MPN tables (BLODGETT, 2020).

Quantification of B12 degraders bacteria (Most Probable Number Method)

The population of B12 degraders was also determined through the MPN method. This evaluation was performed using the artificial electron acceptor 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) (BRADDOCK; CATTERALL, 1999). When reduced, the TTC is converted into a pink colored compound (formazan), indicating that the organic substrate (fuel) has been oxidized by the action of bacteria. Bushnell-Hass broth (MgSO₄, 0,2 g L⁻¹; CaCl₂, 0,02 g L⁻¹; KH₂PO₄, 1,0 g L⁻¹; K₂HPO₄, 1,0 g L⁻¹; (NH₄)₂SO₄, 1,0 g L⁻¹; FeCl₃ 0,05 g L⁻¹) containing TTC (0,05 g L⁻¹) The only carbon source for microbial growth was the B12 blend. Soil samples from each treatment (1 g) were used to prepare decimal serial dilutions as described in the previous section. A sample of 100 µL of each dilution was added, in triplicates, to 185 µL of Bushnell-Hass broth and 15 µL (5%, v v⁻¹) of the filter-sterilized B12 fuel, in sterile 96-well microtiter plates. The microbial growth was determined by the development of a pink color, after 14 days of incubation at 30 °C (CERQUEIRA et al., 2014). The number of fuel degraders was then determined using MPN tables (BLODGETT, 2020).

Soil pH

The soil pH was determined by mixing 10 g of soil and 25 mL of distilled water (1:2.5) (EMBRAPA, 1997). The flasks were agitated for 1 h, and then the pH was measured (mPA-210 pH meter; MS Technopon, Brazil).

Soil Phytotoxicity

The phytotoxicity of B12-contaminated soil was evaluated in a static test by seed germination and root elongation of cress and lettuce (AGUELMOUS et al., 2018). Seeds without any kind of treatment or chemical additives were used.

Briefly, 40 g of composite soil samples from each treatment were placed in Petri dishes. Ten seeds of each tested species were equally spaced in the dishes, and incubated for 10 days at 23 °C, sheltered from light. The soil moisture was controlled throughout the incubation, and sterile distilled water was added if necessary. After this period, the number of germinated seeds was counted and the root elongations were measured from the transition point between the hypocotyl to its end. If a root was visible, the seed was classified as "germinated" (SATERBAK et al., 1999). The pristine soil was used as control and all experiments were conducted in three replicates.

Relative Seed Germination (GR), Relative Root Elongation (RE) and Germination Index (IG), a factor of relative seed germination and relative root elongation, were calculated as follows (NWANKWEGU; ORJI; ONWOSI, 2016a):

$$RG (\%) = \left(\frac{\text{Number of seeds germinated in contaminated soil}}{\text{Number of seeds germinated in control}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

$$RE (\%) = \left(\frac{\text{mean root length in contaminated soil}}{\text{mean root length in control}} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

$$IG (\%) = \left(\frac{RG(\%) \cdot RE(\%)}{100} \right) \quad (4)$$

Soil nitrogen

To determine the Total Kjeldahl Nitrogen (TKN) of the soil, the Semi-Micro-Kjeldahl method of APHA Standard Method (4500-N). The nitrogen concentration in the soil is determined by the equation flap:

$$N (g N kg soil^{-1}) = \frac{(A-B) \cdot 14 \cdot 1000}{V_a \cdot m_s} \quad (5)$$

where: A is the volume of sulfuric acid used to titrate the sample; B is the volume of sulfuric acid used to titrate the control; Va is the sample volume; ms is the soil mass used in the experiment; 14 is a correction factor; and 1000 is the unit conversion factor.

Ammoniacal nitrogen in the soil was determined using the same procedure describe above, except for sample digestion. The ammoniacal nitrogen was calculated by the Equation (7). The organic nitrogen was obtained by the difference between the total nitrogen and the inorganic nitrogen.

Soil organic carbon

The levels of soil organic carbon (OC) were determined through wet oxidation, as described in Yeomans & Bremner (1988). Digestion of soil samples (100 mg) were done with 5 mL of $K_2Cr_2O_7$ (0.167 mol L^{-1}) and 7.5 mL of H_2SO_4 , for 30 min at $170 \text{ }^\circ\text{C}$, in a digestion block. After digestion, the extracts were transferred to 125 mL conical flasks using sufficient distilled water to obtain a final volume of about 50 mL. Unlike the method proposed by the authors, in this study, 5 mL of concentrated H_3PO_4 was added in order to improve color visualization in the titration procedure (EMBRAPA, 1997). Titration was performed with $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ solution (0.4 mol L^{-1}), using 1% diphenylamine acid solution as an indicator. Extracts without the soil sample were prepared in parallel to act as control (YEOMANS; BREMNER, 1988). Organic carbon was calculated through Equation (8):

$$C_{org} = \frac{0,003 \cdot V_d \cdot (40 - V_a) \cdot 40 / V_b \cdot 10}{m} \quad (6)$$

where: C_{org} is the concentration of organic carbon ($\text{g C kg dry soil}^{-1}$); V_d is the total volume (mL) of the potassium dichromate solution; V_a is the volume (mL) of ferrous ammonium sulfate solution spent on sample titration, in m; V_b is volume (mL) of ferrous ammonium sulfate solution spent in titrating the controls; 0.003 is the milliequivalent of carbon mass; and 10 is the unit conversion factor.

Analysis of diesel range organics (TPH DRO) in soil

Evaluations of TPH-DRO were performed for after 0, 21 and 93 days of incubation. The soil samples were collected, placed in sterile glass flasks, and stored at -4 °C until analysis. The TPH-DRO analysis was performed by a custom service (Ecocerta Laboratory, Brazil). Extractions were carried out according to the EPA method 3540C (1996), using hexane as extractant in a Soxhlet equipment. TPH-DRO quantification followed the EPA method 8015 (2003), through gas chromatography (GC-FID). The TPH-DRO comprises hydrocarbons in the range of C10 to C30 (number of carbon atoms in the molecule). Attenuation of TPH-DRO during soil incubation (days 21 and 93) was estimated as the percentage of TPH-DRO remaining in comparison to initial TPH-DRO concentration (day 0).

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm standard deviations. Statistical analyses were performed using the RStudio Software . Significant differences of parameters among the treatments were detected with two-way ANOVA ($p < 0.05$) followed by Tukey's HSD post hoc test. This statistical analysis was chosen since it allows to evaluate the influence of incubation time, treatments, and the interaction between incubation time and treatment.

RESULTS

BASAL SOIL RESPIRATION

During the first days of incubation (1-6 days), the treatments had similar behaviors ($p > 0.05$; Figure 2). From the 7th day onwards, the COB treatment started to differ ($p < 0.05$) from the Control and IB, presenting higher cumulative release of C-CO₂. After day 21, significant differences emerged between the COB and SHB treatments, with the COB treatment showing a greater cumulative respiration ($p < 0.05$; Figure 2). The SHB treatment displayed, after 40 days, increased soil respiration as compared to Control and IB, and subsequently to day 45, the control treatment showed higher respiration than IB (Figure 2).

At the end of incubations, the COB treatment resulted presented in greater cumulative release of C-CO₂ (7394.22 mg C-CO₂ kg⁻¹ dry soil) of the soil than the

other treatments ($p < 0.05$), followed by the SBH treatment (6576.87 mg C-CO₂ kg⁻¹ dry soil), Control (5293.03 mg mg C-CO₂ kg⁻¹ dry soil), and IB (4833.25 mg C-CO₂ kg⁻¹ dry soil) treatments. Thus, the results point to different effects of the organic and inorganic amendments. While organic amendments had a stimulating effect on soil respiration (COB > SHB) when compared to control, the inorganic amendments had a depressing

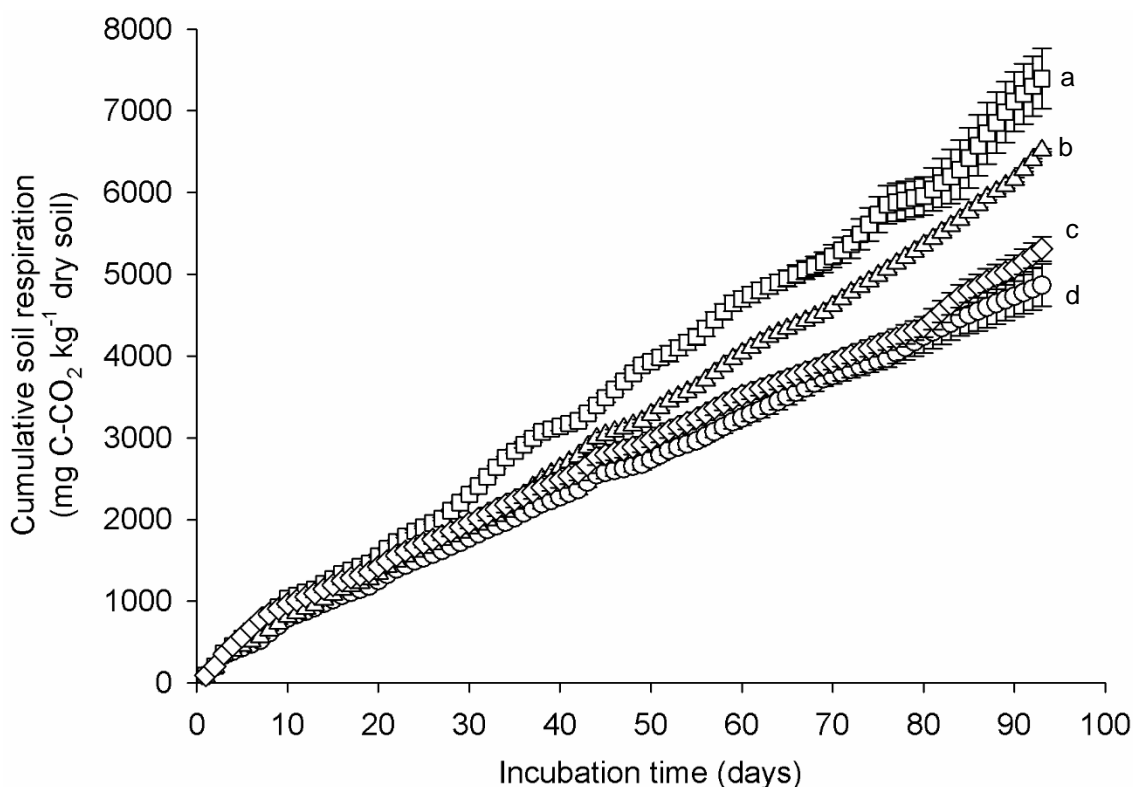


Figure 2 – Cumulative C-CO₂ release from Control (◇), COB (□), SHB (△), and IB (○) treatments, during 93 days of incubation. Distinct letters indicate significant differences ($p < 0.05$) in the final cumulative respiration between treatments.

QUANTIFICATION OF TOTAL HETEROTROPHICS BACTERIA AND B12 DEGRADERS

The number of culturable heterotrophic bacteria increased at the beginning of the experiment (0-7 days), except for the control treatment. In controls, a continuous increment in bacterial numbers was observed after day 7, reaching 10.73 Log MPN g⁻¹ dry soil at day 93 (Figure 3).

For organic amendments, similar bacterial numbers (higher than controls) were detected up to day 34. With COB, increased bacterial numbers were detected at day 55, but final numbers (day 93) were similar to controls (Figure 3). Contrarily, a substantial decline was detected at day 55 in the SHB treatment, indicating a drastic disturbance in the bacterial population, which was followed by a steep increase in bacterial numbers at day 93, reaching values similar to controls (Figure 3).

Regarding the IB treatment, after an initial increase (day 7), a significant ($p < 0.05$) reduction in bacterial populations was observed at days 22 and 34, when compared to the other treatments. However, the IB treatment displayed bacterial numbers similar to control and COB treatments at increasing incubation times. Regardless of the treatment, similar bacterial numbers ($p > 0.05$; ~ 10 Log NMP g^{-1} dry soil) were detected at the end of the experiment. However, the results point to the different effects exerted by (in)organic amendments towards heterotrophic bacteria. Stimulatory effects of the organic amendments, as compared to controls, occurred mainly between 7 -34 days (SHB) and 7 -55 days (COB), and that of IB up to day 7. In addition, transient negative effects were detected for the SHB (day 55) and IB (days 22-34) treatments.

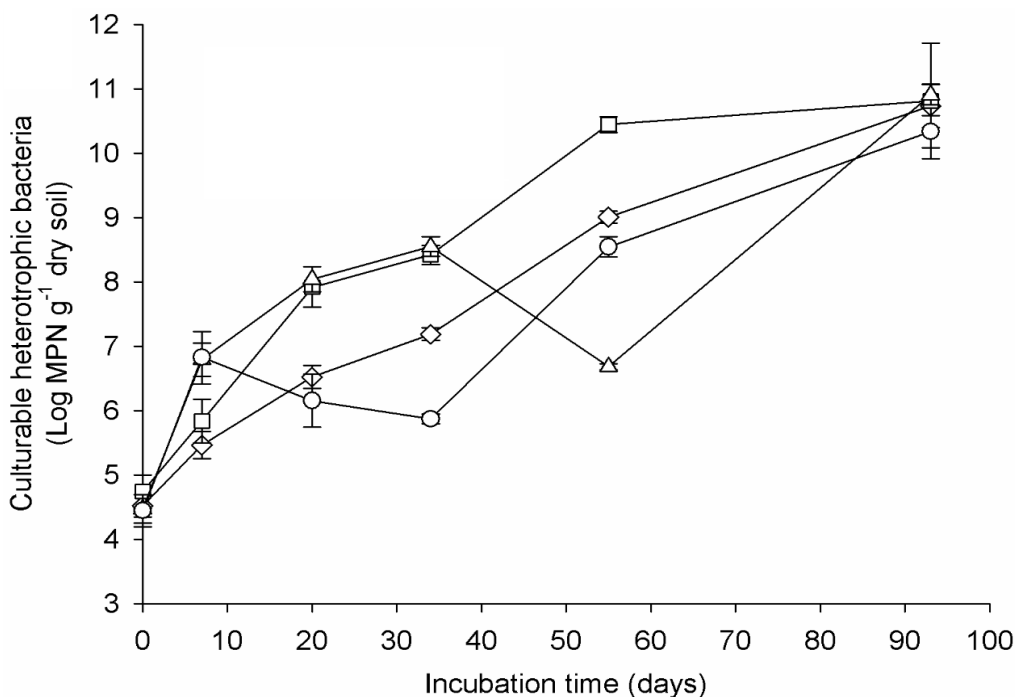


Figure 3 – Most probable number of heterotrophic in Control (◇), COB (□), SHB (△), and IB (○) treatments, during 93 days of incubation.

The number of B12-degrading bacteria, in all treatments, was lower after 7 days of incubation as compared to day 0 (Figure 4). A further decrease was detected in the SHB treatment at day 22, whereas the B12-degrading population increased in the other treatments, particularly in COB and IB, where populations were higher than controls. At day 34, the B12-degrading population in the IB and SHB treatments were lower than controls; this was maintained in IB after 55 days, whereas in SHB the bacterial numbers were similar to controls. On the other hand, the COB treatment displayed populations that were more consistently higher than controls from days 22 to 55 (Figure 4). At the end of 93 days, the soil of the microcosms harbored similar numbers of B-12 degraders, regardless of treatment. The results suggest a greater adequacy of the COB treatment, as compared to SHB and IB, to increase the overall numbers of total heterotrophic bacteria (Figure 3) and B12-degraders (Figure 4).

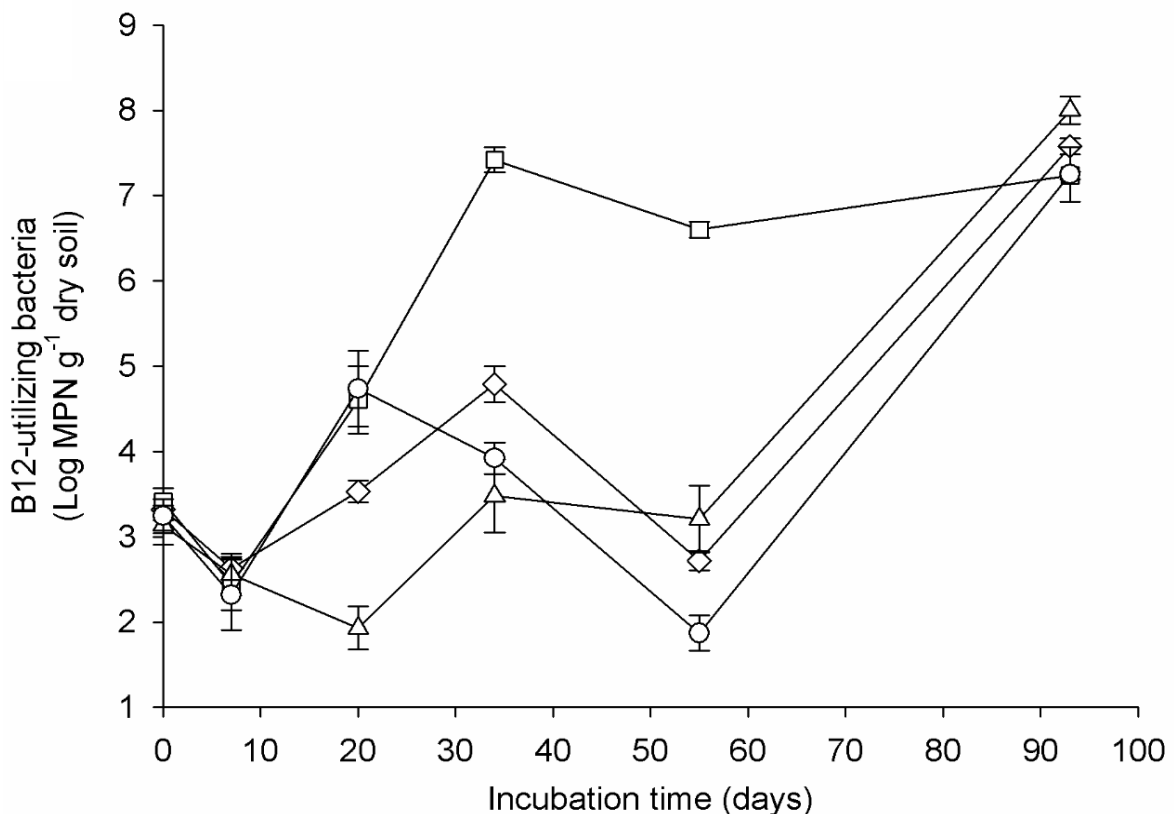


Figure 4 – Most probable number of (A) heterotrophic, and (B) B12-utilizing bacteria in Control (◇), COB (□), SHB (△), and IB (○) treatments, during 93 days of incubation.

SOIL PH

The initial soil pH was near 7.0 in all treatments (Figure 5), indicating that B12 increased the pH of the pristine soil (Table 1). There were no significant differences ($p > 0.05$) between treatments until the 7th day of incubation. On day 21, the pH of the COB treatment was higher than the IB treatment ($p < 0.05$). At day 34, the soil pH in treatment IB was more acidic (pH 6.5; $p < 0.05$) than the other treatments (pH ~ 7.5). On day 55, the pH of the IB and Control treatments were more acidic than COB ($p < 0.05$), whereas SHB displayed intermediate values. At the end of the 93-day incubation period, the IB treatments displayed lower pH values (pH 6.0) than the other treatments. Control and COB treatments displayed similar values (pH ~7.2), whereas the soil in the SHB treatment displayed the higher values (pH 7.7).

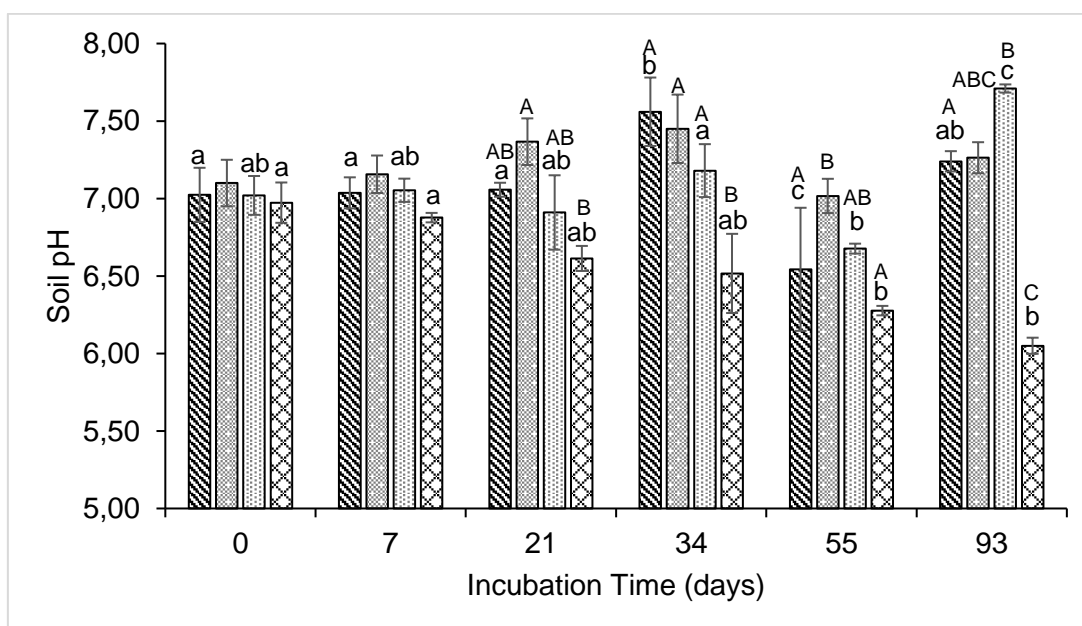


Figure 5 – Soil pH in control (▨), COB (■), SHB (▤) and IB (▩) treatments during 93 days of incubation. Distinct lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between incubation times for the same treatment; distinct uppercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments at the same incubation time.

Regarding differences within treatments during incubation, the control treatment presented significant variations in soil pH from day 34, where it was significantly less acidic than previous times. Then, pH of the control dropped

significantly at time 55, but returned to initial levels at day 93. In the SHB treatment, there were no significant pH variations until day 55, where acidification ($p < 0.05$) was detected. The pH increased significantly at day 93, which was the highest pH value attained in the SHB treatment ($p < 0.05$).

In the IB treatment, soil pH showed a trend of decreasing values as a function of incubation time, where values at days 55 and 93 were more acidic ($p < 0.05$) than initial values (0-7 days). Contrarily, soil pH in the COB treatment did not show significant variations throughout the experiment ($p > 0.05$). The results of soil pH indicate that the addition of COB was able to stabilize the soil pH, while significant variations were observed particularly in the other treatments.

SOIL PHYTOTOXICITY

Soil phytotoxicity was evaluated using cress and lettuce seeds as indicators. Relative germination (Figure 6) was different between the two types of seeds ($p < 0.05$). Cress seeds were more sensitive to contamination with B12, since the relative germination percentages were lower when compared to lettuce seeds. Using cress seeds, only the SHB treatment resulted in increased relative germination over time, from 0% at day zero to 27.8% after 93 days, which was also greater than the other treatments at the end of the microcosm experiments (Figure 6).

With lettuce seeds, the control and SHB treatments displayed increased germination ($p < 0.05$) at the end of the experiment than at day 0 (Figure 6). In contrast, in all evaluations with lettuce seeds, the COB and IB did not result in improvements in seed germination. Among the treatments, there was a greater relative germination of lettuce seeds at day 0 in the SHB treatment in relation to the other ($p < 0.05$). At the beginning of incubations, the control had a relative germination higher than IB, and the COB was not different from the control at the end of incubations, the control and SHB treatments showed relative germinations that were similar among them, but at higher levels than COB and IB. In fact, no seed germination was detected using cress and lettuce in IB treatment (Figure 6).

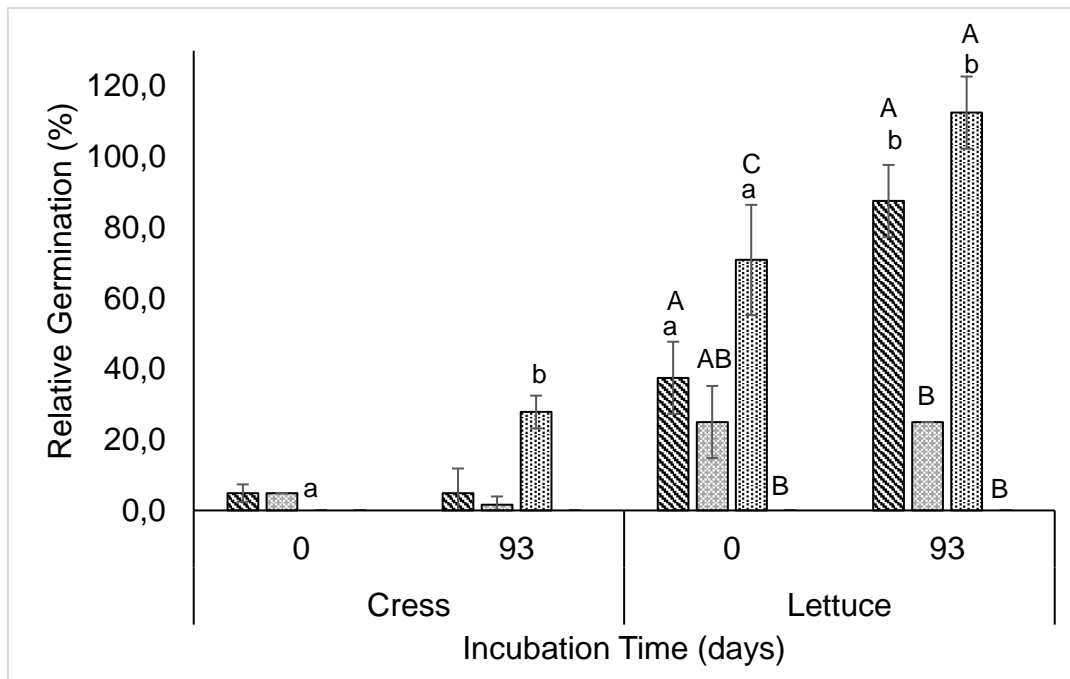


Figure 6 – Relative Germination in soil from control (▨), COB (▩), SHB (▧) and IB (▦) treatments at 0 and 93 days of incubation. Distinct lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) within each treatment at different incubation times; distinct uppercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments at a particular incubation time.

The germination index was calculated from the relative germination and radicle lengths. For cress, the germination index was equal to or below 5.2% for all treatments (Figure 7). In the COB treatment, the germination index significantly dropped ($p < 0.05$) from 5.2% (day 1) to 0.6% after 93 days. On the other hand, the germination index for the SHB treatment was improved, from 0% at day 1 to 71% at the end of incubation. In the control and IB treatments, variations were not significant.

Using lettuce seeds, there was a significant improvement ($p < 0.05$) in the germination index of the control and SHB treatments after 93 days (Figure 7). The germination index of lettuce in the COB treatment decayed from day zero (20%) to day 93 (3.2%), similarly to evaluations using cress seeds. No seed germination (cress and lettuce) occurred using soil from the IB treatment, indicating a potential contribution of the NPK amendment to increased soil phytotoxicity. The results obtained from the cress and lettuce assays indicate that

the SHB treatment, particularly, might contribute to alleviate the phytotoxic effects of B12.

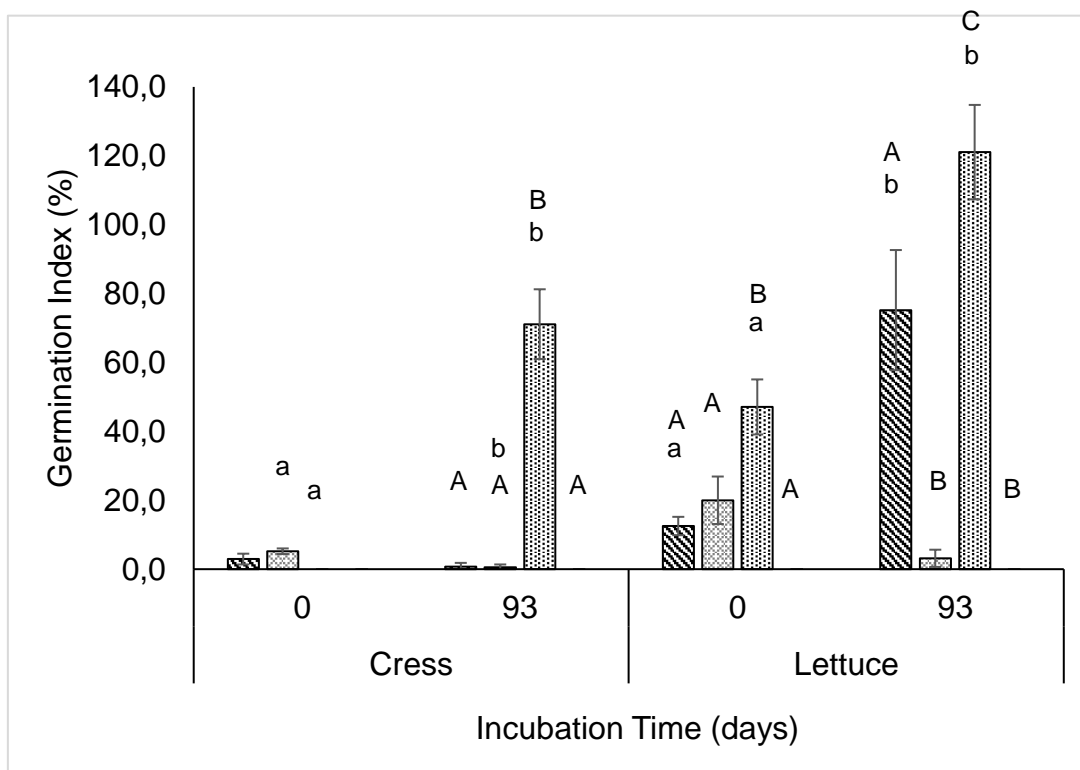


Figure 7 – Index of Germination in soil from control (■), COB (■), SHB (■) and IB (■) treatments at 0 and 93 days of incubation. Distinct lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) within each treatment at different incubation times; distinct uppercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments at a particular incubation time.

NITROGEN

Soil samples were collected from the microcosms to evaluate TKN, ammoniacal nitrogen and organic nitrogen at the beginning (day 0) and at the end (day 93) of incubations. As expected, the initial TKN was higher in amended soils than in control ones (Table 5). At the end of incubations, the TKN was significantly lower ($p < 0.05$) than the values measured at the beginning of the experiment (day 0) for the Control and COB, but differences were not significant ($p > 0.05$) for the SHB and IB treatments. The IB treatment displayed higher total nitrogen than the other treatments ($p > 0.05$) after 93 days, whereas the COB

treatment showed a TKN value that was similar to the control. The SHB treatment was similar to the Control ($p>0.05$), but significantly ($p<0.05$) higher than the COB treatment and lower than IB, after 93 days.

Results obtained at day 0 indicate that the compost (COB treatment) had a higher ammoniacal N content than soybean hulls (SHB treatment) (Table 5). As expected, the IB treatment showed the highest values of ammoniacal N throughout the experiment ($p<0.05$). The variations of ammoniacal nitrogen in the soil over time were significant ($p<0.05$) only for the COB and Control treatment, with lower values after 93 days. After 93 days, ammoniacal N in the COB treatment dropped to levels similar ($p>0.05$) to those of the control and SHB, whereas inorganic N in SHB was significantly ($p<0.05$) higher than in the control treatment.

The content of organic N in soils was determined from the difference between total and inorganic nitrogen. The SHB and COB treatments showed higher values than IB and controls at day 0 (Table 5). At the end of incubations, variations of soil organic nitrogen occurred in all treatments, except in the control. Control and SHB treatments presented, after 93 days, similar levels of organic nitrogen, which were higher ($p<0.05$) than that in COB and IB treatment (similar to each other, $p>0.05$).

Table 5 – Initial (day 0) and final (day 93) contents of total Kjeldahl nitrogen (TKN), ammonium nitrogen (ammonium-N), and organic nitrogen (organic-N) in Control, COB, SHB, and IB treatments

| Treatment | Incubation time (day) | TKN (g kg ⁻¹ dry soil)* | Ammonium-N (g kg ⁻¹ dry soil)* | Organic-N (g kg ⁻¹ dry soil)* |
|-----------|--------------------------|---------------------------------------|--|---|
| Control | 0 | 3.42 aA | 0.66 aA | 2.76 aA |
| | 93 | 2.52 bA | 0.30 bA | 2.22 bA |
| COB | 0 | 4.90 aB | 1.41 aB | 3.49 aB |
| | 93 | 2.42 bA | 0.42 bAB | 2.00 bA |
| SHB | 0 | 4.93 aB | 0.69 aA | 4.24 aC |
| | 93 | 3.29 bB | 0.81 aB | 2.48 bA |
| IB | 0 | 4.82 aB | 2.28 aC | 2.54 aA |
| | 93 | 4.26 bC | 2.31 aC | 1.95 bA |

*Distinct lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) within each treatment at different incubation times; distinct uppercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments at a particular incubation time.

ORGANIC CARBON

Soil organic carbon contents were assessed over the 93 days of the experiment (Figure 8). On day 0, soil organic carbon differed ($p < 0.05$) between treatments, except for Control and BI, which had similar organic C. The SHB treatment showed the highest amount of organic carbon, followed by COB and finally, Control and IB, which was expected since the SHB treatment had the greatest mass addition of organic material, followed by the treatment COB, and Control and BI, that had no added organic material.

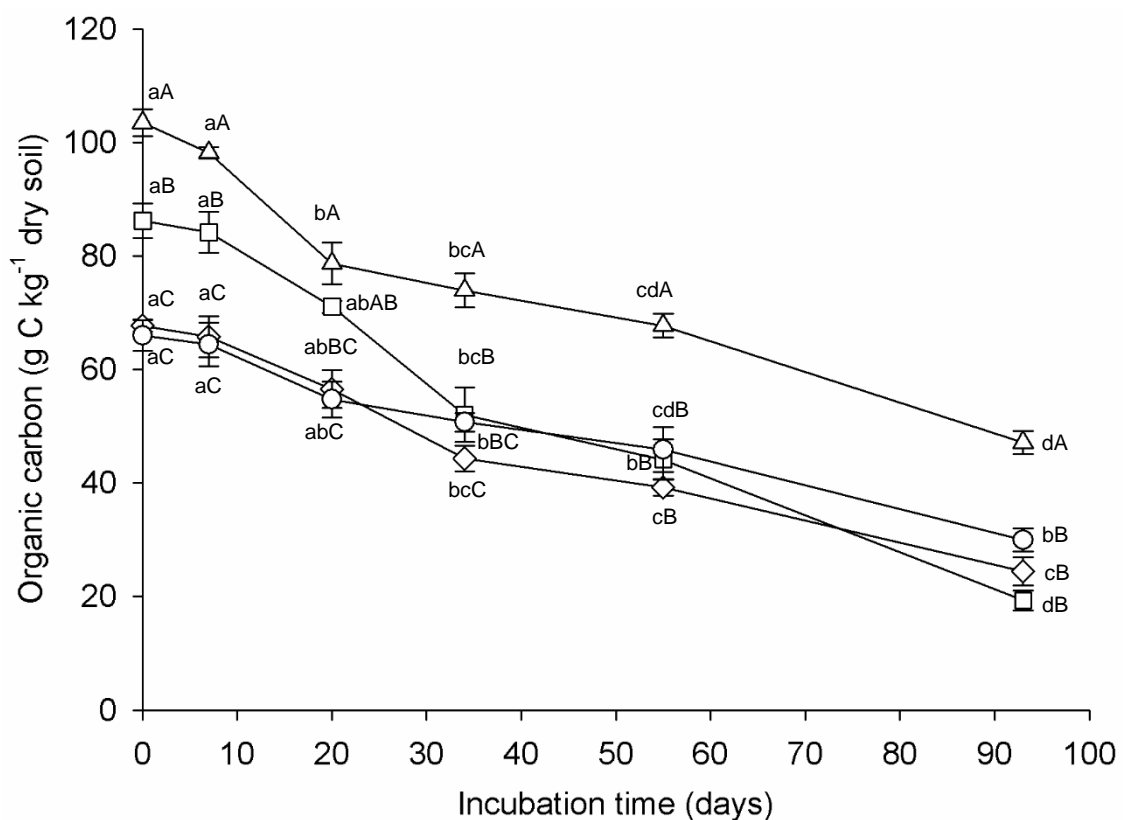


Figure 8 – Organic carbon content evaluated in Control (◇), COB (□), SHB (△), and IB (○) treatments, as a function of incubation time. Distinct lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) within each treatment at different incubation times; distinct uppercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments at a particular incubation time.

During the initial incubation (days 0-7), no variation in soil organic carbon was observed (Figure 8). The decrease in organic C starts clearly ($p < 0.05$) from day 7 for all treatments. There is a change in the behavior of the curve between

the 20-34 (variation of 15.11-23.22 g C kg⁻¹ dry soil) and 34-93 (variation of 4.68-12.31 g C kg⁻¹ dry soil) day intervals for the Control, SHB and IB treatments, indicating that most of the organic C was consumed until the first half of the experiment. The COB treatment presents a different behavior, with consumption of organic C similar in the first (variation of 19.65 g C kg⁻¹ dry soil) and in the second half of the experiment (variation of 20.35 g C kg⁻¹ dry soil).

At the end of the incubations, the SHB treatment has the highest levels of organic carbon (59.79 ± 2.03 g C kg⁻¹ of dry soil), followed by Control and IB (44.62 ± 2.47, and 46, 7 ± 2.01 g C kg⁻¹ of dry soil), respectively). However, the greatest degradation of organic carbon was obtained in the COB treatment, with a final value of 41.21 ± 1.7 g C kg⁻¹ of dry soil (Figure 8). Comparing the initial and final organic carbon levels in the different treatments, the greatest decrease was observed in the COB treatment (40.01 g C kg⁻¹ dry soil), followed by SHB (35.43 g C kg⁻¹ dry soil). On the other hand, the Control and IB treatments do not heat a lower consumption of soil C, which may indicate difficulty in the accessibility of the soil's natural organic C to the soil microbiota.

TOTAL PETROLEUM HYDROCARBONS-DIESEL RANGE ORGANICS (TPH-DRO) ANALYSIS

THP-DRO analysis was performed in order to evaluate the efficiency of the different biostimulation strategies for B12 attenuation. The highest B12 removal rates were observed in the control treatment. At day 21, the control treatment showed 79.28% of B12 attenuation, followed by the SHB (63.45%), IB (53.66%) and finally the COB (13.46%) treatment (Figure 9).

At the end of the experiment, a removal of 96.12% was achieved in the control treatment, as compared to removals of 87.25%, 84.21%, and 68.05% for the COB, IB and SHB treatments, respectively.

For the control, IB and SHB treatments, faster attenuation rates were observed up to day 21, with a subsequent decrease, particularly in the SHB treatment, where attenuation was negligible from day 21 to day 93. A distinct behavior was noticed in the COB treatment, which displayed a lower attenuation rate between days 0 and 21, which was subsequently faster from day 21 to day 93 (Figure 9).

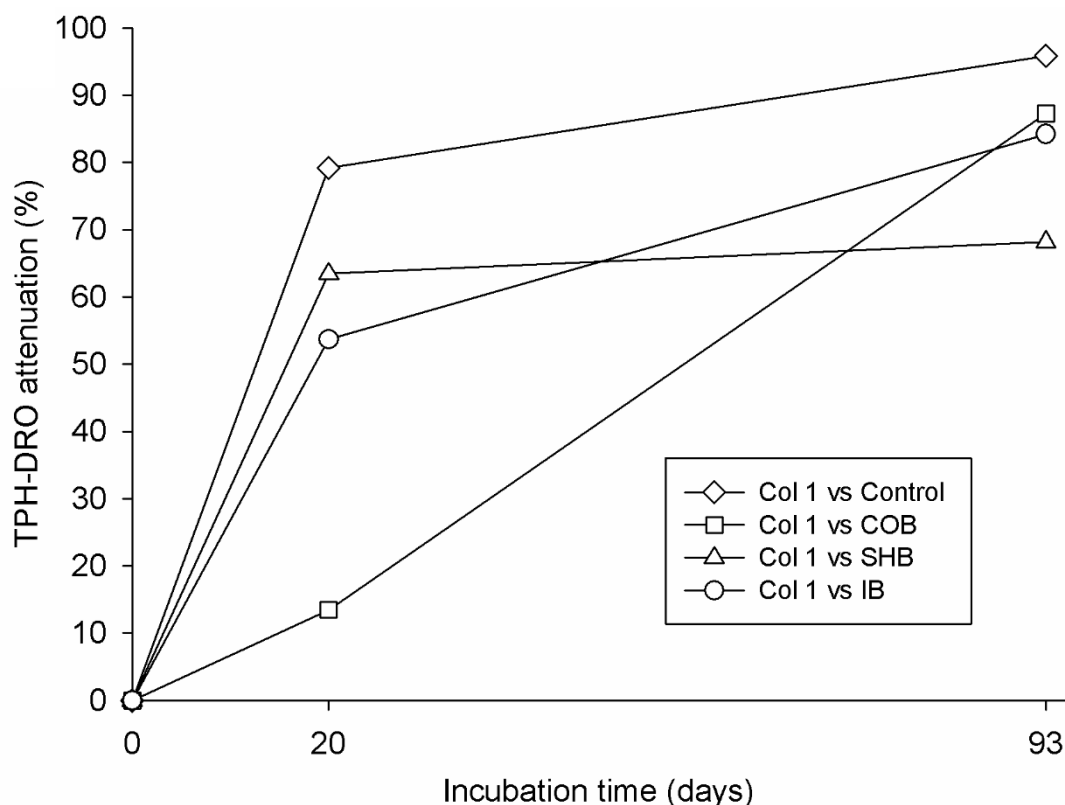


Figure 9 – Attenuation of TPH-DRO evaluated after 20 and 93 days of incubation in Control (\diamond), COB (\square), SHB (\triangle), and IB (\circ) treatments.

The DRO constituents were then segregated into low (C9-C16), medium (C17-C22), and high number of carbons (C23-C30), aiming to assess if there was any influence degradability (Figure 10). For each group, the percentage of attenuation tended to increase with the course of incubation, also indicating that there was tendency of greater percentage of attenuation of B12 constituents with medium or high number of C (Figure 10).

However, despite the apparent increased degradation percentages of the intermediate and high carbon groups, it should be noted that B12 is constituted of 60.7% C9-C16, 36.3% C17-C22, and 3% of C23-30. Therefore, in relation to the concentration of TPH-DRO, the greatest absolute attenuation occurred for the low carbon group (C9-C16).

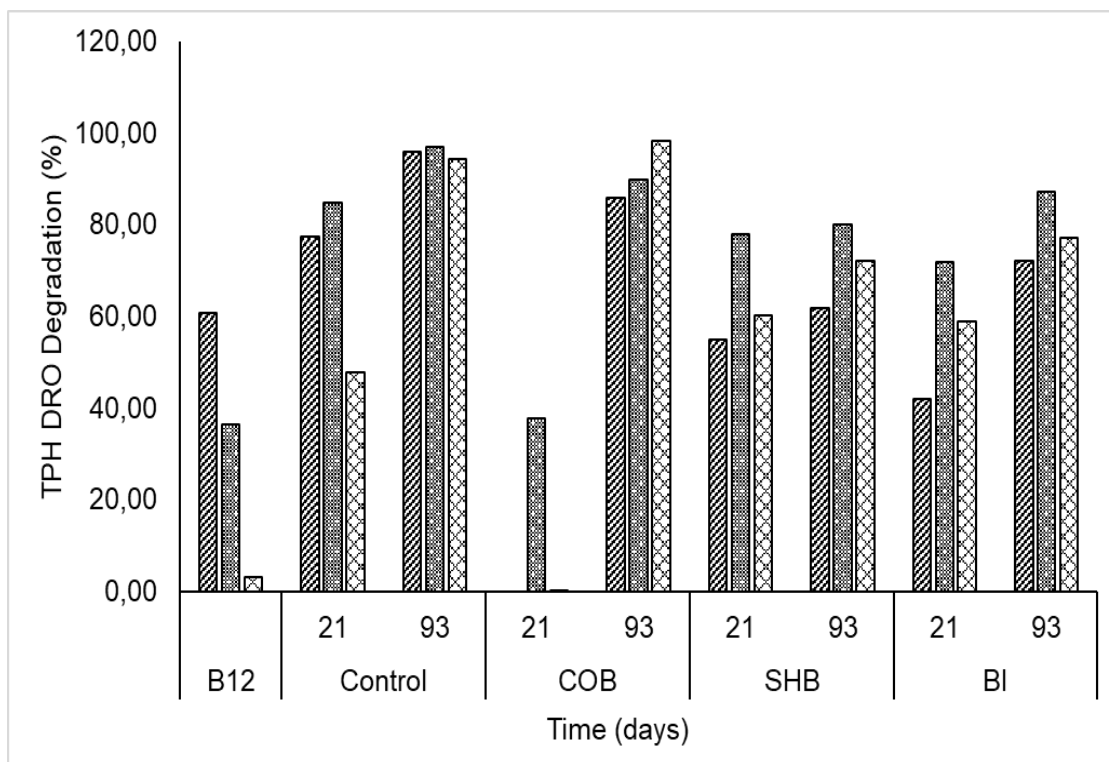


Figure 10 – TPH DRO degradation from control treatment, COB treatment, SHB treatment and IB treatment divided into short (▨), medium (▩) and long (▧) number of C, during 93 days of incubation. The B12 represent the initial percentage of each carbon range group in B12 applied to soil.

DISCUSSION

In this bioremediation experiment, soybean hulls (SHB; C:N ratio 18.78) and a commercial compost (COB; C:N ratio 9.67) were used as organic amendments to soil spiked with B12, whereas an NPK fertilizer (10:10:10) was added as a source of inorganic nutrients. Basal soil respiration was higher in the COB treatment, followed by SHB, indicating that these amendments stimulated the activity of soil microbiota, possibly by acting as additional sources of carbon and energy, when compared to controls and IB. These results are in line with that reported by Gielnik et al. (2019), where, during the process of bioremediation of petroleum hydrocarbons, the addition of organic amendment (fresh digested sewage sludge) presented highest soil respiration, followed by treatment with bulking agent (sawdust), control (natural attenuation) and the treatment with inorganic amendment ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and K_2HPO_4).

Mair, Schinner and Margesin (2013) observed that soil respiratory activity was higher in biostimulation treatments; however, differently from our results, those authors reported that the addition of inorganic fertilizers prompted a higher soil respiration. Molina-barahona et al. (2004) and Tejada et al. (2009) also observed that organic amendments were able to increase soil respiration levels. However, an increased microbial activity is not always related to enhanced degradation of hydrocarbons (REN et al., 2018), the same behavior was observed by Gielnik et al. (2019), the authors suggest that the activity of soil microorganisms is a reflection of the use of organic amendments as a source of carbon and energy and not the use of hydrocarbons.

The higher pH of contaminated soil compared to pristine soil was also reported by Ugochukwu et al. (2021), who suggested how soil pollution by hydrocarbons has the potential to increase the concentration of exchangeable bases while reducing the concentration of exchangeable acidity, there is a tendency for soil pH to increase as a result. However, other authors observed an increase in pH in soils under natural attenuation and biostimulation, induced by decreased mobility of exchangeable bases and increased hydrolytic acidity (POLYAK et al., 2018).

The soil pH in all treatments remained in a near-neutral range, which is usually favorable for microbial activities (BADZINSKI et al., 2021). The attenuation process of hydrocarbons can be responsible for pH variations, especially biodiesel esters, which can release fatty acids when they are degraded and consequently induce a drop in pH (BADZINSKI et al., 2021). Sarkar et al. (2005) also observed negative effects on the microbiota due to pH variations, especially in treatments with inorganic fertilizers, suggesting that these fertilizers can acidify the soil. On the other hand, the COB treatment did not show significant pH variations over time. According to Gielnik et al. (2019), the addition of organic amendments can stabilize the pH of the soil during the hydrocarbon biodegradation process.

The number of total heterotrophic bacteria (THB) and B12-degrading bacteria (DDB) varied over the period of the experiment. By comparing initial and final numbers, it is possible to observe an increase in the bacterial population. This finding is in line with other studies that show the growth in the number of

THB and DDB during bioremediation (CHIKERE; OBIEZE; CHIKERE, 2020; NWINYI; OLAWORE, 2017; QIN; GONG; FAN, 2013).

The increase in THB occurs up to the end of the experiments in control and COB treatments. A higher level of THB in COB might result from the use of compost in addition to B12 (NWINYI; OLAWORE, 2017). Although a similar behavior might have been expected with SHB, the transient drop at day 55 indicates that THB experienced stressful conditions that have not occurred in controls and COB.

Addition of NPK increased bacterial numbers at day 7, possibly because of the enhanced nutritional conditions in the soil; nevertheless, such an input or inorganic nutrient has no lasting effect as evaluated through THB, which might relate to an already favorable availability of nutrients in the pristine soil. On the other hand, the addition of inorganic nutrients, at a certain level, may be toxic to microorganisms and/or cause significant changes in the structure of the microbial community (FERGUSON et al., 2003; SAMPAIO et al., 2019; SHAHI et al., 2016).

The evaluation of DDB shows a lag period at the first week of incubation. Soon after, the number of diesel-degrading bacteria begins to grow, except for the SHB treatment, which appears to have undergone a longer period of acclimatization of the microbiota. An apparent latency phase in the number of THB was previously observed, although, not for degrading bacteria (SILVA-CASTRO et al., 2015). Taking the DDB in controls as the baseline, only the COB treatments resulted in increased numbers. Therefore, both contamination with B12 and the type of amendment affected the THB and DDB.

Throughout the experiment, the number of DDB was lower than the number of THB, indicating that not all bacteria were able to degrade B12, but were able to tolerate the presence of the contaminant. This is in agreement with the results found by other authors (NWANKWEGU; ORJI; ONWOSI, 2016a).

In a similar study, authors reported that the addition of pineapple peel was more efficient in stimulating THB and DDB than the addition of potato peel during the process of bioremediation of soils contaminated with engine oil (NWINYI; OLAWORE, 2017). Sawdust as a bulking agent was able to stimulate the growth of THB, however at levels above 5% w/w this amendment was toxic to microorganisms (ALVIM; PONTES, 2018).

The decrease in the number of THB and DDB, especially on day 55, may be due to an accumulation of secondary metabolites from the bioremediation process, which may hinder microbial activity, as suggested by Sampaio et al. (2019) who observed similar behavior in a study with soil contaminated by petroleum hydrocarbons. It is important to note that the analyzes generate results that reflect only microorganisms that were able to grow at the assay conditions, that is, a small fraction of microorganisms present in soils (GEISSELER et al., 2010).

The consumption of organic carbon in COB treatments was more intense in the final half of the experiment, indicating a possible depletion of other carbon sources used so far, possibly B12. For the SHB treatment there was no consumption of organic C as expressive when no COB treatment, indicating that the soybean husk may be less susceptible to microbial attack. In the control and IB agreements, the consumption of organic carbon was higher in the first half of the experiment. As these treatments do not have the addition of active nutrients, the drop in organic carbon may be linked to the consumption of organic carbon from pure soil or from B-12 itself.

Contamination with petroleum hydrocarbons, rich in C but low in N, can deregulate the C:N ratio of the soil, causing nutrients like N to limit the bioremediation process (SINGH et al., 2017). In this experiment, it was observed that the total nitrogen of the soil had lower concentrations at the end of the experiment for the COB and control treatments. While for COB the variation in TKN reflected variations in ammoniacal-N and organic-N, for control there were only variations in ammoniacal-N. Despite not showing significant variations over time for TKN, the SHB and IB treatments displayed similar behaviors, with an increase in ammoniacal and a decrease in organic-N at the end of 93 days, indicating a process of mineralization and nitrification (ALBURQUERQUE; DE LA FUENTE; BERNAL, 2012).

Variations in the concentrations of ammoniacal-N may be due to the aerobic nitrification process (transformation of NH_4^+ into NO_2 and NO_3 , since the methodology used does not detect nitrites and nitrates), and in smaller portions the denitrification process, when aeration does not enough to provide an aerobic environment (ZHANG et al., 2019).

Ugochukwu et al. (2021) also observed a decrease in TKN concentration in soils contaminated with petroleum hydrocarbons, and suggested that the decrease in soil nitrogen is likely to be due to the adaptation of the microorganisms in the soil that are involved in natural attenuation by biodegradation.

Walworth et al. (2007) observed that part of the ammoniacal-N, added at the beginning of the soil bioremediation experiment contaminated with petroleum, was not recovered at the end of the experiment, and suggested that the ammoniacal-N could be converted into organic-N by the consumption of microorganisms.

Gao et al. (2021) showed that the addition of N in the organic form was more efficient to increase the rates of TPH degradation; however the data from this study suggest that nitrogen inputs were not able to influence the removal of TPH-DRO, whether added in organic or inorganic form.

Bioremediation has the ability to reduce the concentration of pollutants in the soil, and thus reduce toxicity. The phytotoxicity test determines which pollutant concentration is tolerated by plants (NWANKWEGU; ORJI; ONWOSI, 2016a). When grown in contaminated soil, and when applied throughout the bioremediation process, it may indicate an increase or decrease in soil toxicity. The SHB treatment showed the best results in relation to soil phytotoxicity, reaching 112% in relative germination and 121% in the germination index of lettuce seeds. The literature considers that soils with GI values above 80% are free of toxicity (NWANKWEGU; ORJI; ONWOSI, 2016a). Thus, only the SHB treatment was able to achieve an effective reduction in toxicity. Besides SHB, the control treatment increased the relative germination, and reached a germination index close to 80%.

Bamgbose e Anderson (2015) observed that some plant species, such as radish and alfalfa, may not have their germination affected by contamination with diesel, while others, such as lettuce, are highly sensitive to contamination. In the authors' experiment, diesel was phototoxic for lettuce seeds, with germination rates between 21 and 3% in soils contaminated with only 0.8% ($w w^{-1}$) of diesel. In addition, the authors report that diesel may still have negative effects on the root morphology of germinated plants.

In our experiment, both lettuce and cress were shown to be sensitive to diesel contamination, but cress was significantly more affected by diesel toxicity than lettuce. In addition to the plant species, another important factor in seed germination is the soil texture (BAMGBOSE; ANDERSON, 2015). A possible explanation for the best results found in the SHB treatment for phytotoxicity is the physical structure of the soil caused by the soybean hull, which can improve the levels of aeration, moisture and soil compaction, in order to favor seed germination. In addition, the addition of soybean hulls as a volume schedule in the treatment may have decreased the diesel concentration in contact with the seeds, decreasing the toxicity. Other authors observed that the addition of organic nutrients may be more efficient in removing toxicity from the soil than stimulation by inorganic nutrients (NWANKWEGU; ORJI; ONWOSI, 2016b; PÉREZ-ARMENDÁRIZ et al., 2004).

The high toxicity of the soil, even after the degradation of B12 may be related to by-products of the degradation of the contaminant, as well as the decrease of phytotoxicity in the SHB treatment may be a result of the adsorption of B12 and its by-products in the soybean hulls particles (VASILYEVA et al., 2020), since hydrocarbons have a high affinity for organic matter and can easily adsorb to organic materials (OSSAI et al., 2020).

Once B12 may have been adsorbed by the soybean hull in the SHB treatment, this may result in a decrease in the contaminant's bio-availability, decreasing its attenuation. Some authors report the existence of residual concentration problem or degradation plateau, when the degradation of the contaminant is compromised by the diffusion of the pollutant, it is delayed by repeated sorption and desorption to the organic material present in the soil, thus, the maximum percentage of attenuation is directly linked to the amount of organic matter capable of adsorb the contaminant (CHAÎNEAU et al., 2002; GRACE LIU et al., 2013; NAM; CHUNG; ALEXANDER, 1998).

The decrease in TPH-DRO over time can be attributed to biotic and abiotic factors. Abiotic factors are losses due to evaporation, sorption and the incidence of light, for example. Biotic losses are those resulting from the action of the soil microbiota to mineralize the contaminants (MAIR; SCHINNER; MARGESIN, 2013).

The highest attenuation rates occurred in the first days of the experiment (up to the 21st day of incubation). Gao et al. (2021), in an experiment conducted on soil artificially contaminated with diesel (11900 mg TPH kg⁻¹ soil) and biostimulated with organic and inorganic sources of N, reported that most of the short chain alkanes were degraded in 30 days. Other authors have reported similar behaviors, with most of the TPH removal occurring at the beginning of the bioremediation process, followed by a stabilization in removal rates (BROWN et al., 2017; HAMDAN; SALAM, 2020; LIU et al., 2019b; WANG et al., 2016). The decrease in the rate of degradation throughout the experiment may be due to the fact that the remaining compounds are the most stable and less biodegradable (WANG et al., 2016).

With a more detailed analysis of TPH-DRO degradation, it is possible to see that the medium and long chains were the ones with the highest degradation percentages. These data are in agreement with that found by (BARRUTIA et al., 2011).

The COB treatment was the only one that showed a different TPH-DRO degradation dynamics, with a more pronounced removal rate after 21 days of incubation. The effect of biostimulation was more prominent in the soil's respiratory activity than in the removal of TPH-DRO, showing that the nutrients actually stimulated the microbiota; however, the metabolic activity may not have been used entirely for the degradation of the contaminant (MAIR; SCHINNER; MARGESIN, 2013).

Although the addition of organic fertilizers can be a source of nutrients and stimulate the microbiota, the addition of easily degradable organic matter can compete with the degradation of contaminants, reducing the rate of degradation (CHIKERE; OBIEZE; CHIKERE, 2020). The greater decay of organic carbon in the COB treatment in relation to the other treatments is an indication that, in fact, the microbiota was consuming the organic matter of the COB. Mair, Schinner and Margesin (2013) showed in their study, conducted on soil in a European alpine region contaminated by petroleum hydrocarbons (gasoline and diesel), that natural attenuation had a self-performance in removing the contaminant, with biostimulation treatments being only about 10% more efficient. Other studies, however, indicate that natural attenuation may not be efficient for

the removal of total oil hydrocarbons, reaching levels below 10% of TPH removal (CHIKERE; OBIEZE; CHIKERE, 2020; OBIEZE et al., 2020) (GAO et al., 2021).

In conclusion, natural attenuation proved to be the most efficient treatment alternative for B12 removal in the investigated soil, while being the simplest and most economical option. The fact that the control treatment was the most efficient in removing the contaminant provides an indication that the soil in the region is capable of sustaining the bioremediation process without the need for interventions, because the soil already had natural physical characteristics and nutritional conditions capable of supporting the bioremediation process. Despite the supplementation of N to B12-spiked soils, and the improvement in aspects such as phytotoxicity (SHB treatment), increased number of bacteria and pH control (COB treatment), this was not reflected in increased rates of B12 attenuation. Such results, and also those obtained in the NPK treatment, suggest that, in addition to the nature of the amendment, there might be a certain level or limit for the nutritional supplementation to be able to accelerate B12 degradation.

REFERENCES

- ABDULLAH, S. R. S.; AL-BALDAWI, I. A.; ALMANSOORY, A. F.; PURWANTI, I. F.; AL-SBANI, N. H.; SHARUDDIN, S. S. N. Plant-assisted remediation of hydrocarbons in water and soil: Application, mechanisms, challenges and opportunities. **Chemosphere**, v. 247, p. 125932, 2020.
- ADAM, G.; DUNCAN, H. Influence of diesel fuel on seed germination. **Environmental Pollution**, v. 120, n. 2, p. 363–370, 2002.
- AGAMUTHU, P.; TAN, Y. S.; FAUZIAH, S. H. Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soil Using Selected Organic Wastes. **Procedia Environmental Sciences**, v. 18, p. 694–702, 2013.
- AGUELMOUS, A.; EL FELS, L.; SOUABI, S.; ZAMAMA, M.; YASRI, A.; LEBRIHI, A.; HAFIDI, M. Petroleum sludge bioremediation and its toxicity removal by landfill in gunder semi-arid conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, n. October, p. 482–487, 2018.
- ALAYÓN, S.; SIGUT, M.; ARNAY, R.; TOLEDO, P. Time windows: The key to improving the early detection of fuel leaks in petrol stations. **Safety Science**, v. 130, n. February, p. 104874, 2020.

- ALBURQUERQUE, J. A.; DE LA FUENTE, C.; BERNAL, M. P. Chemical properties of anaerobic digestates affecting C and N dynamics in amended soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 160, p. 15–22, 2012.
- ALEF, K. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry; Chapter 10: Field methods Estimation of soil respiration. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**, p. 463–490, 1995.
- ALVIM, G. M.; PONTES, P. P. Aeration and sawdust application effects as structural material in the bioremediation of clayey acid soils contaminated with diesel oil. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 6, n. 3, p. 253–260, 2018.
- ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO, M. A.; NOCERINO, G.; BERNASCONI, S.; DELL'AMICO, E.; COLOMBO, M.; GIANFREDA, L. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. **Chemosphere**, v. 57, n. 5, p. 401–412, 2004.
- ANP. Ministério De Minas e Energia Agência Nacional Do Petróleo, Gás Natural E Biocombustíveis Presidente Da República Diretor-Geral. **Agência Nacional Do Petróleo, Gás Natural E Biocombustíveis**, p. 265, 2020.
- APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater (SMEWW)**, 23^a Ed., Method 4500-N.
- ARAÚJO, M. E. DE; RAMALHO, C. W. N.; MELO, P. W. DE. Artisanal fishers, consumers and the environment: immediate consequences of the oil spill in Pernambuco, Northeast Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 36, n. 1, p. e00230319, 2020.
- BADZINSKI, C.; FERRAZ RAMOS, R.; GODOI, B.; DAROIT, D. J. Soil acidification and impacts over microbial indicators during attenuation of soybean biodiesel (B100) as compared to a diesel-biodiesel blend (B8). **Fuel**, v. 289, n. November 2020, p. 119989, 2021.
- BAMGBOSE, I. A.; ANDERSON, T. A. Ecotoxicity of three plant-based biodiesels and diesel using, *Eisenia fetida*. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 113965, 2020.
- BAMGBOSE, I.; ANDERSON, T. A. Phytotoxicity of three plant-based biodiesels, unmodified castor oil, and Diesel fuel to alfalfa (*Medicago sativa* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.), radish (*Raphanus sativus*), and wheatgrass (*Triticum aestivum*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 268–274,

- 2015.
- BARRUTIA, O.; GARBISU, C.; EPELDE, L.; SAMPEDRO, M. C.; GOICOLEA, M. A.; BECERRIL, J. M. Plant tolerance to diesel minimizes its impact on soil microbial characteristics during rhizoremediation of diesel-contaminated soils. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 19, p. 4087–4093, 2011.
- BEHRENBRUCH, P.; DEDIGAMA, T. Classification and characterisation of crude oils based on distillation properties. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 57, n. 1–2, p. 166–180, 2007.
- BESHA, A. T.; BEKELE, D. N.; NAIDU, R.; CHADALAVADA, S. Recent advances in surfactant-enhanced In-Situ Chemical Oxidation for the remediation of non-aqueous phase liquid contaminated soils and aquifers. **Environmental Technology and Innovation**, v. 9, p. 303–322, 2018.
- BLODGETT, R. Bacterial Analytical Manual, Appendix 2 Most Probable Number from Serial Dilutions. **Food and Drug Administration (FDA)**, p. 1–27, 2020.
- BOSSA, A. Y.; DIEKKRÜGER, B.; GIERTZ, S.; STEUP, G.; SINTONDI, L. O.; AGBOSSOU, E. K.; HIEPE, C. Modeling the effects of crop patterns and management scenarios on N and P loads to surface water and groundwater in a semi-humid catchment (West Africa). **Agricultural Water Management**, v. 115, p. 20–37, 2012.
- BROWN, D. M.; OKORO, S.; VAN GILS, J.; VAN SPANNING, R.; BONTE, M.; HUTCHINGS, T.; LINDEN, O.; EGBUCHE, U.; BRUUN, K. B.; SMITH, J. W. N. Comparison of landfarming amendments to improve bioremediation of petroleum hydrocarbons in Niger Delta soils. **Science of the Total Environment**, v. 596–597, p. 284–292, 2017.
- CERQUEIRA, V. S.; PERALBA, M. DO C. R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Comparison of bioremediation strategies for soil impacted with petrochemical oily sludge. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 95, n. PB, p. 338–345, 2014.
- CHAÎNEAU, C. H.; YEPREMIAN, C.; VIDALIE, J. F.; DUCREUX, J.; BALLERINI, D. BIOREMEDIATION OF A CRUDE OIL-POLLUTED SOIL : p. 419–440, 2002.
- CHEN, C. H.; LIU, P. W. G.; WHANG, L. M. Effects of natural organic matters on bioavailability of petroleum hydrocarbons in soil-water environments. **Chemosphere**, v. 233, p. 843–851, 2019.

- CHEN, M.; XU, P.; ZENG, G.; YANG, C.; HUANG, D.; ZHANG, J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 745–755, 2015.
- CHEN, Y. A.; LIU, P. W. G.; WHANG, L. M.; WU, Y. J.; CHENG, S. S. Biodegradability and microbial community investigation for soil contaminated with diesel blending with biodiesel. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 130, p. 115–125, 2019.
- CHEN, Y. A.; GRACE LIU, P. W.; WHANG, L. M.; WU, Y. J.; CHENG, S. S. Effect of soil organic matter on petroleum hydrocarbon degradation in diesel/fuel oil-contaminated soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 129, n. 5, p. 603–612, 2020.
- CHIKERE, C. B.; OBIEZE, C. C.; CHIKERE, B. O. Biodegradation of artisanally refined diesel and the influence of organic wastes on oil-polluted soil remediation. **Scientific African**, v. 8, p. e00385, 2020.
- CNPE. Resolução nº 16, de 29 de outubro de 2018, do Conselho Nacional de Política Energética - CNPE (In portuguese). **Diario oficial da União**, n. 61, p. 1–5, 2018.
- DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1–13, 2011.
- DEMELLO, J. A.; CARMICHAEL, C. A.; PEACOCK, E. E.; NELSON, R. K.; SAMUEL AREY, J.; REDDY, C. M. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, n. 7, p. 894–904, 2007.
- DIAS, R. L.; RUBERTO, L.; HERNÁNDEZ, E.; VÁZQUEZ, S. C.; LO BALBO, A.; DEL PANNO, M. T.; MAC CORMACK, W. P. Bioremediation of an aged diesel oil-contaminated Antarctic soil: Evaluation of the “on site” biostimulation strategy using different nutrient sources. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 75, p. 96–103, 2012.
- DING, D.; SONG, X.; WEI, C.; LACHANCE, J. A review on the sustainability of thermal treatment for contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 253, p. 449–463, 2019.

- DORAN, J. W.; ZEISS, M. R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, v. 15, n. 1, p. 3–11, 2000.
- DREIJ, K.; LUNDIN, L.; LE BIHANIC, F.; LUNDSTEDT, S. Polycyclic aromatic compounds in urban soils of Stockholm City: Occurrence, sources and human health risk assessment. **Environmental Research**, v. 182, n. November 2019, 2020.
- EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. [s.l.: s.n.]. v. 26
- EZE, M. O.; GEORGE, S. C.; HOSE, G. C. Dose-response analysis of diesel fuel phytotoxicity on selected plant species. **Chemosphere**, v. 263, p. 128382, 2021.
- FERGUSON, S. H.; FRANZMANN, P. D.; REVILL, A. T.; SNAPE, I.; RAYNER, J. L. The effects of nitrogen and water on mineralisation of hydrocarbons in diesel-contaminated terrestrial Antarctic soils. **Cold Regions Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 197–212, 2003.
- GAINER, A.; BRESEE, K.; HOGAN, N.; SICILIANO, S. D. Advancing soil ecological risk assessments for petroleum hydrocarbon contaminated soils in Canada: Persistence, organic carbon normalization and relevance of species assemblages. **Science of the Total Environment**, v. 668, p. 400–410, 2019.
- GAO, Y.; DU, J.; BAHAR, M.; WANG, H.; SUBASHCHANDRABOSE, S.; DUAN, L.; YANG, X.; MEGHARAJ, M. Metagenomics analysis identifies nitrogen metabolic pathway in bioremediation of diesel contaminated soil. **Chemosphere**, v. 271, p. 129566, 2021.
- GEISSELER, D.; HORWATH, W. R.; JOERGENSEN, R. G.; LUDWIG, B. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms - A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2058–2067, 2010.
- GIELNIK, A.; PECHAUD, Y.; HUGUENOT, D.; CÉBRON, A.; RIOM, J. M.; GUIBAUD, G.; ESPOSITO, G.; VAN HULLEBUSCH, E. D. Effect of digestate application on microbial respiration and bacterial communities' diversity during bioremediation of weathered petroleum hydrocarbons contaminated soils. **Science of the Total Environment**, v. 670, p. 271–281, 2019.
- GOMES, H. I.; DIAS-FERREIRA, C.; RIBEIRO, A. B. Overview of in situ and ex situ remediation technologies for PCB-contaminated soils and sediments and obstacles for full-scale application. **Science of the Total Environment**, v. 445–446, p. 237–260, 2013.

- GRACE LIU, P. W.; CHANG, T. C.; CHEN, C. H.; WANG, M. Z.; HSU, H. W. Effects of soil organic matter and bacterial community shift on bioremediation of diesel-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 661–670, 2013.
- HAMDAN, H. Z.; SALAM, D. A. Microbial community evolution during the aerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in marine sediment microcosms: Effect of biostimulation and seasonal variations. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114858, 2020.
- HOREL, A.; MORTAZAVI, B.; SOBECKY, P. A. Biostimulation of weathered MC252 crude oil in northern Gulf of Mexico sandy sediments. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 93, p. 1–9, 2014.
- HOREL, A.; MORTAZAVI, B.; SOBECKY, P. A. Input of organic matter enhances degradation of weathered diesel fuel in sub-tropical sediments. **Science of the Total Environment**, v. 533, p. 82–90, 2015.
- IMAM, A.; SUMAN, S. K.; GHOSH, D.; KANAUJIA, P. K. Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 50–64, 2019.
- IMRON, M. F.; KURNIAWAN, S. B.; ISMAIL, N. 'IZZATI; ABDULLAH, S. R. S. Future challenges in diesel biodegradation by bacteria isolates: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 251, p. 119716, 2020.
- KHAN, M. A. I.; BISWAS, B.; SMITH, E.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a review. **Chemosphere**, v. 212, p. 755–767, 2018.
- KONG, L.; GAO, Y.; ZHOU, Q.; ZHAO, X.; SUN, Z. Biochar accelerates PAHs biodegradation in petroleum-polluted soil by biostimulation strategy. **Journal of Hazardous Materials**, v. 343, p. 276–284, 2018.
- KOSHLAF, E.; SHAHSAVARI, E.; ABURTO-MEDINA, A.; TAHA, M.; HALEYUR, N.; MAKADIA, T. H.; MORRISON, P. D.; BALL, A. S. Bioremediation potential of diesel-contaminated Libyan soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 297–305, 2016.
- KUPPUSAMY, S.; THAVAMANI, P.; VENKATESWARLU, K.; LEE, Y. B.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints,

- emerging trends and future directions. **Chemosphere**, v. 168, p. 944–968, 2017.
- LAHEL, A.; FANTA, A. B.; SERGIENKO, N.; SHAKYA, M.; LÓPEZ, M. E.; BEHERA, S. K.; RENE, E. R.; PARK, H. S. Effect of process parameters on the bioremediation of diesel contaminated soil by mixed microbial consortia. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 113, p. 375–385, 2016.
- LAPINSKIENE, A.; MARTINKUS, P.; REBŽDAITE, V. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. **Environmental Pollution**, v. 142, n. 3, p. 432–437, 2006.
- LI, T.; LI, R.; ZHOU, Q. **The Application and Progress of Bioelectrochemical Systems (BESs) in Soil Remediation: A Review**. [s.l.] Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, 2020.
- LIANG, S. H.; HSU, D. W.; LIN, C. Y.; KAO, C. M.; HUANG, D. J.; CHIEN, C. C.; CHEN, S. C.; TSAI, I. J.; CHEN, C. C. Enhancement of microbial 2,4,6-trinitrotoluene transformation with increased toxicity by exogenous nutrient amendment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 138, n. July 2016, p. 39–46, 2017.
- LIU, F.; TU, T.; LI, S.; CAI, M.; HUANG, X.; ZHENG, F. Relationship between plankton-based B-carotene and biodegradable adaptability to petroleum-derived hydrocarbon. **Chemosphere**, v. 237, p. 124430, 2019a.
- LIU, X.; SELONEN, V.; STEFFEN, K.; SURAKKA, M.; RANTALAINEN, A. L.; ROMANTSCHUK, M.; SINKKONEN, A. Meat and bone meal as a novel biostimulation agent in hydrocarbon contaminated soils. **Chemosphere**, v. 225, p. 574–578, 2019b.
- MAIR, J.; SCHINNER, F.; MARGESIN, R. A feasibility study on the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from an Alpine former military site: Effects of temperature and biostimulation. **Cold Regions Science and Technology**, v. 96, p. 122–128, 2013.
- MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere**, v. 40, n. 4, p. 339–346, 2000.
- MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEGA-JARQUÍN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDOZA-

- CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**, v. 27, n. 2, p. 165–175, 2004.
- MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Screening the Toxicity and Biodegradability of Petroleum Hydrocarbons by a Rapid Colorimetric Method. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, n. 2, p. 342–353, 2015.
- MORALES-GUZMÁN, G.; FERRERA-CERRATO, R.; RIVERA-CRUZ, M. DEL C.; TORRES-BUSTILLOS, L. G.; ARTEAGA-GARIBAY, R. I.; MENDOZA-LÓPEZ, M. R.; ESQUIVEL-COTE, R.; ALARCÓN, A. Diesel degradation by emulsifying bacteria isolated from soils polluted with weathered petroleum hydrocarbons. **Applied Soil Ecology**, v. 121, n. October, p. 127–134, 2017.
- MORILLO, E.; VILLAVERDE, J. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 576–597, 2017.
- NAM, K.; CHUNG, N.; ALEXANDER, M. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 23, p. 3785–3788, 1998.
- NWANKWEGU, A. S.; ONWOSI, C. O.; ORJI, M. U.; ANAUKWU, C. G.; OKAFOR, U. C.; AZI, F.; MARTINS, P. E. Reclamation of DPK hydrocarbon polluted agricultural soil using a selected bulking agent. **Journal of Environmental Management**, v. 172, p. 136–142, 2016.
- NWANKWEGU, A. S.; ORJI, M. U.; ONWOSI, C. O. Studies on organic and inorganic biostimulants in bioremediation of diesel-contaminated arable soil. **Chemosphere**, v. 162, p. 148–156, 2016a.
- NWANKWEGU, A. S.; ORJI, M. U.; ONWOSI, C. O. Studies on organic and inorganic biostimulants in bioremediation of diesel-contaminated arable soil. **Chemosphere**, v. 162, p. 148–156, 2016b.
- NWINYI, O. C.; OLAWORE, Y. A. Biostimulation of spent engine oil contaminated soil using *Ananas comosus* and *Solanum tuberosum* peels. **Environmental Technology and Innovation**, v. 8, p. 373–388, 2017.
- OBIEZE, C. C.; CHIKERE, C. B.; SELVARAJAN, R.; ADELEKE, R.; NTUSHELO, K.; AKARANTA, O. Functional attributes and response of bacterial communities to nature-based fertilization during hydrocarbon remediation.

- International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 154, n. September, p. 105084, 2020.
- OKAFOR, C. P.; UDEMANG, N. L.; CHIKERE, C. B.; AKARANTA, O.; NTUSHELO, K. Indigenous microbial strains as bioresource for remediation of chronically polluted Niger Delta soils. **Scientific African**, v. 11, p. e00682, 2021.
- OSSAI, I. C.; AHMED, A.; HASSAN, A.; HAMID, F. S. Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. **Environmental Technology and Innovation**, v. 17, p. 100526, 2020.
- OWSIANIAK, M.; CHRZANOWSKI, Ł.; SZULC, A.; STANIEWSKI, J.; OLSZANOWSKI, A.; OLEJNIK-SCHMIDT, A. K.; HEIPIEPER, H. J. **Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants** *Bioresource Technology*, 2009.
- PÈREZ-ARMENDÁRIZ, B.; LOERA-CORRAL, O.; FERNÁNDEZ-LINARES, L.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Biostimulation of microorganisms from sugarcane bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 373–377, 2004.
- PETROBRÁS. Manual Técnico: Diesel S10. Versão 1.3. Elaborado por: Gerência de Soluções Comerciais – Marketing – Abastecimento. Gerência de Combustíveis – P&D de Abastecimento – Cenpes. v. 1, p. 170, 2014.
- PHULPOTO, I. A.; HU, B.; WANG, Y.; NDAYISENGA, F.; LI, J.; YU, Z. Effect of natural microbiome and culturable biosurfactants-producing bacterial consortia of freshwater lake on petroleum-hydrocarbon degradation. **Science of the Total Environment**, v. 751, p. 141720, 2021.
- POLYAK, Y. M.; BAKINA, L. G.; CHUGUNOVA, M. V.; MAYACHKINA, N. V.; GERASIMOV, A. O.; BURE, V. M. Effect of remediation strategies on biological activity of oil-contaminated soil - A field study. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 126, n. September 2017, p. 57–68, 2018.
- PRINCE, R. C.; HAITMANEK, C.; LEE, C. C. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. **Chemosphere**, v. 71, n. 8, p. 1446–1451, 2008.
- QIN, G.; GONG, D.; FAN, M. Y. Bioremediation of petroleum-contaminated soil by biostimulation amended with biochar. **International Biodeterioration and**

- Biodegradation**, v. 85, p. 150–155, 2013.
- QU, Y.; GONG, Y.; MA, J.; WEI, H.; LIU, Q.; LIU, L.; WU, H.; YANG, S.; CHEN, Y. Potential sources, influencing factors, and health risks of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the surface soil of urban parks in Beijing, China. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 114016, 2020.
- RAMADASS, K.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R. Ecotoxicity of measured concentrations of soil-applied diesel: Effects on earthworm survival, dehydrogenase, urease and nitrification activities. **Applied Soil Ecology**, v. 119, n. June, p. 1–7, 2017.
- REN, X.; ZENG, G.; TANG, L.; WANG, J.; WAN, J.; WANG, J.; DENG, Y.; LIU, Y.; PENG, B. The potential impact on the biodegradation of organic pollutants from composting technology for soil remediation. **Waste Management**, v. 72, p. 138–149, 2018.
- RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; DENDOOVEN, L.; ALVAREZ-BERNAL, D.; CONTRERAS-RAMOS, S. M. Potential of earthworms to accelerate removal of organic contaminants from soil: A review. **Applied Soil Ecology**, v. 79, p. 10–25, 2014.
- SAMPAIO, C. J. S.; DE SOUZA, J. R. B.; DE CARVALHO, G. C.; QUINTELLA, C. M.; ROQUE, M. R. DE A. Analysis of petroleum biodegradation by a bacterial consortium isolated from worms of the polychaeta class (Annelida): Implications for NPK fertilizer supplementation. **Journal of Environmental Management**, v. 246, n. January, p. 617–624, 2019.
- SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v. 136, n. 1, p. 187–195, 2005.
- SATERBAK, A.; TOY, R. J.; WONG, D. C. L.; MCMAN, B. J.; WILLIAMS, M. P.; DORN, P. B.; BRZUZY, L. P.; CHAI, E. Y.; SALANITRO, J. P. Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 1591–1607, 1999.
- SHAHI, A.; AYDIN, S.; INCE, B.; INCE, O. Reconstruction of bacterial community structure and variation for enhanced petroleum hydrocarbons degradation through biostimulation of oil contaminated soil. **Chemical Engineering**

- Journal**, v. 306, p. 60–66, 2016.
- SHAHSAVARI, E.; ADETUTU, E. M.; ANDERSON, P. A.; BALL, A. S. Plant residues - A low cost, effective bioremediation treatment for petrogenic hydrocarbon-contaminated soil. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 766–774, 2013.
- SHI, R.; LI, X.; YANG, Y.; FAN, Y.; ZHAO, Z. Contamination and human health risks of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface soils from Tianjin coastal new region, China. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115938, 2020.
- SHI, Z.; LIU, J.; TANG, Z.; ZHAO, Y.; WANG, C. Vermiremediation of organically contaminated soils: Concepts, current status, and future perspectives. **Applied Soil Ecology**, v. 147, n. February 2019, p. 103377, 2019.
- SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; RODRÍGUEZ-CALVO, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.; CALVO, C. Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments. **Environmental Research**, v. 137, p. 49–58, 2015.
- SINGH, P.; JAIN, R.; SRIVASTAVA, N.; BORTHAKUR, A.; PAL, D. B.; SINGH, R.; MADHAV, S.; SRIVASTAVA, P.; TIWARY, D.; MISHRA, P. K. Current and emerging trends in bioremediation of petrochemical waste: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 3, p. 155–201, 2017.
- SONG, B.; ZENG, G.; GONG, J.; LIANG, J.; XU, P.; LIU, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, C.; CHENG, M.; LIU, Y.; YE, S.; YI, H.; REN, X. Evaluation methods for assessing effectiveness of in situ remediation of soil and sediment contaminated with organic pollutants and heavy metals. **Environment International**, v. 105, n. May, p. 43–55, 2017.
- SOWANI, H.; KULKARNI, M.; ZINJARDE, S. Uptake and detoxification of diesel oil by a tropical soil Actinomycete *Gordonia amicalis* HS-11: Cellular responses and degradation perspectives. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114538, 2020.
- TEJADA, M.; HERNANDEZ, M. T.; GARCIA, C. Soil restoration using composted plant residues: Effects on soil properties. **Soil and Tillage Research**, v. 102, n. 1, p. 109–117, 2009.
- THOMAS, A. O.; LEAHY, M. C.; SMITH, J. W. N.; SPENCE, M. J. Natural attenuation of fatty acid methyl esters (FAME) in soil and groundwater. **Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology**, v. 50, n. 3,

- p. 301–317, 2017.
- UGOCHUKWU, U. C.; OKONKWO, F.; SOKARI, W.; ENEH, C.; EZOGU, L. Bioremediation Strategy Based on Risk Assessment of Exposure to Residual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Journal of Environmental Management**, v. 280, n. September 2020, p. 111650, 2021.
- UMEH, A. C.; VÁZQUEZ-CUEVAS, G. M.; SEMPLE, K. T. Mineralisation of 14C-phenanthrene in PAH-diesel contaminated soil: Impact of Sorghum bicolor and Medicago sativa mono- or mixed culture. **Applied Soil Ecology**, v. 125, n. November 2017, p. 46–55, 2018.
- VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277–286, 2017.
- VASILYEVA, G.; KONDRASHINA, V.; STRIJAKOVA, E.; ORTEGA-CALVO, J. J. Adsorptive bioremediation of soil highly contaminated with crude oil. **Science of the Total Environment**, v. 706, p. 135739, 2020.
- WALWORTH, J.; POND, A.; SNAPE, I.; RAYNER, J.; FERGUSON, S.; HARVEY, P. Nitrogen requirements for maximizing petroleum bioremediation in a sub-Antarctic soil. **Cold Regions Science and Technology**, v. 48, n. 2 SPEC. ISS., p. 84–91, 2007.
- WANG, S. Y.; KUO, Y. C.; HONG, A.; CHANG, Y. M.; KAO, C. M. Bioremediation of diesel and lubricant oil-contaminated soils using enhanced landfarming system. **Chemosphere**, v. 164, p. 558–567, 2016.
- WASLEY, J.; MOONEY, T. J.; KING, C. K. Soil invertebrate community change over fuel-contaminated sites on a subantarctic island: An ecological field-based line of evidence for site risk assessment. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 12, n. 2, p. 306–314, 2016.
- WILLIAMS, C. M.; GRIMES, J. L.; MIKKELSEN, R. L. The use of poultry litter as co-substrate and source of inorganic nutrients and microorganisms for the Ex situ biodegradation of petroleum compounds. **Poultry Science**, v. 78, n. 7, p. 956–964, 1999.
- YANTO, D. H. Y.; TACHIBANA, S. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated Pestalotiopsis sp. NG007. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 438–450, 2013.
- YE, X.; CHEN, B.; LI, P.; JING, L.; ZENG, G. A simulation-based multi-agent particle swarm optimization approach for supporting dynamic decision making

- in marine oil spill responses. **Ocean and Coastal Management**, v. 172, n. January, p. 128–136, 2019.
- YEOMANS, J. C.; BREMNER, J. M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil¹. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 19, n. 13, p. 1467–1476, 1988.
- YOUSEFI KEBRIA, D.; KHODADADI, A.; GANJIDOUST, H.; BADKOUBI, A.; AMOOZEGAR, M. A. Isolation and characterization of a novel native *Bacillus* strain capable of degrading diesel fuel. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 6, n. 3, p. 435–442, 2009.
- ZHANG, K.; HUA, X. F.; HAN, H. L.; WANG, J.; MIAO, C. C.; XU, Y. Y.; HUANG, Z. D.; ZHANG, H.; YANG, J. M.; JIN, W. B.; LIU, Y. M.; LIU, Z. Enhanced bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil using wheat straw. **Chemosphere**, v. 73, n. 9, p. 1387–1392, 2008.
- ZHANG, L.; LU, J.; YANG, Z. Computers & Industrial Engineering Dynamic optimization of emergency resource scheduling in a large-scale maritime oil spill accident. **Computers & Industrial Engineering**, v. 152, n. December 2020, p. 107028, 2021.
- ZHANG, T.; LIU, Y.; ZHONG, S.; ZHANG, L. AOPs-based remediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soils: Efficiency, influencing factors and environmental impacts. **Chemosphere**, v. 246, p. 125726, 2020.
- ZHANG, Y.; WANG, J.; DAI, S.; ZHAO, J.; HUANG, X.; SUN, Y.; CHEN, J.; CAI, Z.; ZHANG, J. The effect of C:N ratio on heterotrophic nitrification in acidic soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 137, n. May, 2019.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A adição de nutrientes orgânicos e inorgânicos tiveram efeitos sobre o processo de biorremediação de solos contaminados com B12. A adição do composto orgânico (COB) foi capaz de aumentar os números de bactérias heterotróficas totais e de bactérias degradadoras de B12, ao mesmo tempo que atuou como agente tamponante do pH do solo. A adição de casca de soja (SBH) não apresentou os mesmo efeitos que o tratamento COB, por outro lado a casca de soja colaborou para diminuição da fototoxicidade do solo, um possível efeito da função estruturante desse material no solo, melhorando características físicas como a aeração do solo.

O tratamento com fertilizante inorgânico (NPK) foi capaz de aumentar os níveis de N-inorgânico, porém parece não ter influenciado na melhoria do processo de atenuação B12. Sugere-se que exista um nível máximo de nutrientes capazes de estimular a biorremediação, e que adições acima desse nível podem não surtir efeitos positivos sob o processo.

A bioestimulação tanto orgânica quanto inorgânica não foi capaz de atingir níveis de atenuação do B12 maiores do que a própria atenuação natural, indicando que o solo possui capacidade nutricional e biótica de assimilar o contaminante e atingir o nível máximo de degradação possível.

Apesar das melhorias em alguns indicadores do processo de biorremediação, em escala real, não justificam o emprego da técnica, visto os maiores gastos empregados na aplicação de métodos de bioestimulação frente ao método de atenuação natural.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, S. R. S.; AL-BALDAWI, I. A.; ALMANSOORY, A. F.; PURWANTI, I. F.; AL-SBANI, N. H.; SHARUDDIN, S. S. N. Plant-assisted remediation of hydrocarbons in water and soil: Application, mechanisms, challenges and opportunities. **Chemosphere**, v. 247, p. 125932, 2020.
- ADAM, G.; DUNCAN, H. Influence of diesel fuel on seed germination. **Environmental Pollution**, v. 120, n. 2, p. 363–370, 2002.
- AGAMUTHU, P.; TAN, Y. S.; FAUZIAH, S. H. Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soil Using Selected Organic Wastes. **Procedia Environmental Sciences**, v. 18, p. 694–702, 2013.
- AGUELMOUS, A.; EL FELS, L.; SOUABI, S.; ZAMAMA, M.; YASRI, A.; LEBRIHI, A.; HAFIDI, M. Petroleum sludge bioremediation and its toxicity removal by landfill in gunder semi-arid conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, n. October, p. 482–487, 2018.
- ALAYÓN, S.; SIGUT, M.; ARNAY, R.; TOLEDO, P. Time windows: The key to improving the early detection of fuel leaks in petrol stations. **Safety Science**, v. 130, n. February, p. 104874, 2020.
- ALBURQUERQUE, J. A.; DE LA FUENTE, C.; BERNAL, M. P. Chemical properties of anaerobic digestates affecting C and N dynamics in amended soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 160, p. 15–22, 2012.
- ALEF, K. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry; Chapter 10: Field methods Estimation of soil respiration. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**, p. 463–490, 1995.
- ALVIM, G. M.; PONTES, P. P. Aeration and sawdust application effects as structural material in the bioremediation of clayey acid soils contaminated with diesel oil. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 6, n. 3, p. 253–260, 2018.
- ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO, M. A.; NOCERINO, G.; BERNASCONI, S.; DELL'AMICO, E.; COLOMBO, M.; GIANFREDA, L. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. **Chemosphere**, v. 57, n. 5, p. 401–412, 2004.
- ANP. Ministério De Minas E Energia Agência Nacional Do Petróleo, Gás Natural

- E Biocombustíveis Presidente Da República Diretor-Geral. **Agência Nacional Do Petróleo, Gás Natural E Biocombustíveis**, p. 265, 2020.
- ARAÚJO, M. E. DE; RAMALHO, C. W. N.; MELO, P. W. DE. Artisanal fishers, consumers and the environment: immediate consequences of the oil spill in Pernambuco, Northeast Brazil. **Cadernos de saúde publica**, v. 36, n. 1, p. e00230319, 2020.
- BADZINSKI, C.; FERRAZ RAMOS, R.; GODOI, B.; DAROIT, D. J. Soil acidification and impacts over microbial indicators during attenuation of soybean biodiesel (B100) as compared to a diesel-biodiesel blend (B8). **Fuel**, v. 289, n. December 2020, p. 119989, 2021a.
- BADZINSKI, C.; FERRAZ RAMOS, R.; GODOI, B.; DAROIT, D. J. Soil acidification and impacts over microbial indicators during attenuation of soybean biodiesel (B100) as compared to a diesel-biodiesel blend (B8). **Fuel**, v. 289, n. November 2020, p. 119989, 2021b.
- BAMGBOSE, I. A.; ANDERSON, T. A. Ecotoxicity of three plant-based biodiesels and diesel using, *Eisenia fetida*. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 113965, 2020.
- BAMGBOSE, I.; ANDERSON, T. A. Phytotoxicity of three plant-based biodiesels, unmodified castor oil, and Diesel fuel to alfalfa (*Medicago sativa* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.), radish (*Raphanus sativus*), and wheatgrass (*Triticum aestivum*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 268–274, 2015.
- BARRUTIA, O.; GARBISU, C.; EPELDE, L.; SAMPEDRO, M. C.; GOICOLEA, M. A.; BECERRIL, J. M. Plant tolerance to diesel minimizes its impact on soil microbial characteristics during rhizoremediation of diesel-contaminated soils. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 19, p. 4087–4093, 2011.
- BEHRENBRUCH, P.; DEDIGAMA, T. Classification and characterisation of crude oils based on distillation properties. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 57, n. 1–2, p. 166–180, 2007.
- BESHA, A. T.; BEKELE, D. N.; NAIDU, R.; CHADALAVADA, S. Recent advances in surfactant-enhanced In-Situ Chemical Oxidation for the remediation of non-aqueous phase liquid contaminated soils and aquifers. **Environmental Technology and Innovation**, v. 9, p. 303–322, 2018.
- BLODGETT, R. Bacterial Analytical Manual, Appendix 2 Most Probable Number

- from Serial Dilutions. **Food and Drug Administration (FDA)**, p. 1–27, 2020.
- BOSSA, A. Y.; DIEKCRÜGER, B.; GIERTZ, S.; STEUP, G.; SINTONDI, L. O.; AGBOSSOU, E. K.; HIEPE, C. Modeling the effects of crop patterns and management scenarios on N and P loads to surface water and groundwater in a semi-humid catchment (West Africa). **Agricultural Water Management**, v. 115, p. 20–37, 2012.
- BROWN, D. M.; OKORO, S.; VAN GILS, J.; VAN SPANNING, R.; BONTE, M.; HUTCHINGS, T.; LINDEN, O.; EGBUCHE, U.; BRUUN, K. B.; SMITH, J. W. N. Comparison of landfarming amendments to improve bioremediation of petroleum hydrocarbons in Niger Delta soils. **Science of the Total Environment**, v. 596–597, p. 284–292, 2017.
- CERQUEIRA, V. S.; PERALBA, M. DO C. R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Comparison of bioremediation strategies for soil impacted with petrochemical oily sludge. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 95, n. PB, p. 338–345, 2014.
- CHAÎNEAU, C. H.; YEPREMIAN, C.; VIDALIE, J. F.; DUCREUX, J.; BALLERINI, D. BIOREMEDIATION OF A CRUDE OIL-POLLUTED SOIL : p. 419–440, 2002.
- CHEN, C. H.; LIU, P. W. G.; WHANG, L. M. Effects of natural organic matters on bioavailability of petroleum hydrocarbons in soil-water environments. **Chemosphere**, v. 233, p. 843–851, 2019.
- CHEN, M.; XU, P.; ZENG, G.; YANG, C.; HUANG, D.; ZHANG, J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 745–755, 2015.
- CHEN, Y. A.; LIU, P. W. G.; WHANG, L. M.; WU, Y. J.; CHENG, S. S. Biodegradability and microbial community investigation for soil contaminated with diesel blending with biodiesel. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 130, p. 115–125, 2019.
- CHEN, Y. A.; GRACE LIU, P. W.; WHANG, L. M.; WU, Y. J.; CHENG, S. S. Effect of soil organic matter on petroleum hydrocarbon degradation in diesel/fuel oil-contaminated soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 129, n. 5, p. 603–612, 2020.

- CHIKERE, C. B.; OBIEZE, C. C.; CHIKERE, B. O. Biodegradation of artisanally refined diesel and the influence of organic wastes on oil-polluted soil remediation. **Scientific African**, v. 8, p. e00385, 2020.
- CNPE. Resolução nº 16, de 29 de outubro de 2018, do Conselho Nacional de Política Energética - CNPE (In portuguese). **Diário oficial da União**, n. 61, p. 1–5, 2018.
- DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1–13, 2011.
- DEMELLO, J. A.; CARMICHAEL, C. A.; PEACOCK, E. E.; NELSON, R. K.; SAMUEL AREY, J.; REDDY, C. M. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, n. 7, p. 894–904, 2007.
- DIAS, R. L.; RUBERTO, L.; HERNÁNDEZ, E.; VÁZQUEZ, S. C.; LO BALBO, A.; DEL PANNO, M. T.; MAC CORMACK, W. P. Bioremediation of an aged diesel oil-contaminated Antarctic soil: Evaluation of the “on site” biostimulation strategy using different nutrient sources. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 75, p. 96–103, 2012.
- DING, D.; SONG, X.; WEI, C.; LACHANCE, J. A review on the sustainability of thermal treatment for contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 253, p. 449–463, 2019.
- DORAN, J. W.; ZEISS, M. R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, v. 15, n. 1, p. 3–11, 2000.
- DREIJ, K.; LUNDIN, L.; LE BIHANIC, F.; LUNDSTEDT, S. Polycyclic aromatic compounds in urban soils of Stockholm City: Occurrence, sources and human health risk assessment. **Environmental Research**, v. 182, n. November 2019, 2020.
- EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. [s.l: s.n.]. v. 26
- EZE, M. O.; GEORGE, S. C.; HOSE, G. C. Dose-response analysis of diesel fuel phytotoxicity on selected plant species. **Chemosphere**, v. 263, p. 128382, 2021.
- FERGUSON, S. H.; FRANZMANN, P. D.; REVILL, A. T.; SNAPE, I.; RAYNER, J. L. The effects of nitrogen and water on mineralisation of hydrocarbons in diesel-contaminated terrestrial Antarctic soils. **Cold Regions Science and**

- Technology**, v. 37, n. 2, p. 197–212, 2003.
- GAINER, A.; BRESEE, K.; HOGAN, N.; SICILIANO, S. D. Advancing soil ecological risk assessments for petroleum hydrocarbon contaminated soils in Canada: Persistence, organic carbon normalization and relevance of species assemblages. **Science of the Total Environment**, v. 668, p. 400–410, 2019.
- GAO, Y.; DU, J.; BAHAR, M.; WANG, H.; SUBASHCHANDRABOSE, S.; DUAN, L.; YANG, X.; MEGHARAJ, M. Metagenomics analysis identifies nitrogen metabolic pathway in bioremediation of diesel contaminated soil. **Chemosphere**, v. 271, p. 129566, 2021.
- GEISSELER, D.; HORWATH, W. R.; JOERGENSEN, R. G.; LUDWIG, B. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms - A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2058–2067, 2010.
- GIELNIK, A.; PECHAUD, Y.; HUGUENOT, D.; CÉBRON, A.; RIOM, J. M.; GUIBAUD, G.; ESPOSITO, G.; VAN HULLEBUSCH, E. D. Effect of digestate application on microbial respiration and bacterial communities' diversity during bioremediation of weathered petroleum hydrocarbons contaminated soils. **Science of the Total Environment**, v. 670, p. 271–281, 2019.
- GOMES, H. I.; DIAS-FERREIRA, C.; RIBEIRO, A. B. Overview of in situ and ex situ remediation technologies for PCB-contaminated soils and sediments and obstacles for full-scale application. **Science of the Total Environment**, v. 445–446, p. 237–260, 2013.
- GRACE LIU, P. W.; CHANG, T. C.; CHEN, C. H.; WANG, M. Z.; HSU, H. W. Effects of soil organic matter and bacterial community shift on bioremediation of diesel-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 661–670, 2013.
- HAMDAN, H. Z.; SALAM, D. A. Microbial community evolution during the aerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in marine sediment microcosms: Effect of biostimulation and seasonal variations. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114858, 2020.
- HOREL, A.; MORTAZAVI, B.; SOBECKY, P. A. Biostimulation of weathered MC252 crude oil in northern Gulf of Mexico sandy sediments. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 93, p. 1–9, 2014.
- HOREL, A.; MORTAZAVI, B.; SOBECKY, P. A. Input of organic matter enhances biodegradation of weathered diesel fuel in sub-tropical sediments. **Science of the**

- Total Environment**, v. 533, p. 82–90, 2015.
- IMAM, A.; SUMAN, S. K.; GHOSH, D.; KANAUIA, P. K. Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 50–64, 2019.
- IMRON, M. F.; KURNIAWAN, S. B.; ISMAIL, N. 'IZZATI; ABDULLAH, S. R. S. Future challenges in diesel biodegradation by bacteria isolates: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 251, p. 119716, 2020.
- KHAN, M. A. I.; BISWAS, B.; SMITH, E.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a review. **Chemosphere**, v. 212, p. 755–767, 2018.
- KONG, L.; GAO, Y.; ZHOU, Q.; ZHAO, X.; SUN, Z. Biochar accelerates PAHs biodegradation in petroleum-polluted soil by biostimulation strategy. **Journal of Hazardous Materials**, v. 343, p. 276–284, 2018.
- KOSHLAF, E.; SHAHSAVARI, E.; ABURTO-MEDINA, A.; TAHA, M.; HALEYUR, N.; MAKADIA, T. H.; MORRISON, P. D.; BALL, A. S. Bioremediation potential of diesel-contaminated Libyan soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 297–305, 2016.
- KUPPUSAMY, S.; THAVAMANI, P.; VENKATESWARLU, K.; LEE, Y. B.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. **Chemosphere**, v. 168, p. 944–968, 2017.
- LAHEL, A.; FANTA, A. B.; SERGIENKO, N.; SHAKYA, M.; LÓPEZ, M. E.; BEHERA, S. K.; RENE, E. R.; PARK, H. S. Effect of process parameters on the bioremediation of diesel contaminated soil by mixed microbial consortia. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 113, p. 375–385, 2016.
- LAPINSKIENE, A.; MARTINKUS, P.; REBŽDAITE, V. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. **Environmental Pollution**, v. 142, n. 3, p. 432–437, 2006.
- LI, T.; LI, R.; ZHOU, Q. **The Application and Progress of Bioelectrochemical Systems (BESs) in Soil Remediation: A Review**. [s.l.] Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, 2020.

- LIANG, S. H.; HSU, D. W.; LIN, C. Y.; KAO, C. M.; HUANG, D. J.; CHIEN, C. C.; CHEN, S. C.; TSAI, I. J.; CHEN, C. C. Enhancement of microbial 2,4,6-trinitrotoluene transformation with increased toxicity by exogenous nutrient amendment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 138, n. July 2016, p. 39–46, 2017.
- LIU, F.; TU, T.; LI, S.; CAI, M.; HUANG, X.; ZHENG, F. Relationship between plankton-based B-carotene and biodegradable adaptability to petroleum-derived hydrocarbon. **Chemosphere**, v. 237, p. 124430, 2019a.
- LIU, X.; SELONEN, V.; STEFFEN, K.; SURAKKA, M.; RANTALAINEN, A. L.; ROMANTSCHUK, M.; SINKKONEN, A. Meat and bone meal as a novel biostimulation agent in hydrocarbon contaminated soils. **Chemosphere**, v. 225, p. 574–578, 2019b.
- MAIR, J.; SCHINNER, F.; MARGESIN, R. A feasibility study on the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from an Alpine former military site: Effects of temperature and biostimulation. **Cold Regions Science and Technology**, v. 96, p. 122–128, 2013.
- MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere**, v. 40, n. 4, p. 339–346, 2000.
- MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEGA-JARQUÍN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**, v. 27, n. 2, p. 165–175, 2004.
- MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Screening the Toxicity and Biodegradability of Petroleum Hydrocarbons by a Rapid Colorimetric Method. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, n. 2, p. 342–353, 2015.
- MORALES-GUZMÁN, G.; FERRERA-CERRATO, R.; RIVERA-CRUZ, M. DEL C.; TORRES-BUSTILLOS, L. G.; ARTEAGA-GARIBAY, R. I.; MENDOZA-LÓPEZ, M. R.; ESQUIVEL-COTE, R.; ALARCÓN, A. Diesel degradation by emulsifying bacteria isolated from soils polluted with weathered petroleum hydrocarbons. **Applied Soil Ecology**, v. 121, n. October, p. 127–134, 2017.
- MORILLO, E.; VILLAVERDE, J. Advanced technologies for the remediation of

- pesticide-contaminated soils. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 576–597, 2017.
- NAM, K.; CHUNG, N.; ALEXANDER, M. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 23, p. 3785–3788, 1998.
- NWANKWEGU, A. S.; ONWOSI, C. O.; ORJI, M. U.; ANAUKWU, C. G.; OKAFOR, U. C.; AZI, F.; MARTINS, P. E. Reclamation of DPK hydrocarbon polluted agricultural soil using a selected bulking agent. **Journal of Environmental Management**, v. 172, p. 136–142, 2016.
- NWANKWEGU, A. S.; ORJI, M. U.; ONWOSI, C. O. Studies on organic and inorganic biostimulants in bioremediation of diesel-contaminated arable soil. **Chemosphere**, v. 162, p. 148–156, 2016a.
- NWANKWEGU, A. S.; ORJI, M. U.; ONWOSI, C. O. Studies on organic and inorganic biostimulants in bioremediation of diesel-contaminated arable soil. **Chemosphere**, v. 162, p. 148–156, 2016b.
- NWINYI, O. C.; OLAWORE, Y. A. Biostimulation of spent engine oil contaminated soil using *Ananas comosus* and *Solanum tuberosum* peels. **Environmental Technology and Innovation**, v. 8, p. 373–388, 2017.
- OBIEZE, C. C.; CHIKERE, C. B.; SELVARAJAN, R.; ADELEKE, R.; NTUSHELO, K.; AKARANTA, O. Functional attributes and response of bacterial communities to nature-based fertilization during hydrocarbon remediation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 154, n. September, p. 105084, 2020.
- OKAFOR, C. P.; UDEMANG, N. L.; CHIKERE, C. B.; AKARANTA, O.; NTUSHELO, K. Indigenous microbial strains as bioresource for remediation of chronically polluted Niger Delta soils. **Scientific African**, v. 11, p. e00682, 2021.
- OSSAI, I. C.; AHMED, A.; HASSAN, A.; HAMID, F. S. Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. **Environmental Technology and Innovation**, v. 17, p. 100526, 2020.
- OWSIANIAK, M.; CHRZANOWSKI, Ł.; SZULC, A.; STANIEWSKI, J.; OLSZANOWSKI, A.; OLEJNIK-SCHMIDT, A. K.; HEIPIEPER, H. J. **Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of**

biosurfactants *Bioresource Technology*, 2009.

PÈREZ-ARMENDÁRIZ, B.; LOERA-CORRAL, O.; FERNÁNDEZ-LINARES, L.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Biostimulation of microorganisms from sugarcane bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 373–377, 2004.

PETROBRÁS. Manual Técnico: Diesel S10. Versão 1.3. Elaborado por: Gerência de Soluções Comerciais – Marketing – Abastecimento. Gerência de Combustíveis – P&D de Abastecimento – Cenpes. v. 1, p. 170, 2014.

PHULPOTO, I. A.; HU, B.; WANG, Y.; NDAYISENGA, F.; LI, J.; YU, Z. Effect of natural microbiome and culturable biosurfactants-producing bacterial consortia of freshwater lake on petroleum-hydrocarbon degradation. **Science of the Total Environment**, v. 751, p. 141720, 2021.

POLYAK, Y. M.; BAKINA, L. G.; CHUGUNOVA, M. V.; MAYACHKINA, N. V.; GERASIMOV, A. O.; BURE, V. M. Effect of remediation strategies on biological activity of oil-contaminated soil - A field study. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 126, n. September 2017, p. 57–68, 2018.

PRINCE, R. C.; HAITMANEK, C.; LEE, C. C. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. **Chemosphere**, v. 71, n. 8, p. 1446–1451, 2008.

QIN, G.; GONG, D.; FAN, M. Y. Bioremediation of petroleum-contaminated soil by biostimulation amended with biochar. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 150–155, 2013.

QU, Y.; GONG, Y.; MA, J.; WEI, H.; LIU, Q.; LIU, L.; WU, H.; YANG, S.; CHEN, Y. Potential sources, influencing factors, and health risks of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the surface soil of urban parks in Beijing, China. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 114016, 2020.

RAMADASS, K.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R. Ecotoxicity of measured concentrations of soil-applied diesel: Effects on earthworm survival, dehydrogenase, urease and nitrification activities. **Applied Soil Ecology**, v. 119, n. June, p. 1–7, 2017.

REN, X.; ZENG, G.; TANG, L.; WANG, J.; WAN, J.; WANG, J.; DENG, Y.; LIU, Y.; PENG, B. The potential impact on the biodegradation of organic pollutants from composting technology for soil remediation. **Waste Management**, v. 72, p. 138–149, 2018.

- RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; DENDOOVEN, L.; ALVAREZ-BERNAL, D.; CONTRERAS-RAMOS, S. M. Potential of earthworms to accelerate removal of organic contaminants from soil: A review. **Applied Soil Ecology**, v. 79, p. 10–25, 2014.
- SAMPAIO, C. J. S.; DE SOUZA, J. R. B.; DE CARVALHO, G. C.; QUINTELLA, C. M.; ROQUE, M. R. DE A. Analysis of petroleum biodegradation by a bacterial consortium isolated from worms of the polychaeta class (Annelida): Implications for NPK fertilizer supplementation. **Journal of Environmental Management**, v. 246, n. January, p. 617–624, 2019.
- SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v. 136, n. 1, p. 187–195, 2005.
- SATERBAK, A.; TOY, R. J.; WONG, D. C. L.; MCMAN, B. J.; WILLIAMS, M. P.; DORN, P. B.; BRZUZY, L. P.; CHAI, E. Y.; SALANITRO, J. P. Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 1591–1607, 1999.
- SHAHI, A.; AYDIN, S.; INCE, B.; INCE, O. Reconstruction of bacterial community structure and variation for enhanced petroleum hydrocarbons degradation through biostimulation of oil contaminated soil. **Chemical Engineering Journal**, v. 306, p. 60–66, 2016.
- SHAHSAVARI, E.; ADETUTU, E. M.; ANDERSON, P. A.; BALL, A. S. Plant residues - A low cost, effective bioremediation treatment for petrogenic hydrocarbon-contaminated soil. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 766–774, 2013.
- SHI, R.; LI, X.; YANG, Y.; FAN, Y.; ZHAO, Z. Contamination and human health risks of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface soils from Tianjin coastal new region, China. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115938, 2020.
- SHI, Z.; LIU, J.; TANG, Z.; ZHAO, Y.; WANG, C. Vermiremediation of organically contaminated soils: Concepts, current status, and future perspectives. **Applied Soil Ecology**, v. 147, n. February 2019, p. 103377, 2019.
- SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; RODRÍGUEZ-CALVO, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.; CALVO, C. Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils

- to land-farming treatments. **Environmental Research**, v. 137, p. 49–58, 2015.
- SINGH, P.; JAIN, R.; SRIVASTAVA, N.; BORTHAKUR, A.; PAL, D. B.; SINGH, R.; MADHAV, S.; SRIVASTAVA, P.; TIWARY, D.; MISHRA, P. K. Current and emerging trends in bioremediation of petrochemical waste: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 3, p. 155–201, 2017.
- SONG, B.; ZENG, G.; GONG, J.; LIANG, J.; XU, P.; LIU, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, C.; CHENG, M.; LIU, Y.; YE, S.; YI, H.; REN, X. Evaluation methods for assessing effectiveness of in situ remediation of soil and sediment contaminated with organic pollutants and heavy metals. **Environment International**, v. 105, n. May, p. 43–55, 2017.
- SOWANI, H.; KULKARNI, M.; ZINJARDE, S. Uptake and detoxification of diesel oil by a tropical soil Actinomycete *Gordonia amicalis* HS-11: Cellular responses and degradation perspectives. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114538, 2020.
- TEJADA, M.; HERNANDEZ, M. T.; GARCIA, C. Soil restoration using composted plant residues: Effects on soil properties. **Soil and Tillage Research**, v. 102, n. 1, p. 109–117, 2009.
- THOMAS, A. O.; LEAHY, M. C.; SMITH, J. W. N.; SPENCE, M. J. Natural attenuation of fatty acid methyl esters (FAME) in soil and groundwater. **Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology**, v. 50, n. 3, p. 301–317, 2017.
- UGOCHUKWU, U. C.; OKONKWO, F.; SOKARI, W.; ENEH, C.; EZOGU, L. Bioremediation Strategy Based on Risk Assessment of Exposure to Residual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Journal of Environmental Management**, v. 280, n. September 2020, p. 111650, 2021.
- UMEH, A. C.; VÁZQUEZ-CUEVAS, G. M.; SEMPLE, K. T. Mineralisation of ¹⁴C-phenanthrene in PAH-diesel contaminated soil: Impact of *Sorghum bicolor* and *Medicago sativa* mono- or mixed culture. **Applied Soil Ecology**, v. 125, n. November 2017, p. 46–55, 2018.
- VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277–286, 2017.
- VASILYEVA, G.; KONDRASHINA, V.; STRIJAKOVA, E.; ORTEGA-CALVO, J. J. Adsorptive bioremediation of soil highly contaminated with crude oil. **Science**

- of the Total Environment**, v. 706, p. 135739, 2020.
- WALWORTH, J.; POND, A.; SNAPE, I.; RAYNER, J.; FERGUSON, S.; HARVEY, P. Nitrogen requirements for maximizing petroleum bioremediation in a sub-Antarctic soil. **Cold Regions Science and Technology**, v. 48, n. 2 SPEC. ISS., p. 84–91, 2007.
- WANG, S. Y.; KUO, Y. C.; HONG, A.; CHANG, Y. M.; KAO, C. M. Bioremediation of diesel and lubricant oil-contaminated soils using enhanced landfarming system. **Chemosphere**, v. 164, p. 558–567, 2016.
- WASLEY, J.; MOONEY, T. J.; KING, C. K. Soil invertebrate community change over fuel-contaminated sites on a subantarctic island: An ecological field-based line of evidence for site risk assessment. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 12, n. 2, p. 306–314, 2016.
- WILLIAMS, C. M.; GRIMES, J. L.; MIKKELSEN, R. L. The use of poultry litter as co-substrate and source of inorganic nutrients and microorganisms for the Ex situ biodegradation of petroleum compounds. **Poultry Science**, v. 78, n. 7, p. 956–964, 1999.
- YANTO, D. H. Y.; TACHIBANA, S. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp. NG007. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 438–450, 2013.
- YE, X.; CHEN, B.; LI, P.; JING, L.; ZENG, G. A simulation-based multi-agent particle swarm optimization approach for supporting dynamic decision making in marine oil spill responses. **Ocean and Coastal Management**, v. 172, n. January, p. 128–136, 2019.
- YEOMANS, J. C.; BREMNER, J. M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil¹. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 19, n. 13, p. 1467–1476, 1988.
- YOUSEFI KEBRIA, D.; KHODADADI, A.; GANJIDOUST, H.; BADKOUBI, A.; AMOOZEGAR, M. A. Isolation and characterization of a novel native *Bacillus* strain capable of degrading diesel fuel. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 6, n. 3, p. 435–442, 2009.
- ZHANG, K.; HUA, X. F.; HAN, H. L.; WANG, J.; MIAO, C. C.; XU, Y. Y.; HUANG, Z. D.; ZHANG, H.; YANG, J. M.; JIN, W. B.; LIU, Y. M.; LIU, Z. Enhanced bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil using wheat straw. **Chemosphere**, v. 73, n. 9, p. 1387–1392, 2008.

- ZHANG, L.; LU, J.; YANG, Z. Computers & Industrial Engineering Dynamic optimization of emergency resource scheduling in a large-scale maritime oil spill accident. **Computers & Industrial Engineering**, v. 152, n. December 2020, p. 107028, 2021.
- ZHANG, T.; LIU, Y.; ZHONG, S.; ZHANG, L. AOPs-based remediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soils: Efficiency, influencing factors and environmental impacts. **Chemosphere**, v. 246, p. 125726, 2020.
- ZHANG, Y.; WANG, J.; DAI, S.; ZHAO, J.; HUANG, X.; SUN, Y.; CHEN, J.; CAI, Z.; ZHANG, J. The effect of C:N ratio on heterotrophic nitrification in acidic soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 137, n. May, 2019.

ANEXO I

Figura 7 – Cromatograma Controle Tempo 0

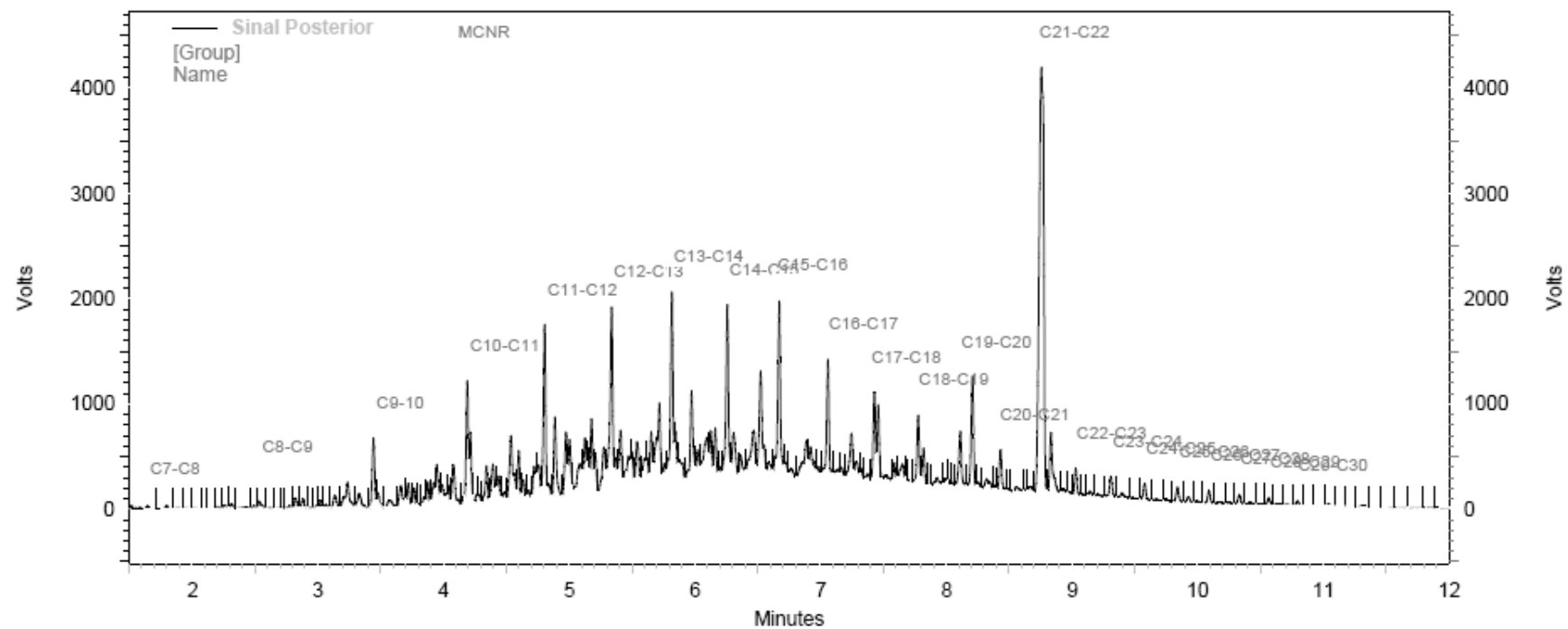


Figura 8 – Cromatograma Controle Tempo 21

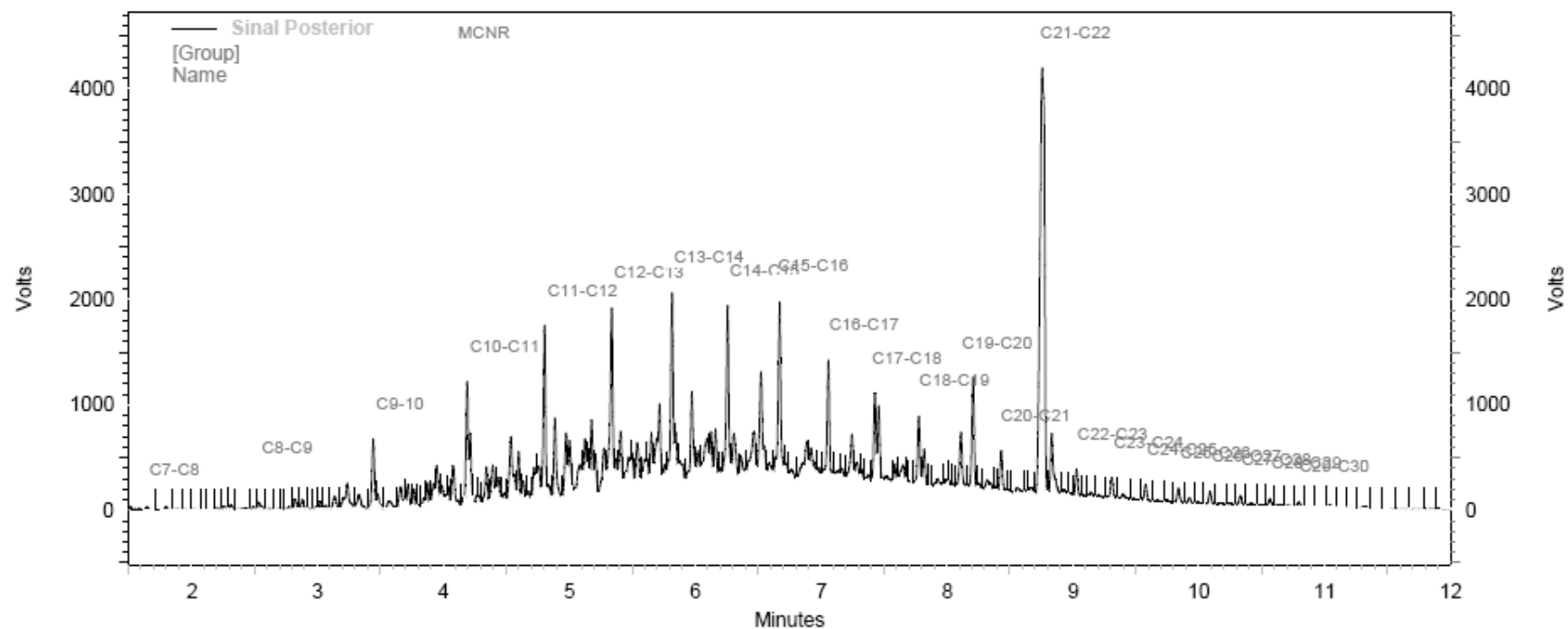


Figura 9 – Cromatograma Controle Tempo 55

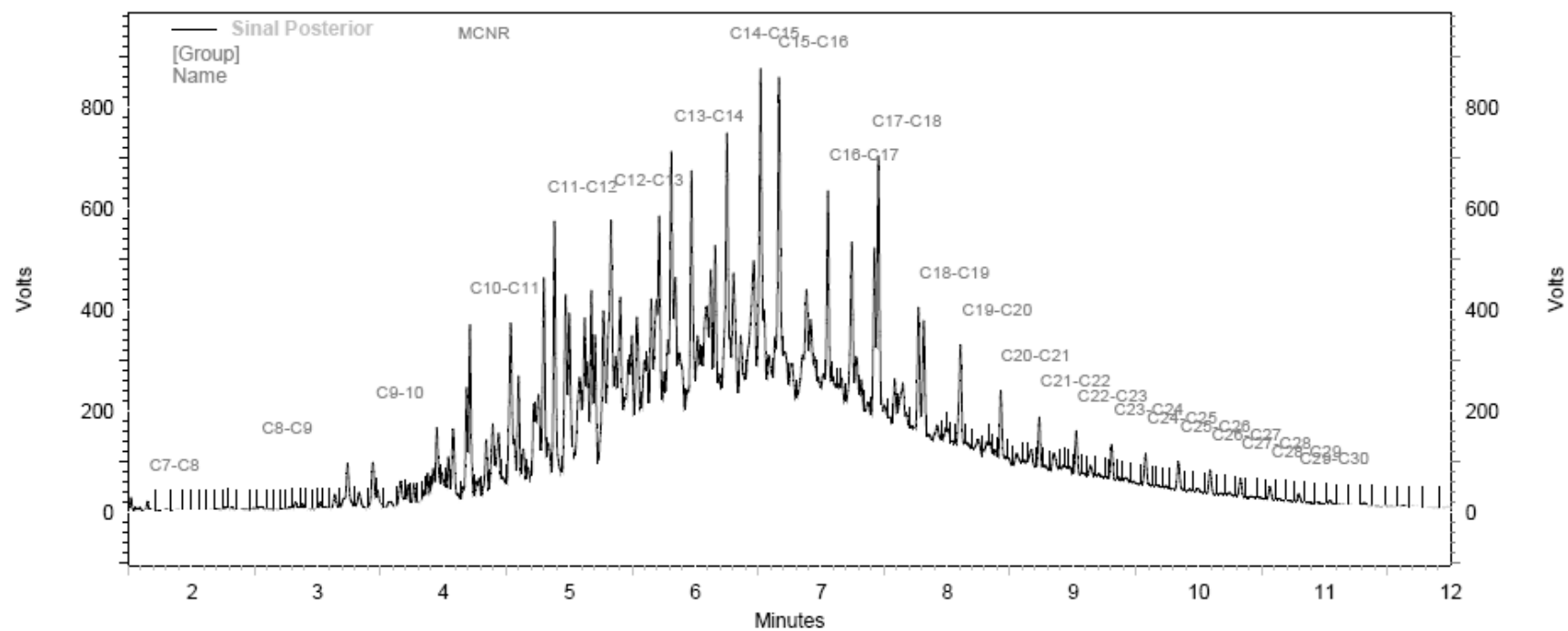


Figura 10 – Cromatograma Controle Tempo 93

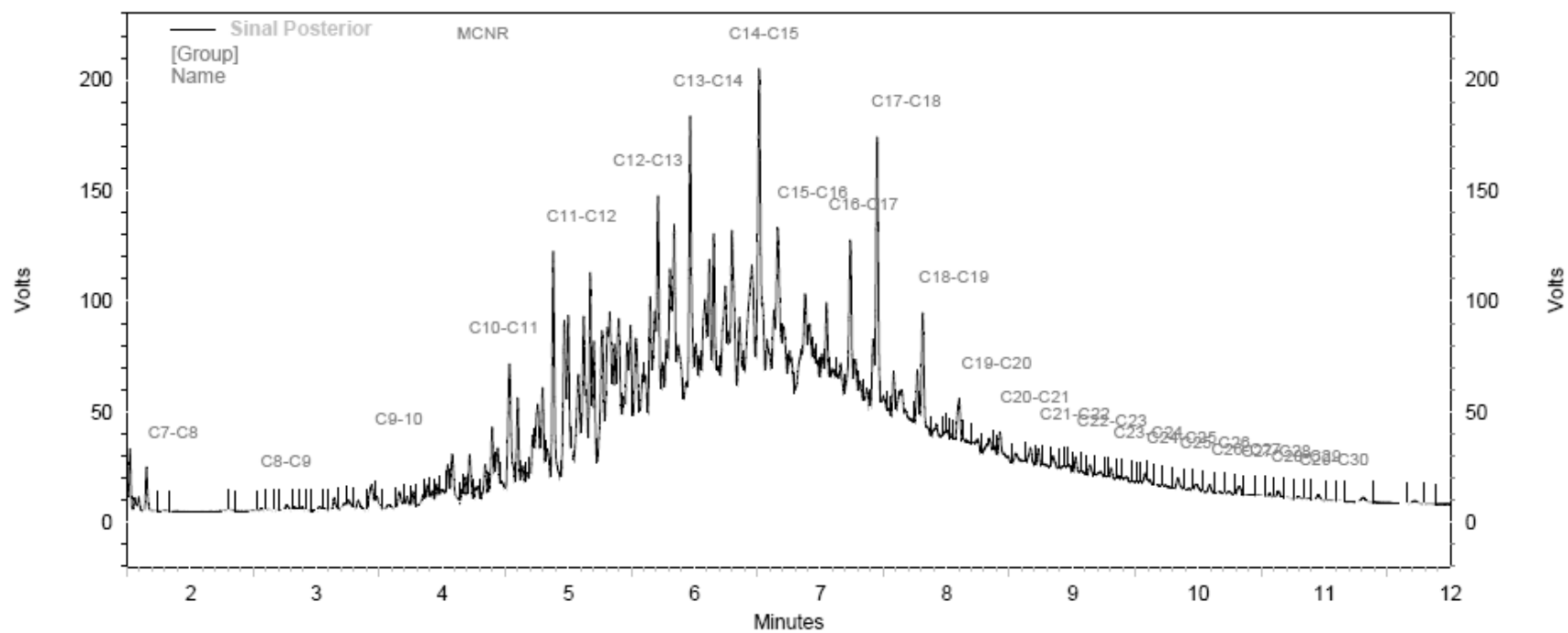


Figura 11 – Cromatograma COB Tempo 0

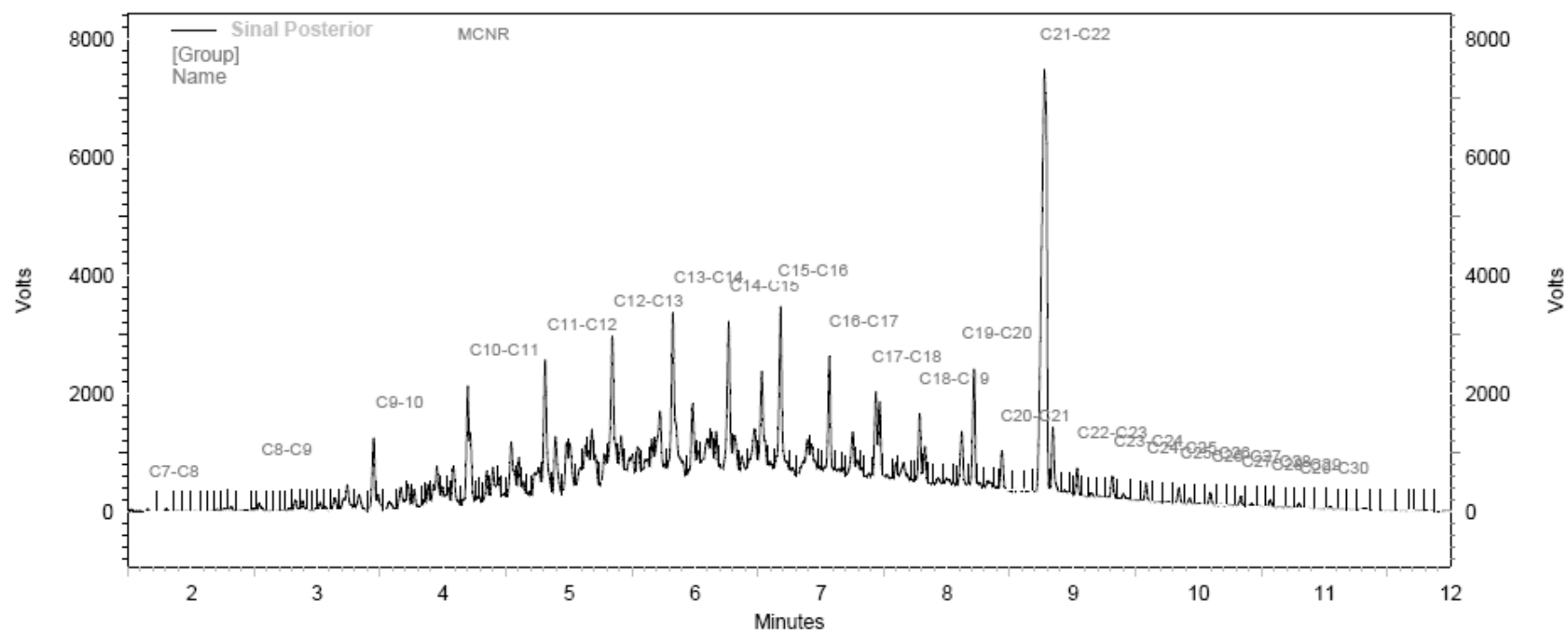


Figura 12 – Cromatograma COB Tempo 21

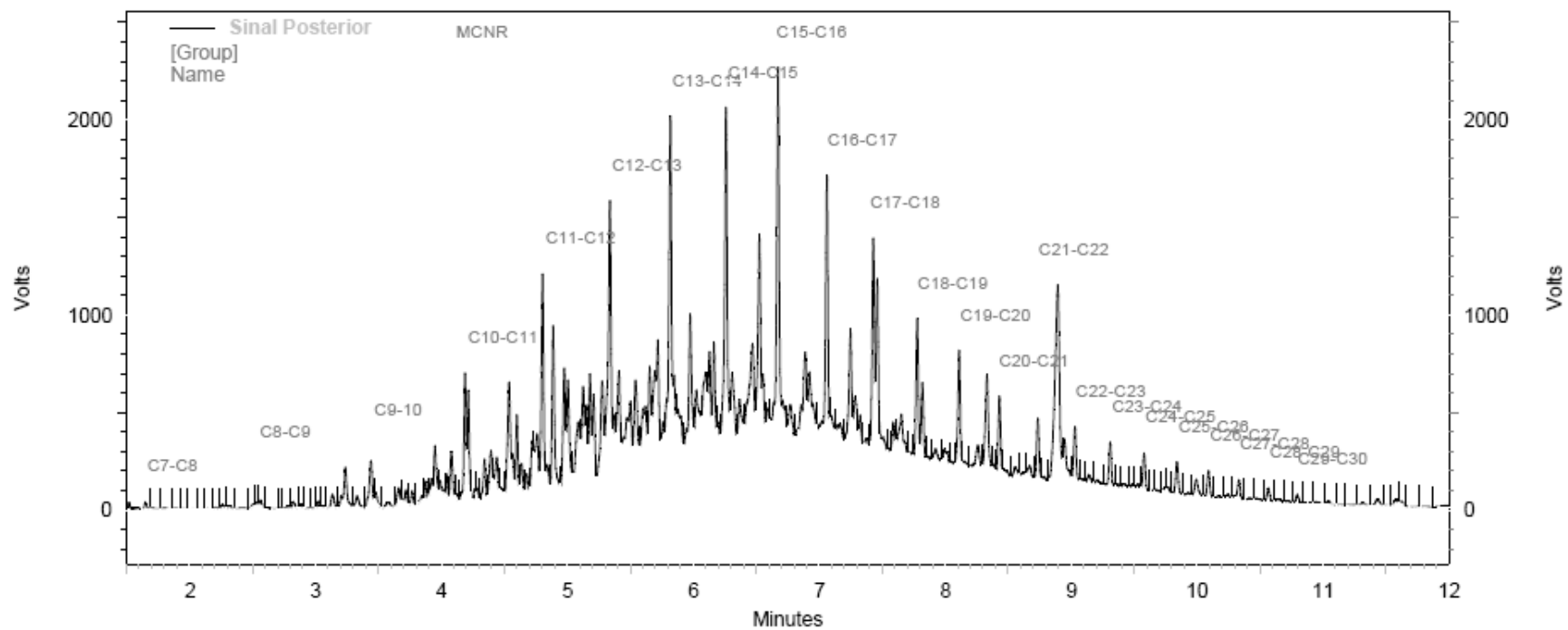


Figura 13 – Cromatograma COB Tempo 55

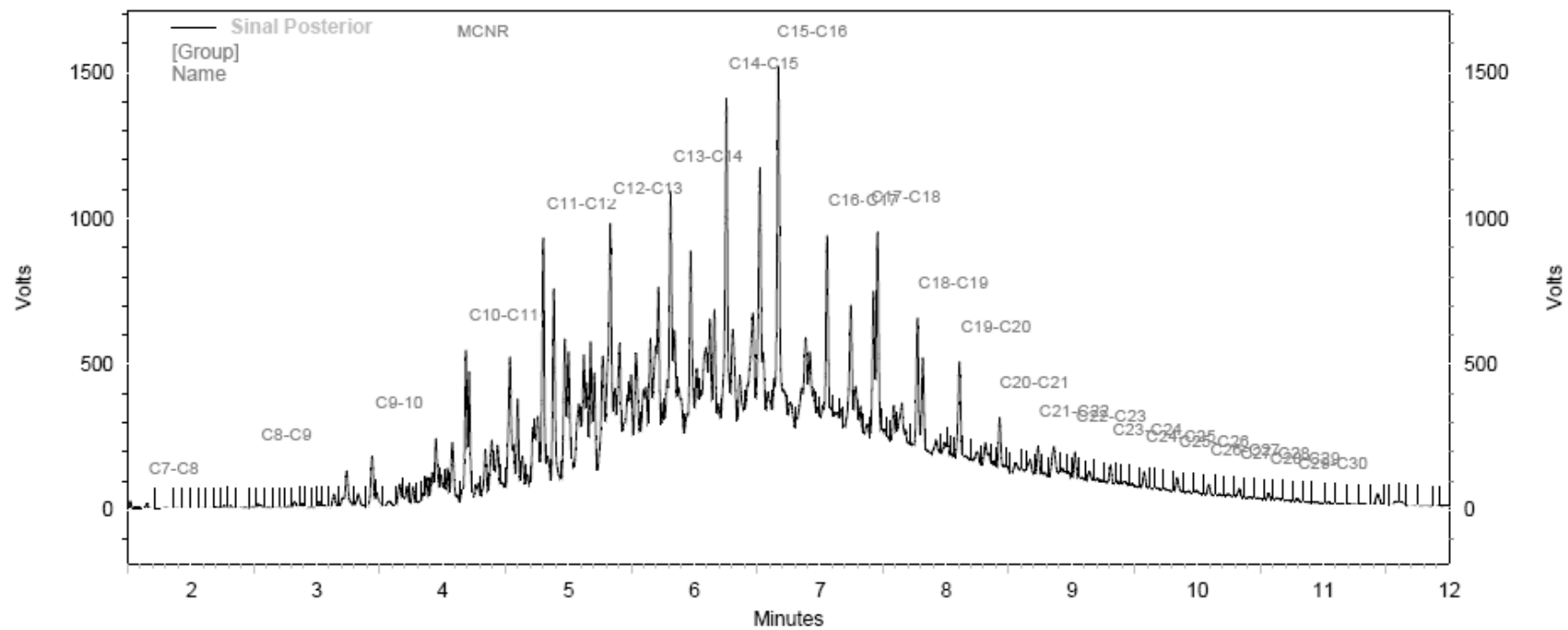


Figura 14 – Cromatograma COB Tempo 93

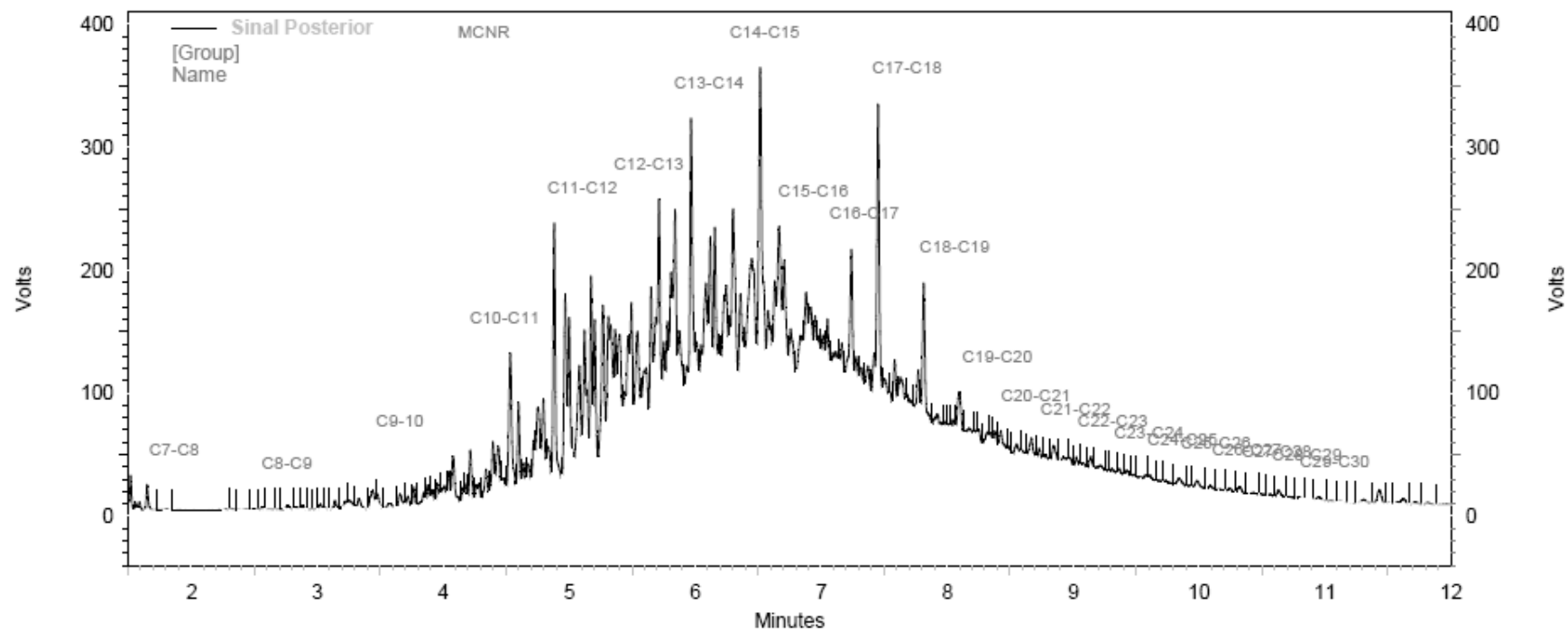


Figura 15 – Cromatograma SHB Tempo 0

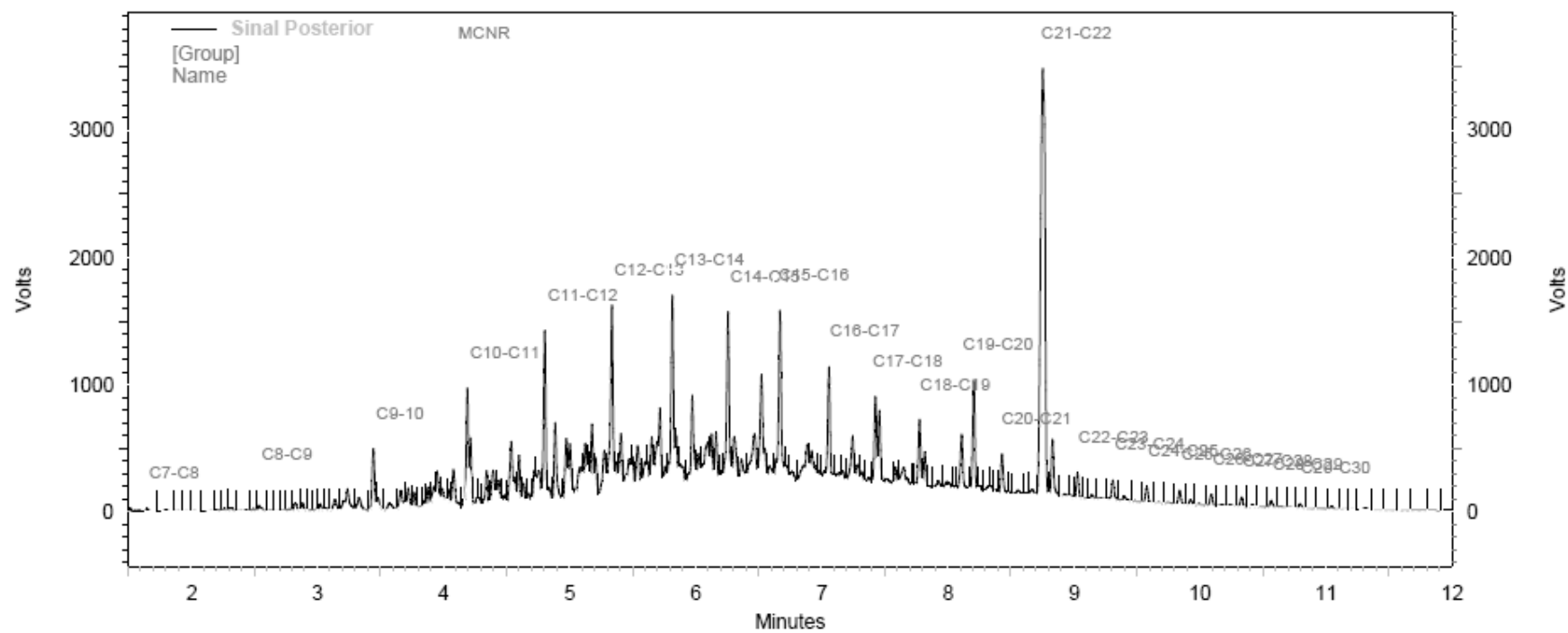


Figura 16 – Cromatograma SHB Tempo 21

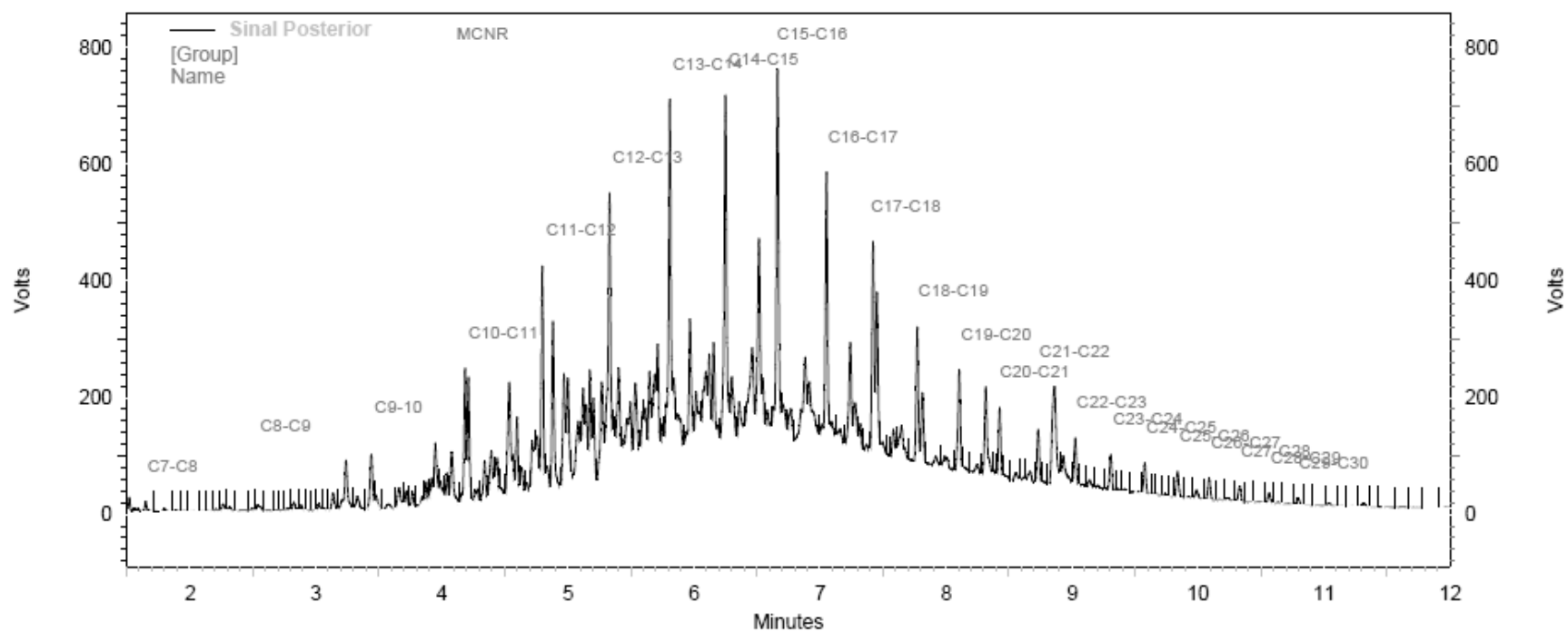


Figura 17 – Cromatograma SHB Tempo 55

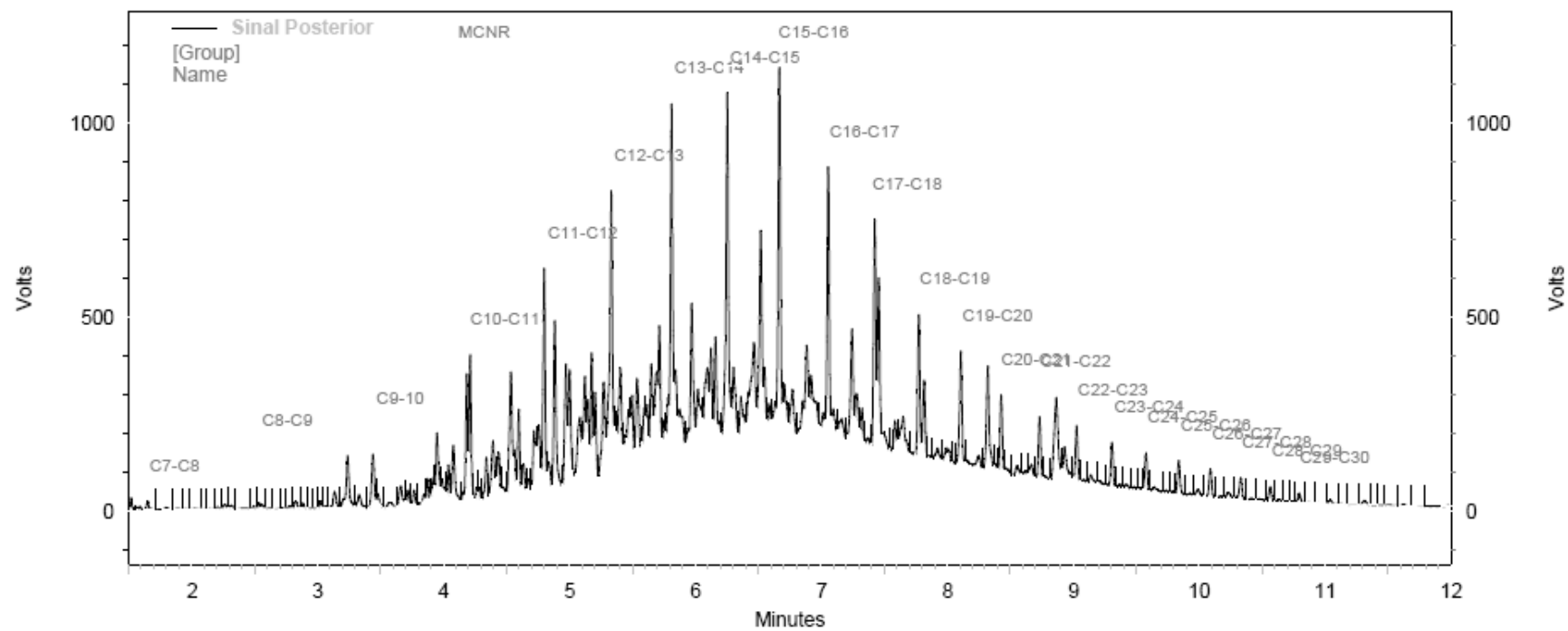


Figura 18 – Cromatograma SHB Tempo 93

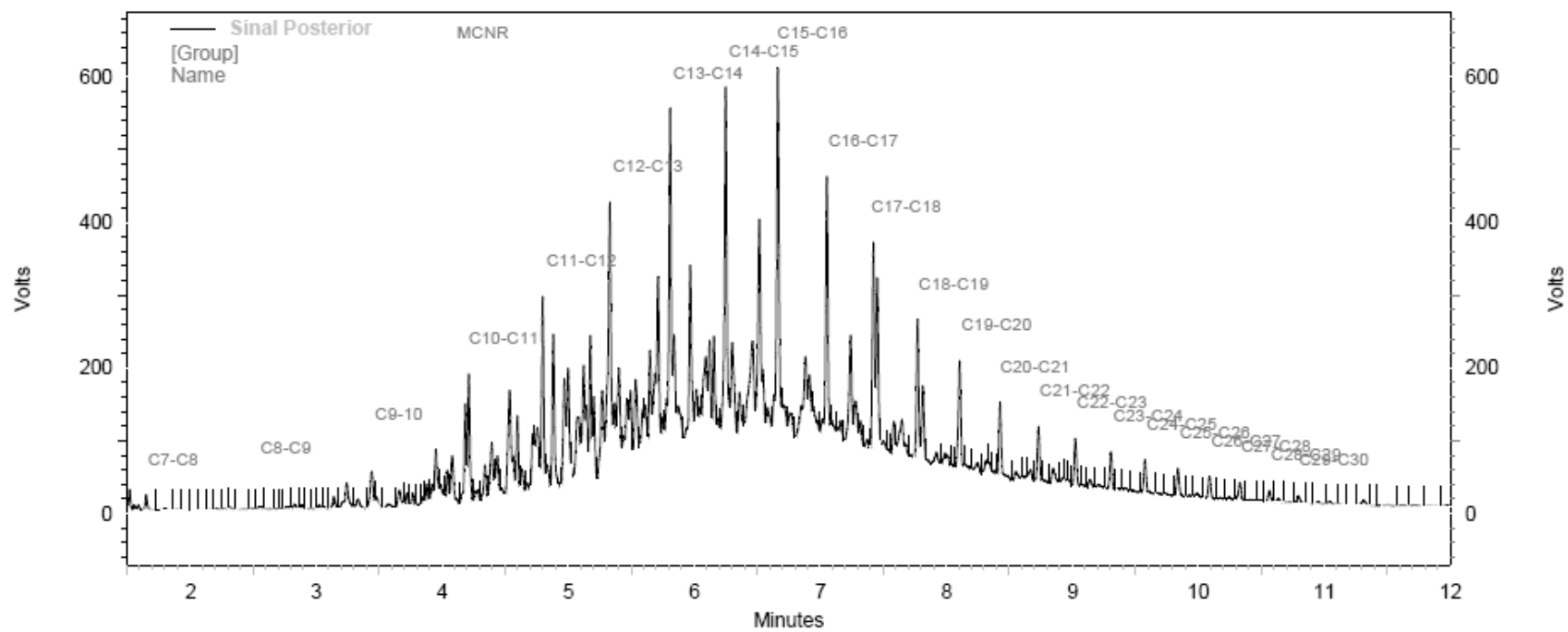


Figura 19 – Cromatograma IB Tempo 0

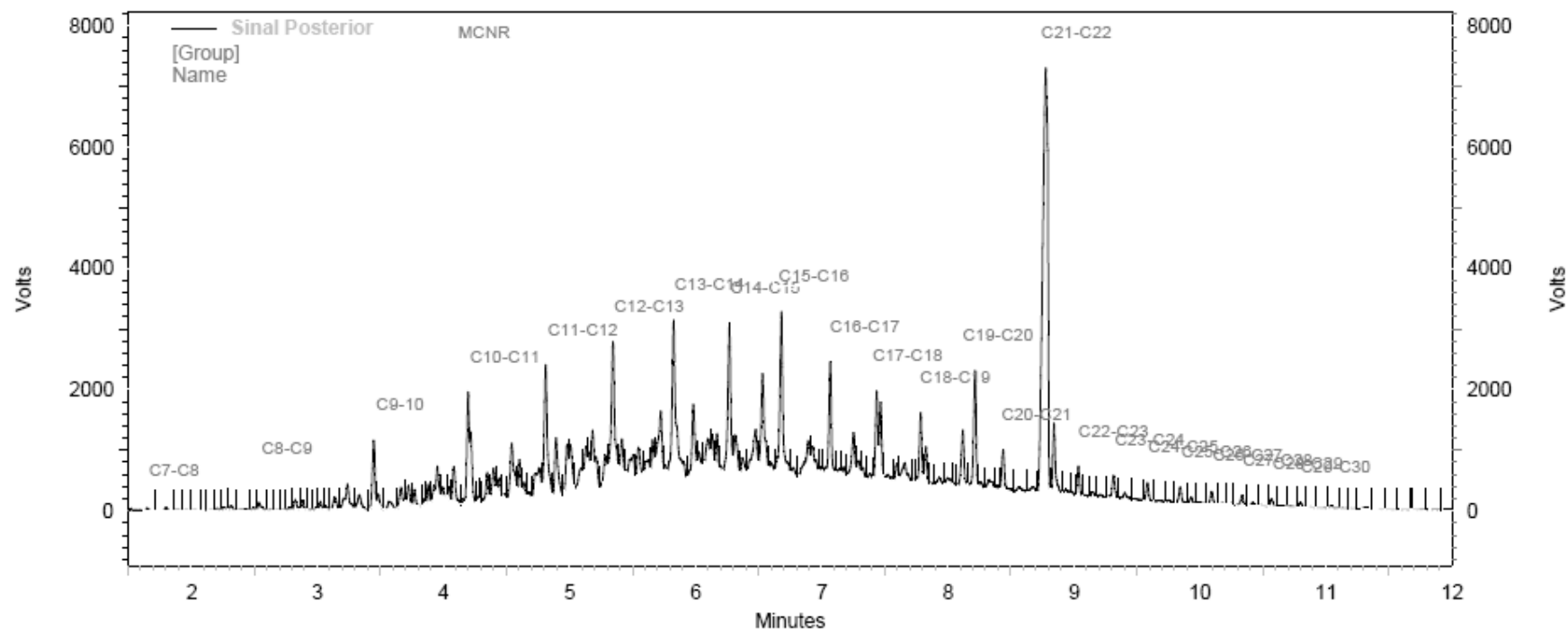


Figura 20 – Cromatograma IB Tempo 21

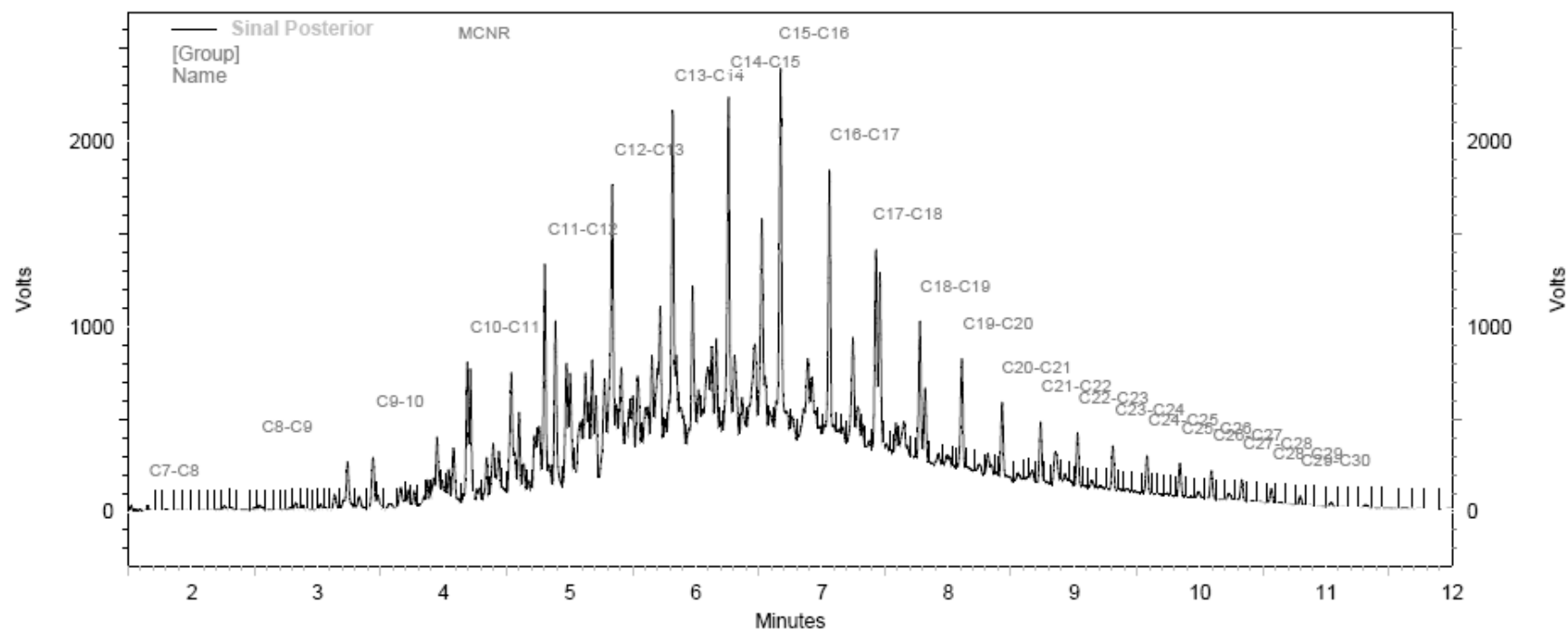


Figura 21 – Cromatograma IB Tempo 55

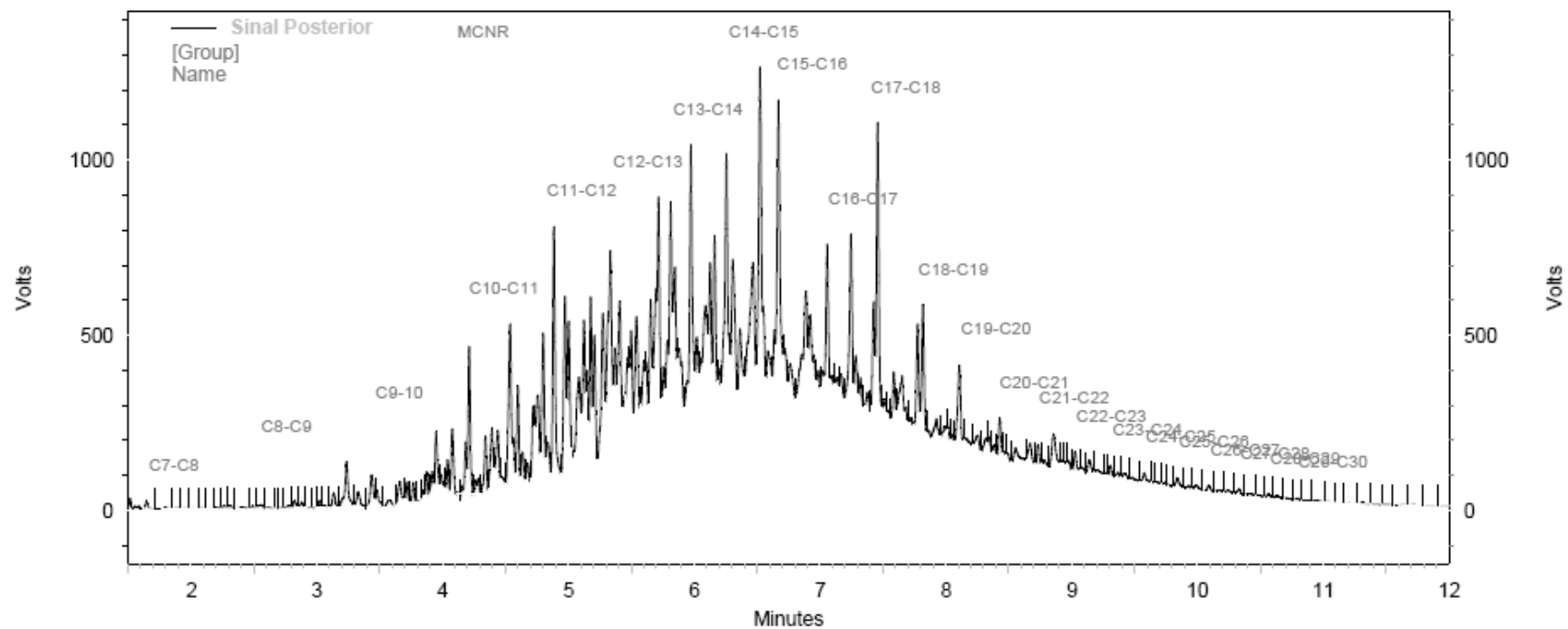


Figura 22 – Cromatograma IB Tempo 93

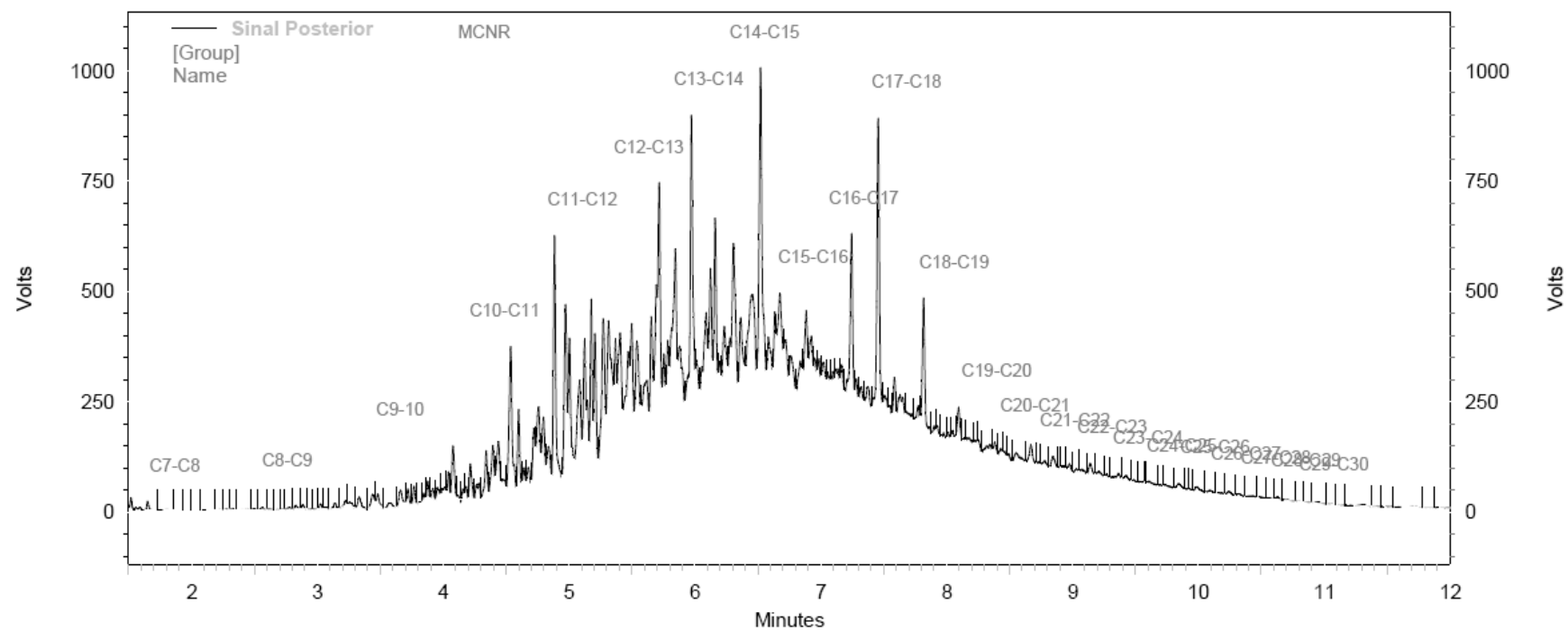


Figura 23 – Cromatograma padrão

